

Aus der Klinik für Neurologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Faßbender

**Effekte von Interferonen auf die Phagozytosekapazität von
mononukleären Phagozyten bei der Alzheimer Erkrankung**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2008

vorgelegt von:

Ursula Schall

geboren am 14. März 1983 in Ehingen/Donau

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	5
2.1 Die Alzheimer-Erkrankung	5
2.1.1 Pathophysiologie	7
2.1.2 Histopathologie	8
2.1.2.1 Neurofibrillen	8
2.1.2.2 Amyloidplaques	9
2.2 Pathogenese	11
2.3 Neuroinflammation bei der Alzheimer Erkrankung und das angeborene Immunsystem	11
2.4 Makrophagen	14
2.5 Mikroglia	17
2.6 Interferone	18
2.6.1 Typ I Interferone	18
2.6.2 Typ II Interferone	20
2.7 Therapie der Alzheimer Erkrankung	21
2.7.1 Aktuelle medikamentöse Therapieansätze	21
2.7.2 Experimentelle Therapieansätze	22
2.8 Ziel dieser Arbeit	25
3 Material und Methoden	26
3.1 Geräte	26
3.2 Materialien	26
3.3 Substanzen	27
3.4 Interferone	28
3.4.1 Humane Interferone	28
3.4.2 Maus-Interferone	28
3.5 Antikörper	28

3.6	Lösungen	29
3.7	Zellkulturmedien	29
3.8	Aufbau der Experimente	30
3.9	Zellen	31
3.10	Zellstimulation	33
3.10.1	Stimulation humaner primärer Blutmonozyten (PBMC)	33
3.10.2	Mikroglia stimulation	34
3.11	Durchflusszytometrie (Fluorescence-Activated-Cell-Sorting - FACS)	36
3.12	Statistische Auswertung	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Monozytennachweis	39
4.1.1	Isotypkontrollfärbung der Monozyten	39
4.1.2	Spezifische Färbung der Monozyten	40
4.2	Monozyten-Stimulationsversuche	42
4.2.1	Stimulation humaner Monozyten mit IFN α 100 U/ml, IFN α 500 U/ml und IFN α 1000 U/ml	42
4.2.2	Stimulation humaner Monozyten mit IFN β 100 U/ml, IFN β 500 U/ml und IFN β 1000 U/ml	46
4.2.3	Stimulation humaner Monozyten mit IFN γ 100 U/ml, IFN γ 500 U/ml und IFN γ 1000 U/ml	50
4.3	Mikroglia-Stimulationsversuche	54
4.3.1	Stimulation von Mikroglia mit IFN β 500 U/ml	54
4.3.2	Stimulation von Mikroglia mit IFN γ 100 pg/ml	57
5	Diskussion	59
6	Literaturverzeichnis	63
7	Veröffentlichung	74
8	Danksagung	75
9	Lebenslauf	76

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AChEI	Acetylcholinesterase Inhibitor
AD	Alzheimer Demenz
ADRDA	Alzheimer`s Disease and Related Disorders Association
AK	Antikörper
AP	Amyloid P
APC	Antigen Presenting Cell
ApoE4	Apolipoprotein E4
APP	Amyloid Precursor Protein
A β	Amyloid beta
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
Cdk5	Cyclin-dependent kinase 5
CERAD	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer`s Disease
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-Reaktives Protein
CT	Computertomographie
DC	Dendritic Cell
dest	destilliert
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagles Serum
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBSS	Hank`s Balanced Salt Solution
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen-DR

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KCL	Kaliumchlorid
LPS	Lipopolysaccharid
MAO	Monoaminoxidase
M-CSF	Macrophage-Colony-Stimulating Factor
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NINCDS	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickoxid
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Primary Blood Monocyte Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	R-Phycoerythrin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PHF	Paired helical filaments
PLL	Poly-L-Lysin
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PRR	Pattern Recognition Receptor
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI-Lösung	Roswell Park Memorial Institute-Lösung
RT	Raumtemperatur
SSRI	Selektiver Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer
TCR	T cell receptor

Th1-Zelle	T-Helferzelle 1
Th2-Zelle	T-Helferzelle 2
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Alois Alzheimer und Auguste D.	5
Abbildung 2: Kaplan-Meier-Kurve	6
Abbildung 3: Cholinerges Faserverlust	8
Abbildung 4: Neurofibrillenbündel	9
Abbildung 5: Klassische Plaques	10
Abbildung 6: Diffuse Plaques	10
Abbildung 7: Chronischer Entzündungsprozess	13
Abbildung 8: Makrophagenpolarisierung.....	15
Abbildung 9: Immunaktivierung von Makrophagen.....	16
Abbildung 10: Mikrogliaaktivierung bei AD	18
Abbildung 11: Neurotransmission.....	21
Abbildung 12: Spaltung des APP	24
Abbildung 13: Histopaque [®] -1077	31
Abbildung 14: Absorptions- und Emissionsspektren	36
Abbildung 15: Kompensation.....	37
Abbildung 16: Isotypkontrollfärbung.....	40
Abbildung 17: Dreifachfärbung der Monozyten	41
Abbildung 18: Monozytenversuche mit 100 U/ml IFN α	43
Abbildung 19: Monozytenversuche mit 500 U/ml IFN α	44
Abbildung 20: Monozytenversuche mit 1000 U/ml IFN α	45
Abbildung 21: Monozytenversuche mit 100 U/ml IFN β	47
Abbildung 22: Monozytenversuche mit 500 U/ml IFN β	48
Abbildung 23: Monozytenversuche mit 1000 U/ml IFN β	49
Abbildung 24: Monozytenversuche mit 100 U/ml IFN γ	51
Abbildung 25: Monozytenversuche mit 500 U/ml IFN γ	52
Abbildung 26: Monozytenversuche mit 1000 U/ml IFN γ	53
Abbildung 27: Mikrogliaversuche mit 500 U/ml IFN β , A β -Phagozytose	55
Abbildung 28: Mikrogliaversuche mit 500 U/ml IFN β , Beads-Phagozytose	56
Abbildung 29: Mikrogliaversuche mit 100 pg/ml IFN γ , A β -Phagozytose	57
Abbildung 30 Mikrogliaversuche mit 100 pg/ml IFN γ , Beads-Phagozytose.....	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	26
Tabelle 2: Materialien.....	27
Tabelle 3: Substanzen.....	27
Tabelle 4: FACS-Untersuchungsansätze für Monozytenversuche.....	33
Tabelle 5: FACS-Untersuchungsansätze für Mikrogliaversuche	34

1 Zusammenfassung

Die Alzheimer Erkrankung, als häufigste neurodegenerative Erkrankung, ist histopathologisch charakterisiert durch intrazerebrale Ablagerungen von Amyloid-Plaques, intraneuronalen Fibrillenbündeln sowie einer neuronalen Atrophie. Eine kausale Therapie der Alzheimer Erkrankung ist bislang nicht bekannt. Die therapeutische Steigerung der Phagozytose von Amyloid-Peptid wird gegenwärtig als Strategie zur Verringerung der Plauepathologie sowie der Symptomatik der Alzheimer Erkrankung diskutiert.

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob durch die Behandlung von Monozyten und Mikroglia mit immunmodulierenden Interferonen eine Erhöhung ihrer Phagozytosekapazität für Amyloid-Peptid erreicht werden kann.

Im ersten Teil dieser Studie wurden humane Monozyten durch einen Gradienten mit Histopaque[®]-1077 aus Vollblut isoliert und anschließend mit den Antikörpern Anti-CD45, Anti-CD11c sowie Anti-HLA-DR identifiziert.

In weiteren Experimenten wurden die Monozyten mit den Interferonen alpha, beta und gamma in verschiedenen Konzentrationen für 2h, 6h, 12h, 24h, 48h und 72h inkubiert. Danach wurden den Monozyten FITC-markierte carboxylierte Fluospheres als Phagozytosematerial geboten. Die phagozytierten Fluoreszenzpartikel wurden durch Messung der Fluoreszenzintensität in der FACS-Analyse quantifiziert.

Im zweiten Teil wurden murine Mikroglia mit den Interferonen beta und gamma behandelt und danach ein Teil der Zellen mit FITC-markierten carboxylierten Fluospheres und ein anderer Teil der Zellen mit CY3-markiertem Amyloid β inkubiert. Die phagozytierten Fluoreszenzpartikel sowie das phagozytierte Amyloid β wurden ebenfalls in der FACS-Analyse quantifiziert.

Die Behandlung mit Interferon α zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Phagozytosekapazität von Monozyten.

Die Behandlung mit Interferon β hingegen zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Phagozytosekapazität von Monozyten, sodass die Behandlung bei den Mikroglia mit Interferon β fortgeführt worden war. Die signifikante Phagozytosesteigerung, die sich bei den Monozytenversuchen gezeigt hatte, ließ sich bei den Mikroglia jedoch nicht

bestätigen. Es zeigte sich allerdings ebenfalls eine Tendenz zur verstärkten Amyloid β -Phagozytose nach Behandlung mit Interferon β .

Nach Behandlung mit Interferon γ zeigte sich weder bei Monozyten noch bei Mikroglia ein signifikanter Einfluss auf die Phagozytosekapazität.

Eine Überlegung zur möglichen Therapie geht dahin, durch Senkung der Amyloid β -Last dem Krankheitsverlauf entgegen zu wirken. Durch Anregung der Mikrogliazellen, das im Gehirn von Alzheimer Patienten im Übermaß gebildete Amyloid β verstärkt zu phagozytieren, könnte die Amyloid β -Last gesenkt werden.

Nach den Ergebnissen dieser Studie, eignen sich weder Interferon α noch Interferon γ zur Phagozytosesteigerung von Monozyten und Mikroglia und scheinen somit als mögliche Therapieoption nicht in Frage zu kommen.

Ob Interferon β als mögliche Therapieoption der Alzheimer Erkrankung in Betracht kommt, wird erst durch weitere in vivo-Experimente geklärt werden können. Die Ergebnisse dieser Studie, die eine Tendenz zur Phagozytosesteigerung zeigen, sprechen zumindest dafür.

Summary

Alzheimer's disease, the most common neurodegenerative disease, is characterized by intracerebral depositions of amyloid β -protein, intraneuronal neurofibrillary tangles, and a neuronal atrophy. There is still no causal therapy of Alzheimer's disease available.

The therapeutic increase of the amyloid phagocytosis is currently discussed as a strategy to reduce plaque pathology and the symptoms of AD.

The aim of this study was to investigate whether enhanced phagocytosis by monocytes and microglia of amyloid peptide can be obtained by treating them with immunoeediting interferons.

In the first part of this study, human monocytes were isolated from whole blood by making a gradient with Histopaque[®]-1077. Subsequently they were identified with the antibodies Anti-CD45, Anti-CD11c and Anti-HLA-DR.

In further experiments, monocytes were treated with the interferons alpha, beta, and gamma in various concentrations for 2h, 6h, 12h, 24h, 48h and 72h and afterwards they were incubated with FITC-labelled carboxylated fluospheres. The phagocytosed fluospheres were quantified by measuring their fluorescence intensity in the FACS-analysis.

In the second part of this research, murine microglia were treated with the interferons beta and gamma. Afterwards one part of the cells was incubated with FITC-labelled carboxylated fluospheres and another part was incubated with CY3-labelled A β 42. Both the phagocytosed fluospheres and the phagocytosed A β were quantified in the FACS-analysis.

Treatment with IFN α did not show any significant influence over the phagocytic capacity of monocytes.

On the other hand, treatment with interferon β showed a significant influence on the phagocytic activity of monocytes, so that we continued with the interferon β treatment of the microglia. Admittedly we could not confirm the significant results in the microglia experiments which we had previously obtained in the monocyte experiments.

However, a trend toward intensified phagocytosis after treatment with interferon β could be seen in the microglia experiments.

A significant influence over the phagocytic activity could neither be seen in monocytes nor in microglia after treatment with interferon γ .

According to the results of this study, neither interferon α nor interferon γ are suited to enhance the phagocytic capacity of monocytes and microglia. Consequently they do not appear to be considered as a therapeutic option for Alzheimer`s disease.

Further in vivo-experiments will be required to decide if interferon β comes into consideration as a novel therapeutic option for Alzheimer`s disease. The results of this study that show a trend to enhanced phagocytic capacity after treatment with interferon β at least support this consideration.

2 Einleitung

2.1 Die Alzheimer-Erkrankung

1906 beschrieb der Psychiater Alois Alzheimer (1864-1915) (Abb.1a) das Krankheitsbild seiner damaligen Patientin Auguste D. (Abb.1b), die eine zunehmende Gedächtnisschwäche, verminderte kognitive Fähigkeiten sowie Halluzinationen zeigte, und im Alter von 55 Jahren verstarb.



Abbildung 1: Alois Alzheimer und Auguste D. (www.hirnliga.de)

Bei der Obduktion ihres Gehirns entdeckte Alzheimer Ablagerungen eigentümlicher Stoffwechselprodukte in Form neuritischer Plaques und Veränderungen der Neurofibrillen. Diese Krankheit benannte später der Psychiater Emil Kraepelin (1856-1926) nach seinem Schüler Alzheimer.

Die Alzheimer Demenz (AD) ist heute mit über 20 Millionen Fällen weltweit die häufigste neurodegenerative Erkrankung, die in Demenz resultiert (Goedert 2006). Dabei zeigt sich bei 55-jährigen Frauen ein doppelt so großes Risiko (33%) in ihrem weiteren Leben an einer Demenz zu erkranken, als bei Männern (Ott et al. 1998).

In Deutschland leiden derzeit fast eine Million Menschen an einer Demenzerkrankung, wobei es sich in zwei Drittel der Fälle um AD handelt. Mit 200.000 neuen Demenzfällen pro Jahr, darunter 120.000 neuen Alzheimer Fällen, stellt die AD somit ein weit verbreitetes Krankheitsbild dar (Bickel 2001, Calabrese et al. 2007). Die Inzidenz nimmt von durchschnittlich knapp 0,2% bei den 65-69-Jährigen auf Werte zwischen 5 und 10% bei den über 90-Jährigen zu (Wallesch 2005). Die sehr seltenen Formen der AD vor dem 65. Lebensjahr treten vor allem bei der familiären, autosomal-dominant vererbten AD-Form auf (Selkoe 2001).

Die Patienten zeigen primär Gedächtnisstörungen, Störungen des visuell-räumlichen Denkens und der Sprache. Des Weiteren kommen Apraxie, visuelle Agnosie sowie unspezifische Einschränkungen der Aufmerksamkeit, des Arbeitsgedächtnisses und des Auffassungsvermögens dazu (Balsis et al. 2005, Bozzola et al. 1992). Im späteren Stadium der AD kommt es bei den meisten Betroffenen zu verschiedenen psychiatrischen Begleitsymptomen in Form von Depressionen, Wahnsymptomen und Ängsten, auch begleitet von Unruhe, Agitiertheit und Schlafstörungen (Mirakhor et al. 2004). Im Endstadium der Krankheit, für die sich in der Literatur häufig eine mittlere Krankheitsdauer von 6 Jahren findet (Abb.2), sind die Patienten bettlägerig und zeigen zunehmende Schwäche und Abmagerung. Letztendlich führen meist Pneumonien, aufsteigende Harnwegsinfekte oder andere unspezifische Ursachen zum Tode (Wallesch 2005).

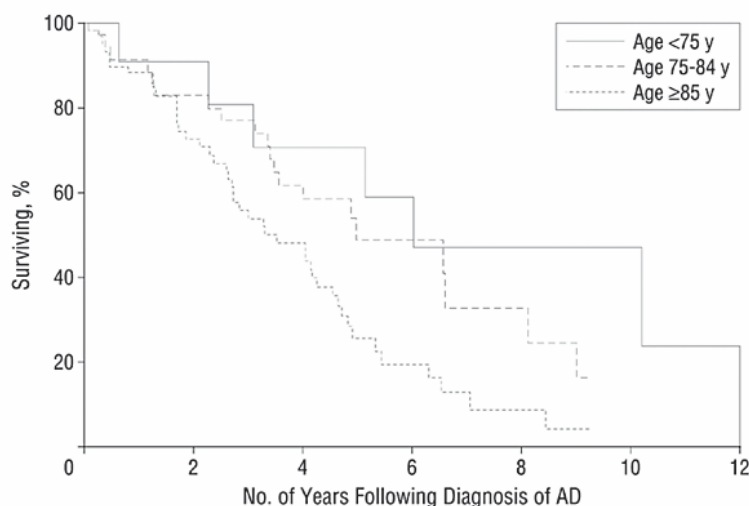


Abbildung 2: Kaplan-Meier-Kurve, Überlebenszeit nach Diagnosestellung AD (Brookmeyer, Archives of Neurology 2002)

Die autosomal-dominant vererbte familiäre Form der AD ist sowohl im klinischen Erscheinungsbild als auch im histopathologischen Bild von der nichtfamiliären Form, mit Ausnahme des wesentlich früheren Erkrankungsalters, kaum bis gar nicht zu unterscheiden.

Für die Diagnosestellung ist die Fremdanamnese unverzichtbar, da die Eigenanamnese des Patienten in der Regel sehr unergiebig ist, weil Defizite meist verdrängt und vergessen werden.

Aus psychischem und neurologischem Befund, Verlaufsbeobachtung, apparativen Zusatzuntersuchungen wie CT, MRT oder PET zur Ausschlussdiagnostik anderer Erkrankungen und einer limitierten Labordiagnostik mit Blut- und Liquorproben kann dann die Diagnose einer wahrscheinlichen Alzheimer Demenz gestellt werden. Übliche diagnostische Kriterien in Studien zur AD sind die NINCDS-ADRDA-Kriterien (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association). Für den klinischen Gebrauch kommen häufig Tests wie der Minimal Status Test oder die CERAD-Testserie (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) zum Einsatz. Endgültig kann die Erkrankung allerdings erst post mortem durch eine histologische Untersuchung des Gehirns bestätigt werden (Wallesch 2005).

2.1.1 Pathophysiologie

Bei Alzheimer Erkrankten finden sich Defizite verschiedener Neurotransmittersysteme (Acetylcholin, Serotonin, Noradrenalin, Somatostatin) (Palmer 1996), wobei vor allem die zunehmende Reduktion der Cholinacetyltransferase-Aktivität mit dem Schweregrad der Demenz in Zusammenhang gebracht wird (Bierer et al. 1995).

Die Regionen mit dem größten Verlust (80% Verminderung) an cholinergem Innervation finden sich im Temporallappen. Die langen cholinergen Fasersysteme, die vom Nucleus basalis Meynert zu kortikalen Regionen ziehen und die Bahn vom medialen Septumkern zum Hippokampus sind am stärksten betroffen von degenerativen Veränderungen der cholinergen und monoaminergen Neurotransmittersysteme (Abb.3). Einen geringen Verlust cholinergem Neurone (< 40%) weisen der ventrale Gyrus cinguli, der primär motorische, primär somatosensorische sowie der primär visuelle Kortex auf (Geula und Mesulam 1996, Schaeffer und Gattaz 2008).

Die Beziehung zwischen cholinergem Faserverlust und kognitiven Defiziten bei Alzheimer Patienten, sowie die Beobachtung, dass der Verlust kortikaler cholinergem Innervation schwerwiegender ist und früher auftritt als der Verlust anderer kortikaler Neurotransmittersysteme, sind die Grundlage für die derzeit empfohlene Therapie mit reversiblen Cholinesteraseinhibitoren (Lleó et al. 2006, Schaeffer und Gattaz 2008).

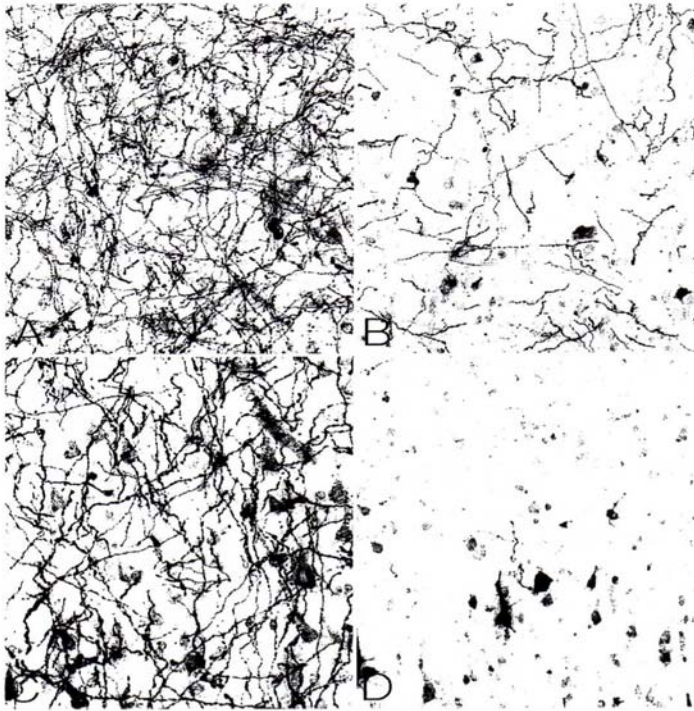


Abbildung 3: Beispiel kortikaler Gebiete mit der stärksten Verminderung an cholinergen Fasern. Entorhinaler Kortex (A und B) und Assoziations-Hörkortex (C und D) in von AD betroffenen Gehirnen zeigen einen deutlichen Verlust ihrer AChE-positiven Fasern verglichen mit denselben Regionen in normalem Gehirn (A und C). Vergrößerung 262-fach (Geula und Mesulam, Cerebral Cortex 1996).

2.1.2 Histopathologie

Intrazerebrale Ablagerungen von amyloiden Plaques und Neurofibrillen (Tangles) (Abb.4), sowie eine neuronale Atrophie stellen die wesentlichen histopathologischen Merkmale der AD dar. Regelmäßig finden sich extrazelluläre Amyloidfibrillen, ähnlichen denen der neuritischen Plaques, auch in zerebralen und meningealen Blutgefäßen. Im Folgenden soll auf die wichtigsten histopathologischen Veränderungen detailliert eingegangen werden.

2.1.2.1 Neurofibrillen

Neurofibrillen, relativ unlösliche intrazelluläre Aggregate, setzen sich aus gepaarten helikalen Filamenten (PHF) zusammen (Kidd 1963), die aus hyperphosphoryliertem Microtubuli-assoziiertem Protein Tau bestehen. Bei AD lagert Tau Protein im Übermaß Phosphate an, wodurch es seine eigentliche Funktion, Mikrotubuli zu stabilisieren und zusammensetzen, nicht mehr erfüllt. Dies führt einerseits zur Destabilisierung dieser

wichtigen Zytoskelettkomponente des intrazellulären Transportsystems und andererseits zur Bildung der unlöslichen PHF (Grundke-Iqbal et al. 1968, Clark und Karlawish 2003, Schindowski et al. 2008).

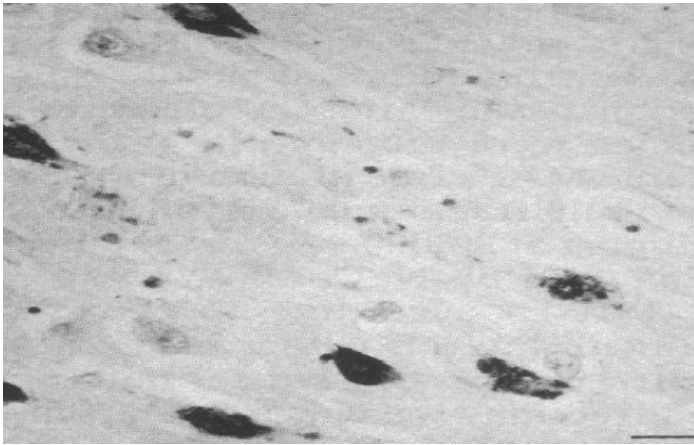


Abbildung 4: Immunzytochemie, zahlreiche Neurofibrillenbündel in einem Schnitt durch den Hippocampus eines AD-Gehirns (Kosik, Proc. Natl. Acad Sci. USA 1986)

Die Hauptrolle in der Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins schreibt man einer Dysregulation der Cyclin-abhängigen Kinase 5 (Cdk5) zu. Diese wird für eine korrekte Entwicklung des ZNS benötigt. Zu ihrer Aktivierung bedarf es ihrer Untereinheit p35. Eine verkürzte Form des p35, das p25, das unter anderem durch oxidativen Stress entsteht und bei AD Patienten in Neuronen akkumuliert, aktiviert die Cdk5 und ändert ihre zelluläre Lage sowie ihre Substratspezifität. Der p25/Cdk5-Komplex führt dann zur Tau-Hyperphosphorylierung, was die Voraussetzung zur PHF-Bildung darstellt (Patrick et al. 1999).

2.1.2.2 Amyloidplaques

Neuritische Plaques sind kugelförmige Läsionen mit einem Durchmesser von 10-200µm, die üblicherweise einen extrazellulären zentralen Kern aus unlöslichem Amyloid (Abb.5) und zahlreichen zerfallenen Neuriten enthalten. Der Amyloidkern ist umgeben von reaktiven Astrozyten, Mikroglia und dystrophen Neuritenfortsätzen (Müller-Hill und Beyreuther 1989). Plaques mit wenig umschriebenen Amyloidansammlungen werden als diffuse Plaques bezeichnet (Abb.6) und diejenigen, die nur aus Amyloid bestehen, als Amyloidplaques (Dickson 1997).

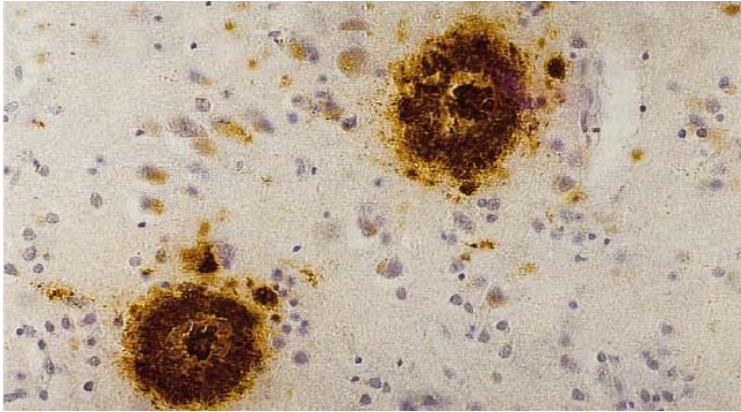


Abbildung 5: Klassische Plaques mit zentralem Amyloidkern und Corona aus diffusen A β -Ablagerungen (,cored plaques'), (Thal und Braak, Pathologe 2005)

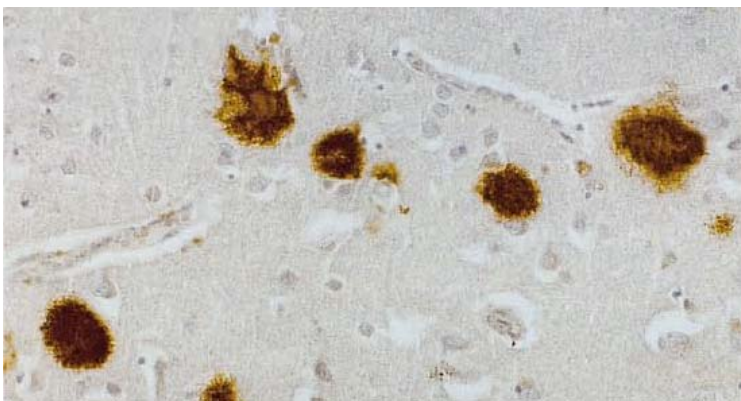


Abbildung 6: Diffuse Plaques ohne Amyloidkern (Thal und Braak, Pathologe 2005)

Das fibrilläre Amyloid Beta (A β) besteht meist aus 40 (A β 40) oder 42 Aminosäuren (A β 42).

Während bei der proteolytischen Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) durch die α -Sekretase lösliche Produkte entstehen, die keine Amyloid-Plaques bilden können, produzieren die β - und γ -Sekretase hingegen A β 40 und A β 42 (Schindowski et al. 2008). APP-Mutationen steigern die A β -Produktion oder führen zu einem erhöhten Anteil an A β 42. Neuritische Plaques enthalten sowohl A β 40 als auch A β 42, wohingegen diffuse Plaques fast ausschließlich A β 42 enthalten (Selkoe 2001). Diffuse Plaques finden sich auch im normal alternden Gehirn. Daher ist es umstritten, ob die diffusen Plaques Vorläufer der neuritischen Plaques sind, oder ob es sich um pathogenetisch unterschiedliche Prozesse handelt (Knopman et al. 2003). Die Akkumulation von A β führt zu entzündlichen ZNS-Veränderungen, zur Bildung von Neurofibrillenbündel sowie zu Transmitterverlust (Götz et al. 2001).

2.2 Pathogenese

Die für die AD-Symptomatik relevanten Gene sind das Amyloid-Precursor-Protein-Gen auf Chromosom 21, das Presenilin1-Gen auf Chromosom 14 sowie das Presenilin2-Gen auf Chromosom 1.

Die Überexpression eines strukturell normalen APP führt durch eine erhöhte Genzahl bei Trisomie 21 schon früh zu einer Demenz, die die histopathologischen Kriterien einer AD erfüllt, mit Bildung von amyloiden Plaques schon vor dem 20. Lebensjahr (Tokuda et al. 1997). Missense Mutationen im APP-Gen im Bereich der α -, β - und γ -Sekretasen, die bei der familiären AD sehr selten vorkommen, führen zu vermehrter Bildung von A β 40 und A β 42 und dadurch zu verstärkter Plaquebildung (Scheuner et al. 1996, Shen und Kelleher 2007). Missense Mutationen in den Presenilin Genen sind die häufigste Ursache der autosomal-dominant vererbten AD, die sich bei den Betroffenen meist im Alter zwischen 40 und 50, teilweise aber auch schon mit 30 Jahren zeigt. Preseniline sind wichtige Bestandteile der γ -Sekretase (Shen und Kelleher 2007). Die Vererbung von Presenilinmutationen führt zu einer 1,5- bis 3-fachen Steigerung an A β 42-enthaltenden Plaques verglichen mit der Plaquemenge bei sporadischen AD-Fällen (Lemere et al. 1996). Bei der viel häufigeren spät beginnenden sporadischen AD konnten keine APP-Mutationen nachgewiesen werden, allerdings zeigte sich, dass die Vererbung des ϵ 4-Allels des Apolipoproteins E im Zusammenhang steht mit einer signifikant höheren A β -Plaquemenge als bei Patienten ohne ApoE4. Hierbei stellt das ApoE4-Allel ein Suszeptibilitätsgen dar, welches das Risiko für die Erkrankung erhöht (Schmechel et al. 1993, Mahley et al. 2006).

2.2.1 Neuroinflammation bei der Alzheimer Erkrankung und das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie des Körpers dar, das im Weiteren durch die Produktion von kostimulierenden Molekülen und Zytokinen auch das erworbene Immunsystem aktiviert. Es beinhaltet die Phagozytose, wodurch Pathogene und Gewebeabbaureste entfernt werden können, was aber auch zu Gewebszerstörung, durch schädliche Entzündungseffekte führen kann.

Immunhistochemische Studien zeigen, dass Makrophagen, und in geringem Umfang CD8-T-Zellen und Neutrophile das AD-Gehirn infiltrieren. Zusätzlich zu Mikroglia infiltrieren

auch Makrophagen A β -Plaques, aber im Gegensatz zu Makrophagen im Gehirn Gesunder, sind die Makrophagen im Gehirn von Alzheimer-Patienten nicht in ausreichendem Maße in der Lage A β zu phagozytieren und somit zu entfernen, wodurch es zu weiterer Akkumulation von A β kommen kann (Fiala et al. 2005).

Post mortem durchgeführte immunhistochemische Untersuchungen an von AD betroffenen Gehirnen, zeigen in den von der Erkrankung betroffenen Regionen ein Bild chronischer Entzündung, das mit der AD-Pathogenese in direkten Zusammenhang gebracht wird. Es zeigte sich, dass die Entzündungsreaktion nicht durch das erworbene, sondern durch das phylogenetisch viel ältere „Angeborene Immunsystem“ bewirkt wird.

Die bei AD durch geschädigte Neurone sowie unlösliches A β und Neurofibrillenbündel ausgelöste chronische Entzündung, als Folge einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems, führt im umliegenden Gewebe zu weiteren Schäden, was besondere Bedeutung hat, da geschädigte Neurone nicht mehr ersetzt werden können (McGeer PL und McGeer EG 2002, Fiala et al. 2007).

Während diffuse Plaques keine neuritischen oder glialen Veränderungen aufweisen, werden die reifen amyloiden Plaques von dystrophen Neuriten und aktivierten Mikroglia umgeben. Allerdings führt nicht jede A β -Form zur Neuroinflammation sondern nur das amyloidogene aggregierte A β , wohingegen amorphes A β nicht neurotoxisch ist (Lorenzo und Yankner 1994, Eikelboom et al. 2006).

Mikroglia reagieren als erste Gehirnzellen auf die Schädigung durch A β (Abb.7) und produzieren Akute-Phase-Proteine, Prostaglandine, Komplementkomponenten sowie Zytokine und Chemokine (Blasko und Grubeck-Loebenstein 2003).

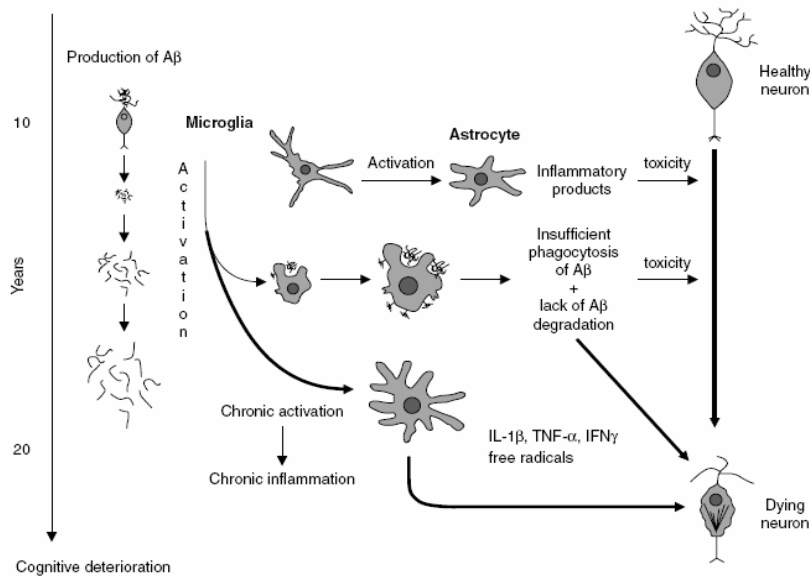


Abbildung 7: Schematische Darstellung der beim Fortschreiten der AD-Pathologie mitwirkenden chronischen Entzündung. Mikroglia und Astrozyten werden durch A β aktiviert, werden aber von den Peptidmengen überladen. Dadurch nehmen die A β -Mengen im Gehirn kontinuierlich zu. Dies führt zu vermindertem A β -Abbau und A β -Ablagerungen. Fibrilläres A β führt zur Produktion freier Radikale sowie zu hohen Zytokin-Konzentrationen. Diese Produkte können toxisch sein und den Neuronenverlust beschleunigen (Blasko, Drugs Aging 2003).

AD ist eine Erkrankung, bei der das Komplementsystem nicht durch das Mitwirken von Antikörpern aktiviert wird. Stattdessen hat sich A β als starker Komplementaktivator erwiesen (Rogers et al. 1992). Ebenso wirken die Pentraxine Amyloid P (AP) und C-Reaktives Protein (CRP), die in den von AD betroffenen Gehirnregionen verstärkt von Neuronen ausgeschüttet werden, als Komplementaktivatoren (Yasojima et al. 2000). Die Schutzmechanismen C1-Inhibitor und Protektin CD59, die das gesunde Gehirn vor übermäßiger Komplementaktivierung schützen, sind bei AD im Gegensatz zu den Komplementproteinen nicht hochreguliert, sodass keine kompensierende Komplementhemmung besteht, mit der Folge, dass Neuriten durch die verstärkte Wirkung des Komplementsystems zerstört werden (Yasojima et al. 1999).

Chronisch aktivierte Mikroglia und Astrozyten können mittels der Freisetzung von toxischen Substanzen wie Stickoxid, inflammatorischen Zytokinen, proteolytischen Enzymen oder Komplementfaktoren, die umliegenden Neurone zerstören. Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6, die im Frühstadium der AD-Erkrankung noch neuroprotektive Wirkung entfalten, wirken, wenn sie ständig in hohen Konzentrationen produziert werden, direkt zytotoxisch und können zudem noch die β -APP-Synthese stimulieren (Jeohn et al. 1998).

2.3 Makrophagen

Monozyten stammen von CD34⁺ myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark, zirkulieren im Blut und wandern in periphere Gewebe ein, wo sie zu verschiedenen Typen von Gewebsmakrophagen reifen (Hume 2006). Hierzu gehören Langerhans Zellen der Epidermis, Osteoklasten, Alveolarmakrophagen, Milzmakrophagen, Kupffer Zellen der Leber und Makrophagen des ZNS mit Mikroglia, perivaskulären Makrophagen, meningealen Makrophagen und Choroid-Plexus-Makrophagen (Gordon und Taylor 2005). Bei durch Gewebeschäden oder Infektionen ausgelöster Entzündung kommt es zur Aktivierung von Gewebsmakrophagen, die daraufhin die Produktion von Chemokinen, Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren, sowie die Anlockung weiterer Monozyten steigern.

Im Zusammenhang mit der spezifischen Immunantwort zeigen mononukleäre Phagozyten, verstärkt durch das Zytokinmilieu, spezialisierte und polarisierte funktionelle Eigenschaften. So werden polarisierte Makrophagen unterteilt in M1- und M2-Zellen (Martinez et al. 2006) (Abb.8).

Die klassisch polarisierten M1-Makrophagen werden durch IFN γ allein oder zusammen mit LPS oder Zytokinen wie TNF und GM-CSF aktiviert. Sie produzieren Effektormoleküle wie reaktiven Sauerstoff und Stickstoffzwischenprodukte, sowie Entzündungszytokine, darunter IL-1 β , TNF und IL-6, und wirken in Th1-Antworten mit.

Der Name M2-Makrophage steht für verschiedene Formen nicht-klassisch aktivierter Makrophagen, die aus Zellkontakt mit IL-4 oder IL-13, mit Immunkomplexen, IL-10, IL-21, Aktivin A, Glukokortikoiden oder Hormonen resultieren (Abb.9). M2-Zellen wirken in Th2-Antworten mit und fördern die Einkapselung und das Abtöten von Parasiten. Sie sind in Tumoren vorhanden, fördern deren Progression und haben immunregulierende Funktionen (Mantovani et al. 2007).

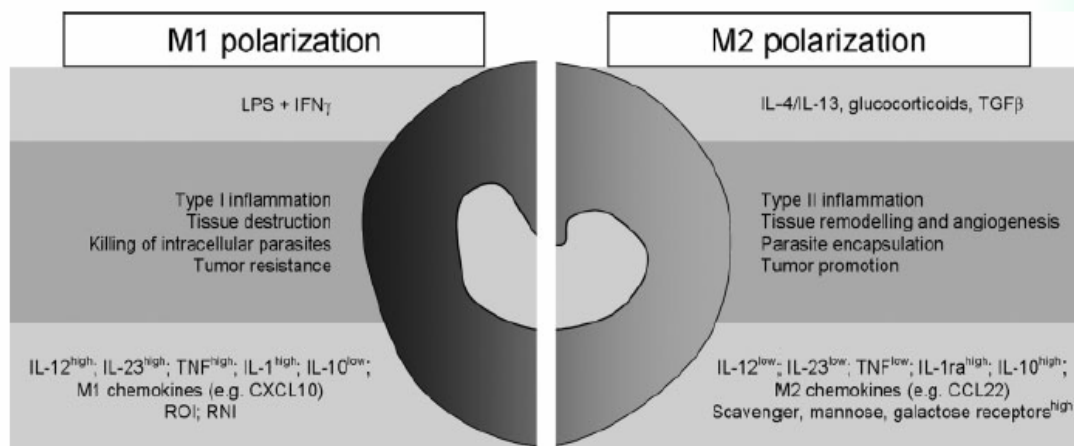


Abbildung 8:

Eine vereinfachte Übersicht der Mediatoren, die die klassische (M1) und alternative (M2) Makrophagenpolarisation aktivieren. ROI (reactive oxygen intermediate), RNI: reactive nitrogen intermediate (Mantovani et al., European Journal of Immunology 2007).

Periphere Blutmonozyten zeigen sich als morphologisch sehr heterogen bezüglich ihrer Größe, Granularität und Kernmorphologie. Nach ihrer unterschiedlichen Expression von CD14, das ein Teil des Rezeptors für Lipopolysaccharide darstellt, und CD16, werden Monozyten in zwei Klassen eingeteilt: CD14^{hi}CD16⁻ Monozyten, die oft als ‚klassische Monozyten‘ bezeichnet werden und CD14⁺CD16⁺ Monozyten, die reifen Gewebemakrophagen ähnlich sind. Es wurde nachgewiesen, dass Monozyten sich entweder zu Makrophagen oder zu dendritischen Zellen weiterentwickeln können. Das Ausmaß, in dem Monozyten zu Makrophagen oder dendritischen Zellen differenzieren, hängt sowohl von ihrem Phänotyp als auch von Faktoren wie CX₃C-Chemokin-Ligand 1 oder CX_C-Chemokin-Ligand 12 ab (Gordon und Taylor 2005). Eine weitere Monozyten-Unterklasse existiert in Form von CD14⁺CD16⁺CD64⁺ Zellen. Diese stellen entweder einen immunregulatorischen Monozytenphänotyp dar oder einen zwischen Monozyten und dendritischen Zellen liegenden Phänotyp (Grage-Griebenow et al. 2001).

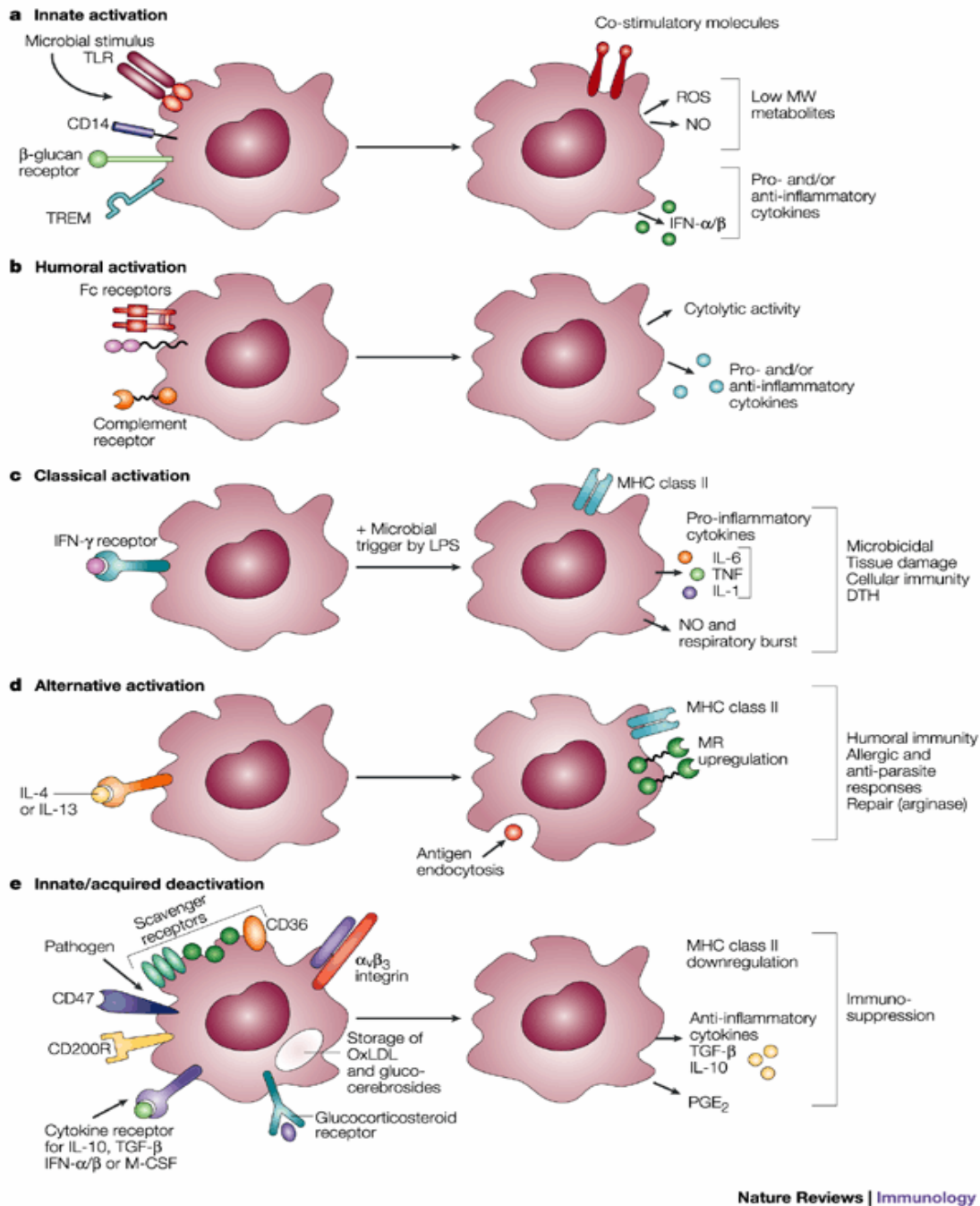


Abbildung 9: Angeborene und erworbene Immunaktivierung von Makrophagen (Gordon, Nature Jan 2003 Vol 3)

- a) Mikrobielle Stimuli werden durch PRRs, wie Toll-like-Rezeptoren (TLRs), CD14/LPS-bindendes Protein und einigen nicht-opsonierenden Rezeptoren erkannt. Diese Stimuli induzieren die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IFN α - β , Reactive oxygen species (ROS) und Stickoxid (NO), der eine regulierte antiinflammatorische Antwort folgt.
- b) Humorale Aktivierung und Phagozytose werden über Fc- und Komplementrezeptoren vermittelt
- c) Die klassische Aktivierung erfolgt durch IFN γ , gefolgt von einem mikrobiellen Trigger (LPS).
- d) Alternative Aktivierung erfolgt durch IL-4 und IL-13
- e) Die Aufnahme apoptotischer Zellen oder lysosomaler Ansammlungen führt zu antiinflammatorischen Antworten. Zellaktivität wird moduliert durch das Zusammenspiel von T-Zellen, Fibroblasten und Matrix durch eine Reihe von Rezeptoren. Zytokine und Glukokortikosteroide sind potente Aktivierungsmodulatoren. DTH: delayed-type hypersensitivity, M-CSF: macrophage colony-stimulating factor, MW: molecular weight, OxLDL: oxidized low-density lipoprotein, PGE₂: prostaglandin E₂, TGF- β : transforming growth factor- β , TNF: tumour-necrosis factor, TREM: triggering receptor expressed on myeloid cells

2.4 Mikroglia

Mikrogliazellen wurden 1899 von Nissl entdeckt, der sie damals als ‚Stäbchenzellen‘ benannte und sie für reaktive Neuroglia hielt. Im Detail beschrieben wurden sie aber erst von del Rio Hortega 1927, der sie von Astrozyten und Oligodendrozyten unterschied.

Mikrogliazellen stellen im erwachsenen Gehirn circa 10% aller Gliazellen. Monozyten oder ihre Vorläuferzellen aus der Monozyten-Makrophagen-Linie wandern während der Embryonal-, Fetal- oder Postnatalphase in das sich entwickelnde Gehirn ein und wandeln sich dort zu Mikrogliazellen. Dabei können sie zu Makrophagen-ähnlichen Zellen differenzieren, wobei sie CD11b exprimieren, oder sie differenzieren unter CD11c-Expression zu Zellen ähnlich den dendritischen Zellen (Dheen 2007). Hierfür werden sie mit dem Makrophagen-Kolonie-Stimulationsfaktor (M-CSF) oder Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulationsfaktor (GM-CSF) stimuliert (Monsonogo und Weiner 2003). Mikroglia sind in allen Gehirnregionen vorhanden, sowohl in der weißen, als auch in der grauen Substanz. In ihrem Ruhezustand zeigen sich Mikroglia als Zellen mit kleinem Zellkörper und einer Vielzahl von Fortsätzen. Unter pathologischen Bedingungen werden die Mikrogliazellen aktiviert, wobei sie eine abgerundete Form annehmen und ihre Fortsätze in den Zellkörper zurückziehen (Chew et al. 2006).

Mikroglia sind phagozytierende Zellen, die die Hauptentzündungsantwort im ZNS bewirken. Durch Infektion, Entzündung oder auch Fremdmaterial wie A β werden die Mikrogliazellen unter Mitwirken von Zytokinen, darunter IL-1 β , IL-4 und IFN γ , aktiviert, wobei sie ihre Gestalt, ihre Genexpressionsmuster sowie ihre Zelloberflächencharakteristika ändern (Duke et al. 2004). Histopathologische Beobachtungen zeigen reaktive Mikroglia im AD Gehirn als phagozytierende Zellen, die die Plaques angreifen und gleichzeitig hoch zytotoxische Substanzen, darunter proinflammatorische Zytokine, reaktive Sauerstoffverbindungen, Proteinase und Komplementproteine, freisetzen. Mikroglia dienen aber auch als Antigen-präsentierende Zellen für zum Beispiel A β -reaktive T-Zellen (Abb.10).

Reaktive Mikroglia, die sich im AD-Gehirn in der Umgebung von Plaques und Neurofibrillenbündeln finden, spielen eine wichtige Rolle für den Beginn und die Ausbreitung der Immunreaktion sowie als Entzündungsmediator im Entzündungsprozess bei AD (Dheen et al. 2007, Monsonogo und Weiner 2003).

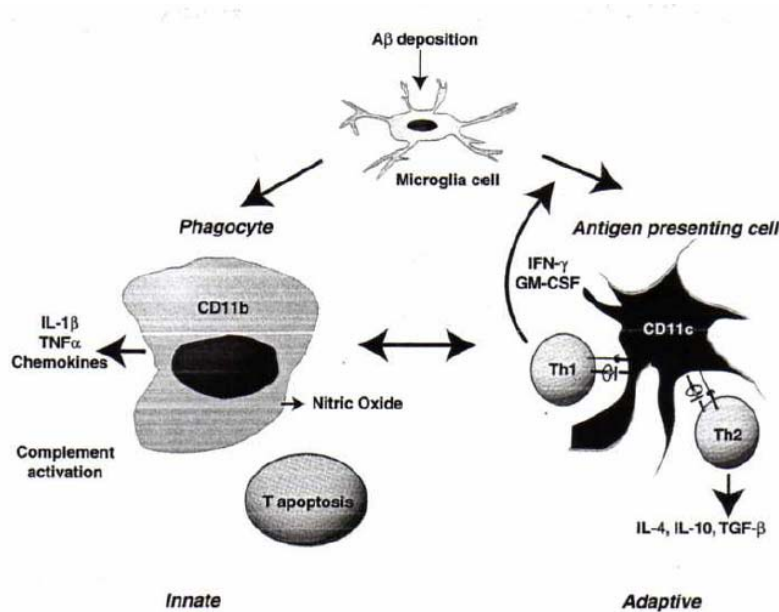


Abbildung 10:

Mikroglia-Aktivierung bei der Alzheimer Erkrankung. Als Antwort auf Aβ-Ablagerungen bei AD werden Mikrogliazellen aktiviert und differenzieren zu phagozytierenden Zellen (CD11b+), die eine proinflammatorische Umgebung schaffen und IL-1β, TNF-γ, NO, freie Radikale und Chemokine freisetzen und das Komplementsystem aktivieren. Alternativ differenzieren die Mikrogliazellen zu APCs, die induziert werden durch GM-CSF und/oder IFNγ, die von Mikroglia, Astrozyten, T-Zellen und Makrophagen, die das ZNS infiltrieren, ausgeschüttet werden. Daraus resultierend differenzieren Mikrogliazellen zu Zellen ähnlich den dendritischen Zellen (CD11c+) und können dann als APCs für Th1- und Th2-Zellen dienen (Monsonogo und Weiner, Science 2003).

2.5 Interferone

Interferone sind eine Familie von multifunktionellen Zytokinen mit antiviralen, antiproliferativen und immunmodulierenden Eigenschaften. Sie werden unterteilt in Typ I und Typ II Interferone.

2.5.1 Typ I Interferone

Typ I Interferone sind pleiotrope Zytokine, die über die Wirkung auf myeloide Zellen, T-Zellen, B-Zellen und Chemotaxis die Immunantwort beeinflussen sowie T- und NK-Zellen dazu anregen zytotoxische Aktivität zu entwickeln. Die Typ I Interferone schließen mindestens 13 Subtypen, darunter mehrere IFNα-Subtypen, einen IFNβ-Subtyp, IFNδ, IFNε, IFNκ, IFNω und IFNτ, ein. Diese Subtypen sind alle strukturell ähnlich und binden an einen gemeinsamen Rezeptor, den Typ I IFN Rezeptor (IFNAR) (Swann et al. 2007). In

geringer Menge werden Typ I Interferone von fast allen Zellen produziert. Die Hauptproduzenten von IFN α und IFN ω sind allerdings hämatopoetische Zellen, während Fibroblasten die Hauptproduzenten für IFN β sind. Virale Infektionen sind der klassische Stimulus für IFN α - und IFN β -Expression.

Im Zuge der Immunantwort führt die Stimulierung von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) über verschiedene TLRs zur Expression verschiedener Effektormoleküle, einschließlich IFN α/β (Schroder et al. 2004). IFN α/β sind die Schlüsselzytokine, die nach einer Infektion mit einem Virus produziert werden und leiten sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunantwort ein. Indem sie die Expression kostimulierender Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 verstärken, führen Typ I Interferone zur Reifung dendritischer Zellen (DCs). Des Weiteren induzieren sie die Antigenpräsentation per MHC Klasse I, antigenspezifische CD8⁺ T-Zellantworten sowie Chemokine, die die Beordnung von Lymphozyten und Monozyten zu Entzündungsorten bewirken. Typ I Interferone sorgen auch für die Hochregulierung hunderter von Effektormolekülen, die direkten Einfluss auf die Proteinsynthese, das Zellwachstum und das Überleben der Zelle im Prozess der Viruselimination haben (Kawai und Akira 2006, Colonna 2007, Honda et al. 2005).

IFN α/β spielen ebenfalls eine Rolle in dem Prozess des Immunsystems, der Tumorentwicklung und dem Tumorwachstum entgegenzuwirken. IFN α kann direkt die Proliferation von normalen Zellen und Tumorzellen hemmen, und übt weitere direkte Effekte auf Tumorzellen aus, wie die Herunterregulierung von Onkogenexpression, Induktion von Tumorsuppressorgenen und Steigerung der MHC Klasse I- Expression (Dunn et al. 2005).

Die Wirkung von IFN α bei AD Patienten wurde schon 2000 untersucht. Hier zeigte sich, dass intrathekal verabreichtes IFN α zu einer Stabilisierung der neurologischen Zeichen führte. Intramuskulär verabreichtes IFN α zeigte später keine Verbesserung in klinischer und neuropsychologischer Hinsicht, jedoch zeigte sich eine Verbesserung der allgemeinen Lebensqualität und reduzierte Mortalität (Cabrera-Gomez und Lopez-Saura 2000). Milner und Campbell wiesen 2003 nach, dass IFN α Mikrogliaaktivierung fördern kann. Dies könnte zu verstärkter Phagozytoseaktivität führen, was zur A β Clearance beitragen könnte. IFN α findet derzeit Anwendung in der Behandlung einiger Malignome, darunter die Haarzelleleukämie, Melanome, Nierenzellkarzinome und Kaposi-Sarkome, außerdem wird es eingesetzt zur Behandlung der Hepatitis C (Feld und Hoofnagle 2005, Weigand 2007).

IFN β wird wegen seiner antiinflammatorischen Eigenschaften zur Behandlung der Multiplen Sklerose eingesetzt (Kim et al. 2002).

2.5.2 Typ II Interferone

IFN γ ist das einzige Typ II Interferon. Es unterscheidet sich strukturell von den Typ I Interferonen, bindet an einen anderen Rezeptor und ist auf einem separaten Chromosomlocus kodiert. Es wird von Zellen des angeborenen Immunsystems gebildet, darunter NK-Zellen und APCs (Schroder et al. 2004).

Sowohl Typ I als auch Typ II Interferone beeinflussen den Klasse I Antigen-Präsentationsweg dahingehend, dass sie die Anzahl und Vielfalt an Peptiden, die auf der Zelloberfläche zusammen mit MHC Klasse I präsentiert werden, erhöhen. Durch die Hochregulierung der MHC I Moleküle durch IFN γ erhöht sich das Potential der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen fremde Peptide zu erkennen und fördert so die zellvermittelte Immunantwort.

Den Klasse II Antigen-Präsentationsweg hingegen kann von den Interferonen nur IFN γ antreiben und somit die peptidspezifische CD4⁺ T-Zell-Aktivierung fördern. Des Weiteren kann IFN γ die Klasse II MHC Moleküle hoch regulieren, sowohl in Zellen, die MHC Klasse II exprimieren, wie B-Zellen, dendritische Zellen und Zellen der Monozyten-Makrophagen-Reihe, als auch in Zellen, die diese Gene nicht exprimieren (Whitmire 2007, Takaoka und Yanai 2006).

IFN γ ist ein Hauptprodukt der Th1-Zellen und lenkt die Immunantwort in die Richtung des Th1-Phänotyps. IFN γ ist der wichtigste Makrophagenaktivator. Makrophagenstimulation mit IFN γ führt zu direkten Mechanismen, die mikrobiellem Wachstum und Tumorwachstum entgegenwirken, sowie zur Hochregulierung von Prozessierungs- und Präsentationswegen von Antigenen. IFN γ steuert die Anlockung der Leukozyten sowie Wachstum, Reifung und Differenzierung vieler Zelltypen, neben der Verstärkung NK-Zell-Aktivität und regulierenden B-Zell-Funktionen wie Immunglobulinproduktion und -klassenwechsel (Schroder et al. 2006).

2.6 Therapie der Alzheimer Erkrankung

2.6.1 Aktuelle medikamentöse Therapieansätze

Der Hypothese des cholinergen Defizits bei der AD folgend, werden Acetylcholinesterasehemmer (AChEIs) eingesetzt, um die Menge des zur Verfügung stehenden Acetylcholins (ACh) zu erhöhen. Dazu gehören Tacrin, Donepezil, Rivastigmin und Galantamin. Tacrin wird heute kaum mehr benutzt wegen seiner starken Hepatotoxizität, die die anderen drei Substanzen nicht aufweisen. ACh wird von cholinergen Neuronen durch die Cholinacetyltransferase produziert, in Vesikeln gespeichert und bei Depolarisation in den synaptischen Spalt abgegeben (Abb.11). ACh wirkt auf muskarinische und nikotinerge Rezeptoren an prä- und postsynaptischen Zellen. Die Acetylcholinesterase (AChE) hydrolysiert ACh zu Acetat und Cholin. Durch Hemmung der AChE wird die cholinerge Neurotransmission verstärkt, da die ACh-Moleküle länger im synaptischen Spalt verbleiben (Lleó et al. 2006).

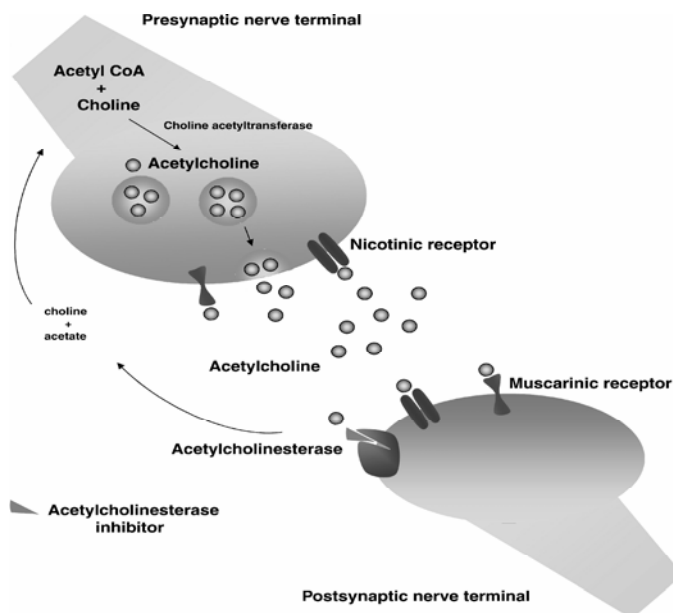


Abbildung 11:

Neurotransmission (Lleó, Greenberg, Growdon 2006)

Die Verbesserungen der kognitiven Fähigkeiten und Verbesserung auf globaler Ebene, die sich unter AChEI-Gabe zeigen, sind gering, aber dennoch statistisch signifikant gegenüber Plazebovergleichsgruppen (Egert 2007).

Glutamat ist ein wichtiger exzitatorischer Neurotransmitter im Gehirn. Memantine ist ein selektiver Antagonist des L-Glutamat-Rezeptors vom N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Typ mit niedriger Affinität. Überstimulation des NMDA-Rezeptors, die sich bei neurodegenerativen und vaskulären Krankheitsprozessen findet, hat exzitotoxische Wirkung aufgrund hoher Kalziumkonzentrationen, was zu neuronaler Dysfunktion und Zelltod führt. Memantine blockiert den NMDA-Rezeptor und verhindert den Kalziumeinstrom bei hoher neuronaler Aktivität, lässt allerdings bei geringen neuronalen Stimulationsraten den Kalziumkanal offen für Neurotransmission. Seit August 2002 ist Memantine zur Behandlung der mittelschweren bis schweren AD zugelassen.

Nitro-Memantine stellt die zweite Generation der Glutamatmodulatoren dar, die verstärkte neuroprotektive Wirkung aufweisen (Lipton 2004).

Des Weiteren wurden Vitamin E, Ginkgo Biloba, Selegilin, Östrogen, Piracetam, Nimodipin Pyritinol, Dihydroergotoxin, Nicergolin, Vincamin und Naftidrofuryl als therapeutische Ansätze bei AD versucht.

Durch diese Substanzen soll auf verschiedenen Ebenen der Zellmetabolismus verbessert und eine Zellschädigung durch endo- und exogene Noxen abgewendet werden. Die Wirkung ist allerdings teilweise umstritten, teilweise widerlegt, beziehungsweise nicht durch Studien belegt. Von der Östrogengabe wird abgeraten.

Gegen Agitiertheit und Psychosen der AD-Patienten werden Neuroleptika, vorzugsweise atypische Neuroleptika, eingesetzt.

Bei Depressionen kommen trizyklische Antidepressiva, MAO-B-Hemmer und selektive Serotoninwiederaufnahmehemmer (SSRI) zum Einsatz (Doody et al. 2001, Samanta et al. 2006, Lleó 2006).

2.6.2 Experimentelle Therapieansätze

Derzeit gibt es keine kausale Therapie der AD. Die Überlegungen zur Therapie gehen seit Langem in die Richtung, die A β -Bildung zu unterbinden oder das schon gebildete A β verstärkt abzubauen.

1999 immunisierten Schenk et al. PDAPP transgene Alzheimer Mäuse mit A β 42, darunter eine Gruppe sechs Wochen alter Mäuse, die noch keine AD typische Neuropathologie bot, und eine Gruppe elf Monate alter Mäuse, bei der schon A β -Ablagerungen und weiterfolgende neuropathologische Veränderungen vorlagen. Die aktive Immunisierung

der jungen Mäuse verhinderte die Ausbildung der A β -Plaques, der neuritischen Dystrophie und der Astrogliosis. Die Immunisierung der älteren Mäuse reduzierte das Ausmaß und Fortschreiten der für die AD typischen Neuropathologie (Schenk et al. 1999). Basierend auf diesen vorklinischen Versuchen wurde eine randomisierte, doppelblinde, plazebokontrollierte Multizenterstudie Phase II durchgeführt um die Effizienz der aktiven A β 42-Immunisierung am Menschen zu testen. Diese Studie musste allerdings abgebrochen werden, da 6% der Patienten, die die Immunisierung erhalten hatten, eine Meningoenzephalitis mit teils letalem Ausgang entwickelten (Gilman 2005).

Eine Impfung mit kleinen A β -Epitopen, könnte die unerwünschte Neuroinflammation vermeiden, zum Beispiel indem die T-Zell-Aktivierung unterdrückt wird.

Passive Immunisierung führte bei behandelten Mäusen einerseits zu einer deutlichen kognitiven Besserung, allerdings zeigten sich gleichzeitig auch verstärkt eine zerebrale Amyloidangiopathie und Blutungen im Gehirn, sodass bei weiteren Studien größte Vorsicht geboten sein muss (Wilcock 2004).

Auch passive Impfung mit Antikörpern ohne Fc-Abschnitt, die eine Überaktivierung der Mikroglia und somit eine Abschwächung der Autoantikörper-getriggerten Neuroinflammation verhindern soll, zeigte in transgenen Mäusen eine Abnahme der A β -Ablagerungen in verschiedenen Gehirnregionen sowie eine Verbesserung der kognitiven Funktionen, und könnte somit für die Immuntherapie der AD geeignet sein (Solomon 2006).

A β -Sequestrierung, das heißt A β -Abbau in der Peripherie durch Antikörper, stellt einen alternativen Mechanismus der A β -Reduktion durch Antikörper dar. Als optimale Antikörper für Mikroglia-Aktivierung haben sich N-terminal-spezifische Antikörper gezeigt. C-terminal-spezifische Antikörper hingegen können an Plasma-A β binden, damit Einfluss auf die A β -Dynamik zwischen ZNS und Peripherie nehmen und somit A β -Ansammlungen im Gehirn reduzieren. Dies könnte möglicherweise ein sichererer Weg zur antiamyloiden Immuntherapie sein (Gray 2007).

Um das bestehende A β abzubauen wurde nach Möglichkeiten gesucht die β - und γ -Sekretase zu hemmen (Abb.12). Da die γ -Sekretase allerdings neben A β noch andere Substrate wie zum Beispiel den Notch-Rezeptor hat, führt die Hemmung dieses Enzyms nicht nur zur erwünschten A β -Reduzierung, sondern auch zu einer Reihe unerwünschter Nebenwirkungen an Thymus, Gastrointestinaltrakt und Milz, sodass die γ -Sekretase-

Hemmung zum jetzigen Zeitpunkt nicht zur Therapie eingesetzt werden kann (Wong 2004, Lleó 2006).

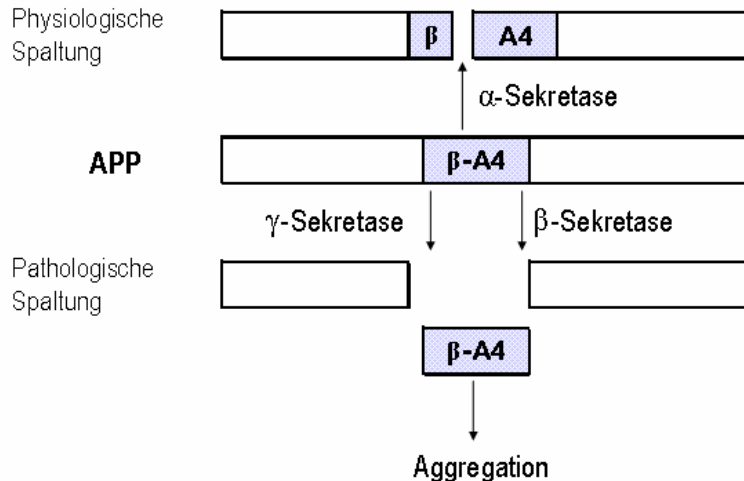


Abbildung 12: Physiologische und pathologische Spaltung des APP (Demenzen, Referenz-Reihe Neurologie, Wallesch)

Da die β -Sekretaseaktivität im menschlichen Gehirn mit dem Alter zunimmt, ist die Hemmung dieses Enzyms ein interessanter Ansatz in der Therapie der AD (Fukumoto et al. 2004). Hussain et al. zeigten jetzt in APP-transgenen Mäusen, dass die pharmakologische Hemmung der β -Sekretase, auch BACE-1, Asp2 oder Memapsin2 genannt, durch GSK 188909, einen selektiven nicht-peptidischen BACE1-Hemmer, zu deutlich verminderter β -Spaltung von APP und somit zu einer signifikanten Reduktion von A β 40 und A β 42 führt. Ob sich diese Erkenntnis umsetzen lässt, zur Anwendung bei AD-Patienten, ist noch nicht ausreichend erforscht (Hussain et al. 2007).

Zur Behandlung der Neuroinflammation mit aktivierter Mikroglia als treibende Kraft, die ein Charakteristikum der AD ist, wird seit Langem versucht, durch die Gabe von NSAIDs dem Entzündungsgeschehen entgegenzuwirken. Zwei Studien an AD-Patienten, in denen Indometacin und Diclofenac verabreicht wurden, haben sich als viel versprechend erwiesen, während eine Studie, bei der den Patienten subtherapeutische Dosen von Naproxen verabreicht wurden, keine Erfolge zeigte. Da sich selektive COX-2-Hemmer als ineffektiv erwiesen haben, sollten weitere klinische Versuche mit COX-1-Hemmern in voller therapeutischer Dosierung durchgeführt werden (McGeer 2007).

2.7 Ziel dieser Arbeit

Die wesentlichen histopathophysiologischen Merkmale der Alzheimer Erkrankung stellen senile Plaques aus A β und Neurofibrillenbündeln dar. Diese führen zu einem progressiven Neuronenverlust, was sich im Bild der Demenz mit eingeschränkten kognitiven Fähigkeiten und fehlender Orientierung äußert.

Die Stimulierung der Phagozytose von A β durch Mikroglia wird gegenwärtig als interessante therapeutische Strategie angesehen, die A β -Last zu reduzieren.

Mikrogliaaktivierung, zum Beispiel durch Interferon, könnte die mikrogliale Phagozytosekapazität steigern und somit die A β -Clearance erhöhen.

Interferone sind eine Familie multifunktionaler Zytokine, die antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Eigenschaften haben.

Ziel dieser Arbeit ist zu erforschen, welche Effekte IFN α , IFN β und IFN γ auf die Phagozytosekapazität von Monozyten und Mikrogliazellen haben.

In dieser Arbeit sollen daher folgende Fragen experimentell geklärt werden:

- 1) Steigert IFN α die Phagozytosekapazität von Monozyten/Mikrogliazellen?
- 2) Steigert IFN β die Phagozytosekapazität von Monozyten/Mikrogliazellen?
- 3) Steigert IFN γ die Phagozytosekapazität von Monozyten/Mikrogliazellen?

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Bezeichnung	Firma
Autoklav (Systec V150)	Systec, Wettenberg
Brutschrank (NUAIRE™-IR-Autoflow®)	Integra Biosciences, Fernwald
Durchflusszytometer (FACSCalibur™)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Durchlichtmikroskop (Axiovert 40 CFL)	Carl Zeiss, Göttingen
Laborzentrifuge (Centrifuge 5810R)	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank (HERA Safe)	Kendro, Langenselbold
Vakuumpumpe (KNF Laboport®)	KNF Neuberger, Freiburg
Vortex (Genie 2)	Scientific Industries, Bohemia, N.Y., USA
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Hannover

Tabelle 1

3.2 Materialien

Bezeichnung	Firma
15 ml Falcon	Sarstedt, Nümbrecht
50 ml Falcon	Sarstedt, Nümbrecht
Accu-Jet® Pipettierhelfer	Brand, Wertheim
Einkanalpipette Eppendorf Research	VWR™, Darmstadt
Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
FACS Röhrchen	BD Falcon™, Franklin Lakes, USA
Multiadapter lang	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße 0,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovette 9ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Glasflaschen	Fisher Scientific, Schwerte
Sterilfilter (FP 30/0,2 CA-S)	Whatman, Dassel
Tro-Venose® , Perfusion Set	Troge Medical, Hamburg

Zählkammer (Blaubrand [®] Neubauer improved)	Brand, Wertheim
Zellkulturflasche (BD 353810)	BD Falcon TM, Franklin Lakes, USA
Zellkulturplatte (Multiwell [™] 24 Well)	BD Falcon TM, Franklin Lakes, USA
Zellkulturplatte (Multiwell [™] 48 Well)	BD Falcon TM, Franklin Lakes, USA

Tabelle 2**3.3 Substanzen**

Bezeichnung	Firma
Amyloid Beta (A β 1-42)	Bachem, Weil am Rhein
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roswell Parc Memorial Institute Lösung (RPMI)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natriumphosphat (NaHPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Fetal calf serum (FCS)	PAA, Pasching-Linz, Österreich
Fetal calf serum (FCS)	PANTM, Biotech, Aidenbach
GlutaMAX [™]	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Histopaque [®] -1077	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Dulbecco`s Modified Eagles Medium (DMEM) High Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin (25% Trypsin-EDTA)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Antibiotic-Antimycotic	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
FluoSpheres [®] carboxylated modified microspheres (Beads)	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tabelle 3

3.4 Interferone

3.4.1 Humane Interferone

- Interferon α : Interferon Alpha-2A-Lösung, F. Hoffmann - La Roche, Basel, Schweiz
- Interferon β : Betaferon[®], Schering, Berlin
- Interferon γ : Recombinant Human IFN γ , R&D Systems, Minneapolis, USA

3.4.2 Maus-Interferone

- Interferon β : Recombinant Mouse IFN β , AbD Serotec, Oxford, UK
- Interferon γ : Recombinant Mouse IFN γ , R&D Systems, Minneapolis, USA

3.5 Antikörper

Anti-Humane Antikörper für die FACS-Färbung

- Anti-CD11c, PE-markiert, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
- Anti-CD45, PerCP-markiert, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
- Anti-HLA-DR, FITC-markiert, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

- Isotyp für CD11c-AK: Maus IgG2b-PE, Chemicon[®]International, Temecula, USA
- Isotyp für CD45-AK: Maus IgG1-PerCP, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
- Isotyp für HLA-DR-AK: Maus IgG2a-FITC, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

3.6 Lösungen

FACS-Puffer

1x PBS
+ 4% FCS
+ 0,4% NaN₃ 2,5 Molar

10x PBS

400g NaCl
+ 10g KCl
+ 71g Na₂HPO₄
+ 69g NaH₂PO₄ x 1H₂O
ad 5l H₂O dest.

3.7 Zellkulturmedien

Kulturmedium für humane primäre Blutmonozyten

Als Kulturmedium für humane Monozyten wurde RPMI mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 2% GlutaMAXTM verwendet.

RPMI ist ein speziell für humane Zellen entwickeltes Medium. Bei FCS, GlutaMAXTM und dem Dipeptid L-Alanyl-L-Glutamin, handelt es sich um für das Zellwachstum wichtige Bestandteile. Penicillin/Streptomycin dient zur Prophylaxe einer eventuellen Kontamination durch Bakterien.

Mikrogliakulturmedium

Als Kulturmedium für Mikroglia wurde DMEM verwendet, dem ebenfalls 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 2% GlutaMAXTM beigefügt wurden.

DMEM ist eine Mischung aus anorganischen Salzen, Aminosäuren, Vitaminen, Glucose und weiteren Bestandteilen, die der Zellernährung dienen.

Beide Medien wurden steril filtriert und bei 4°C gelagert. Bevor sie mit Zellen in Kontakt gebracht wurden, mussten sie im Wasserbad auf 37°C erwärmt werden.

3.8 Aufbau der Experimente

Ziel der Arbeit war es zu bestimmen, ob IFN α , IFN β und IFN γ die Phagozytosekapazität von Mikrogliazellen erhöhen. Da die Methode noch nicht etabliert war, sollten in Vorversuchen Monozyten mit den drei Interferonen behandelt werden, um erste Anhaltspunkte für das Phagozytoseverhalten phagozytischer Zellen unter Behandlung mit Interferonen zu bekommen. Als Phagozytosematerial wurde den Monozyten in jedem Versuch 1 μ l fluoreszierende Mikropartikel (Beads) geboten. In 54 Versuchen wurden humane Monozyten mit IFN α , IFN β und IFN γ der Konzentrationen 100 Units, 500 Units und 1000 Units für 2, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden behandelt und nach Inkubieren mit 1 μ l Beads, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markiert waren, wurden die phagozytierten Beads in der FACS-Analyse quantitativ bestimmt. Alle Versuche wurden dreimal durchgeführt.

Das ursprüngliche Vorhaben in einem Versuch die Monozyten durch den PE-markierten Anti-HLA-DR-Antikörper nachzuweisen und gleichzeitig die Monozyten mit FITC-markierten Beads zu füttern, konnte in dieser Form nicht durchgeführt werden, da die FITC-markierten Beads bei der FACS-Analyse so stark in den PE-Bereich überstrahlten, dass dies nicht durch Kompensation unterbunden werden konnte. So zeigten sich die Zellen, denen nur Beads, aber kein Anti-HLA-DR-Antikörper zugefügt worden war, ebenfalls positiv im PE-Kanal.

Deshalb wurde in separaten Versuchen mit den Antikörpern Anti-CD11c-PE, Anti-CD45-PerCP und Anti-HLA-DR-FITC nachgewiesen, dass es sich, nach dem unten erläuterten Verfahren zur Gewinnung humaner Monozyten, bei 80% der Zellen um Monozyten handelt. Dieses Verfahren wurde für alle Versuche angewandt.

Erst danach wurde mit der eigentlichen IFN-Behandlung und Analyse der Phagozytosekapazität der Monozyten begonnen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden murine Mikroglia aus Kulturen mit IFN β der Konzentration 500 U/ml und IFN γ 100 pg/ml für 2, 24, 48 und 72 Stunden behandelt. Als Phagozytosematerial wurden einem Teil der Zellen 1 μ l FITC-markierte fluoreszierende Mikropartikel (Beads) und einem anderen Teil 1 μ l CY3-markiertes Amyloid β geboten, die wieder in der FACS-Analyse quantitativ bestimmt wurden. Alle Versuche wurden dreimal durchgeführt.

Die Dosierungen und Inkubationszeiten wurden in Anlehnung an die aktuelle Literatur sowie laborinterne Erfahrungen mit Interferonbehandlung von Zellen gewählt.

3.9 Zellen

Gewinnung humaner primärer Blutmonozyten (PBMC)

Zur Gewinnung der Monozyten wird ein Blutgradient mit Histopaque®-1077 erstellt. Hierfür werden zuerst 3 ml Histopaque®-1077 in ein 15 ml Falcon® Röhrchen gefüllt und langsam 3 ml Blut darüber geschichtet. Die Phasen dürfen sich dabei nicht miteinander vermischen. Der Gradient wird dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur und 400 x g ohne Bremse zentrifugiert. Die PBMC befinden sich nach dem Zentrifugieren an der Grenzfläche zwischen dem Histopaque® und dem Plasma. Erythrozyten und Granulozyten bilden am Boden des Falcons ein Pellet (Abb.13).

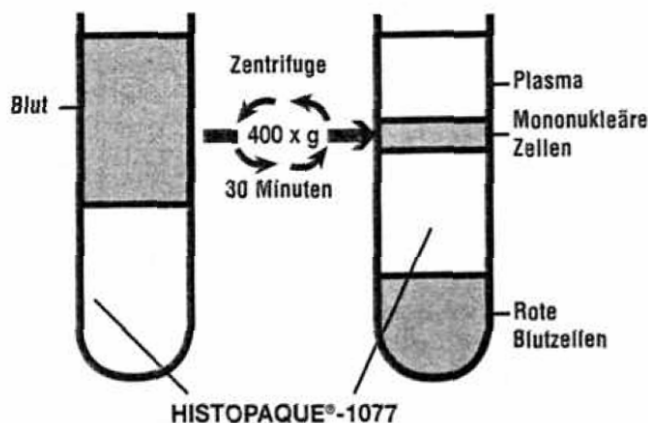


Abbildung 13: Blutgradient mit Histopaque®-1077. Erythrozyten und Granulozyten bilden am Boden ein Pellet. Mononukleäre Zellen sammeln sich zwischen Plasma und Histopaque®-1077 (Produktbeschreibung Histopaque®-1077, Sigma Aldrich Inc., St. Louis MO USA).

Die abgesammelten Zellen werden dann bei 4°C und 250 x g 20 Minuten lang zentrifugiert und danach mit 10 ml RPMI-Medium gewaschen. Nach weiterem Zentrifugieren wird das Zellpellet in RPMI-Medium resuspendiert und zu je 10 ml auf Zellkulturflaschen verteilt, die zuvor mit Poly-L-Lysin (PLL) der Konzentration 100 µg/ml beschichtet worden sind. Nach zwei Stunden muss ein Mediumwechsel erfolgen.

Bevor mit den Zellen weitergearbeitet werden kann, müssen sie mindestens für sechs Stunden bei 37°C, 10% CO₂-Sättigung und 70% Luftfeuchtigkeit inkubiert werden. Während dieser Zeit reduzieren die Monozyten ihren Aktivierungsgrad und werden am Boden der Zellkulturflaschen adhären.

Mikrogliapräparation

Die Mikroglia stammen von C57BL/6-N Mäusen. Zur Präparation eignen sich Mäuse bis zum Alter von maximal 3 Tagen. Diese werden durch Dekapitation getötet. Mit einer sterilen Pinzette wird der Kopf fixiert, während mit einer zweiten zuerst die Kopfhaut abgelöst und dann die Kalotte gespalten wird. Das so frei präparierte Gehirn wird dann mit einem Löffel aus der Schädelhöhle gelöst und in eine mit HBSS gefüllte Petrischale gegeben. Unter mikroskopischer Sicht werden zuerst die Meningen abpräpariert, der Plexus entfernt und anschließend die Hirne unter einer sterilen Werkbank mit einer Pipette homogenisiert.

Die gewonnene Zellsuspension wird in der Zentrifuge bei RT und 250 x g für 10 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt worden ist, können die Zellen im DMEM-Medium resuspendiert und auf die Zellkulturflaschen verteilt werden, die davor mit 100µg/ml PLL in 10ml PBS für mindestens 3 Stunden beschichtet worden sind. Pro Flasche können die Zellen von 2 bis 3 Gehirnen in 12 ml Kulturmedium ausgesät werden. Der erste Mediumwechsel erfolgt am Tag nach der Präparation, wodurch tote Zellen und Myelin entfernt werden. Nach etwa einer Woche, bildet sich ein Astrozytent Teppich, auf dem die Mikrogliazellen wachsen. Die erste Zellernte ist zwei Wochen nach der Ausplattierung zum ersten Mal möglich. Danach kann einmal wöchentlich abgeerntet werden.

Wie bereits in einer früheren Studie von Ishii et al. 2000 nachgewiesen wurde, handelt es sich bei 95% der dann vorliegenden Zellen um Mikroglia.

Die Mikroglia werden in Zellkulturflaschen mit jeweils 12 ml DMEM-Medium im Brutschrank bei 37°C, 70% Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 10% kultiviert. Das Medium wird einmal pro Woche gewechselt.

3.10 Zellstimulation

3.10.1 Stimulation humaner primärer Blutmonozyten (PBMC)

Nachdem die Monozyten mindestens 6 Stunden im Brutschrank inkubiert haben, können sie weiterverarbeitet werden. Zuerst werden die Kulturflaschen leicht geschüttelt und das Medium mit den so abgelösten Zellen wird verworfen. Auf diese Art werden andere Blutzellen als Monozyten entfernt, da nur die Monozyten am Flaschenboden adhären sind. Danach werden 5ml Trypsin in jede Flasche gegeben, und diese für 5 bis 10 min im Brutschrank inkubiert, um die adhärenen Monozyten vom Flaschenboden zu lösen. Durch Schütteln der Flaschen lassen sich die Monozyten dann auch gut vom Boden lösen. Die Zellen werden in ein Falcon[®]-Tube abpipettiert und bei 4°C und 250 x g zentrifugiert. Nach dem Absaugen wird das Zellpellet noch einmal mit 10 ml RPMI-Medium gewaschen. Danach werden die Zellen in 1 ml RPMI-Medium resuspendiert, und mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Das Trypanblau wird sowohl dazu genutzt eine 1:10-Verdünnung herzustellen, als auch um die lebenden Zellen zu identifizieren und zu zählen.

Die Zellsuspension wird auf 100.000 Zellen pro 100 µl verdünnt, dann werden jeweils 200 µl dieser Verdünnung in eine Vertiefung einer 48-Wellplatte pipettiert.

Nachdem die Zellen wieder über Nacht im Brutschrank inkubiert haben, kann die Stimulation mit Interferon beginnen.

Die Stimulation erfolgt mit IFN α , IFN β und IFN γ der Konzentrationen 100 U/ml, 500 U/ml und 1000 U/ml für 2, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden in einem Gesamtvolumen von 300 µl pro Vertiefung (Tab.4).

Röhrchen 1	Röhrchen 2	Röhrchen 3	Röhrchen 4	Röhrchen 5
IFN α + Beads	IFN β + Beads	IFN γ + Beads	Nur Beads	Nur Monozyten

Tabelle 4: Darstellung der FACS-Untersuchungsansätze für einen Monozytenversuch

Nach Ende der Inkubationszeit werden die Zellen abpipettiert und in FACS-Röhrchen gegeben. Durch 100 µl Trypsin pro Vertiefung lösen sich die Zellen besser ab. Nach dem ersten Zentrifugieren werden die Monozyten mit 1 ml RPMI-Medium gewaschen und noch einmal zentrifugiert. Dann werden nach dem Abnehmen des Überstandes die Röhrchen mit

1 ml RPMI-Medium aufgefüllt. Jetzt wird in die Röhren 1, 2, 3 und 4 je 1 μ l fluoreszierende Mikropartikel (Beads) pipettiert. Die Zellen werden dann wieder 1 Stunde im Brutschrank inkubiert. Danach werden die Zellen abzentrifugiert und noch dreimal mit je 300 μ l FACS-Puffer gewaschen.

Falls die FACS-Analyse nicht mehr am gleichen Tag stattfindet, werden die Zellen mit 1% PFA konserviert. Dadurch werden die Zellen bis zu einer Woche lang konserviert.

3.10.2 Mikroglia stimulation

Zum Ablösen der Mikroglia vom Astrozytenteppich werden die Zellkulturflaschen geschwenkt. Dadurch werden nur die Mikroglia, nicht aber die Astrozyten abgelöst. Die nun frei schwimmenden Zellen werden in einem Falcon[®]-Tube gesammelt und in diesem bei RT und 250 x g für 8 min zentrifugiert. Die Zellkulturflaschen werden wieder mit 12 ml frischem DMEM-Medium befüllt.

Das Zellpellet wird in 1 ml DMEM-Medium resuspendiert und mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellsuspension wird auf 100.000 Zellen pro 1000 μ l verdünnt, dann werden jeweils 1000 μ l dieser Verdünnung in eine Vertiefung einer 24-Wellplatte pipettiert (Tab.5).

Danach werden die Zellen für mindestens 6 Stunden oder über Nacht in den Inkubator gestellt.

Stimuliert werden die Zellen mit IFN β der Konzentration 500 U/ml und IFN α der Konzentration 100 ng/ml für 2, 24, 48 und 72 Stunden.

Röhrchen 1	Röhrchen 2	Röhrchen 3	Röhrchen 4	Röhrchen 5	Röhrchen 6	Röhrchen 7
IFN β + A β	IFN β + Beads	IFN γ + A β	IFN γ + Beads	Nur A β	Nur Beads	Nur Mikroglia

Tabelle 5: Darstellung der FACS-Untersuchungsansätze für einen Mikrogliaversuch

Nach Ende der Inkubationszeit werden die Zellen mit Trypsin vom Boden der Wells abgelöst und in die FACS-Röhren pipettiert. Nach einmaligem Waschen mit DMEM-Medium, wird das Pellet in den A β -Röhren in 100 μ l Medium resuspendiert und das Pellet in den Beads- und Zell-Röhren in 1 ml Medium.

Nun wird in die Beads-Röhrchen 1 μl fluoreszierende Mikropartikel (Beads) pipettiert und für 1 Stunde im Brutschrank inkubiert. In die A β -Röhrchen wird 1 μl A β pipettiert. Diese Röhrchen werden für 2,5 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubationszeit werden die Zellen dreimal mit 300 μl FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen können mit 1% PFA für höchstens eine Woche konserviert werden.

3.11 Durchflusszytometrie (Fluorescence-Activated-Cell-Sorting - FACS)

FACS-Messung

Die FACS-Messungen wurden an einem FACSCaliburTM von BectonDickinson (Franklin Lakes, USA) durchgeführt. Als Arbeitsprogramm wurde CellQuestPro[®] verwendet.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Zelleigenschaften in einer Suspension. Hierfür werden tausende Zellen in einem laminaren Probenstrom innerhalb kürzester Zeit einzeln an einem Laser vorbeigeleitet und charakterisiert. Im Gegensatz zu einem Fluoreszenzmikroskop erlaubt ein Durchflusszytometer die gleichzeitige Messung von Fluoreszenz- und Streulichtsignalen an einzelnen Zellen. Vor der Messung werden die Zellen mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt (Abb.14). Ein Laserstrahl erfasst, analysiert und klassifiziert die Zelle, wobei Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile die Lichtstreuung beeinflussen. Die Daten werden dann in Punktwolkendiagrammen (Dot Plots) und Histogrammen dargestellt.

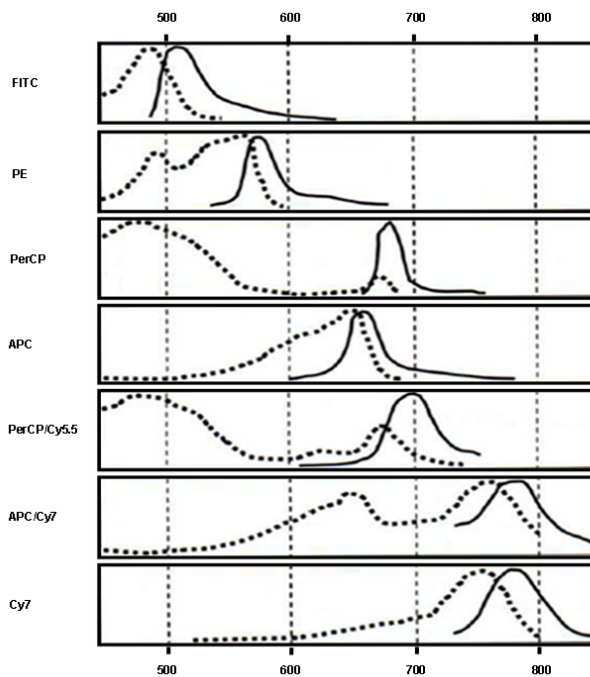


Abbildung 14

Absorptions- (gestrichelte Linien) und Emissionsspektren (durchgezogene Linien) verschiedener Fluorochrome. (Der Experimentator - Immunologie, Luttmann).

Vor der Datenaufnahme wird eine FACS-Matrix erstellt, in der dann gearbeitet werden kann, außerdem wird die elektronische Geräteeinstellung für die Proben optimiert. Das Gerät wird so eingestellt, dass die interessierenden Zellpopulationen in den Diagrammen erscheinen. Wenn Proben mit zwei oder mehr Fluorochromen gefärbt sind, ermöglicht die Kompensation die Korrektur spektraler Überlappung. Sind die Einstellungen so angepasst, dass die nur mit Fluoreszenz-1 markierten Zellen im Dot Plot nur im Fluoreszenz-1 positiven Bereich erscheinen, jedoch nicht im Fluoreszenz-2 Bereich, und gleichzeitig die nur mit Fluoreszenz-2 markierten Zellen nur im Fluoreszenz-2 positiven Bereich erscheinen, jedoch nicht im Fluoreszenz-1 Bereich, dann ist die Kompensation korrekt eingestellt (Abb.15).

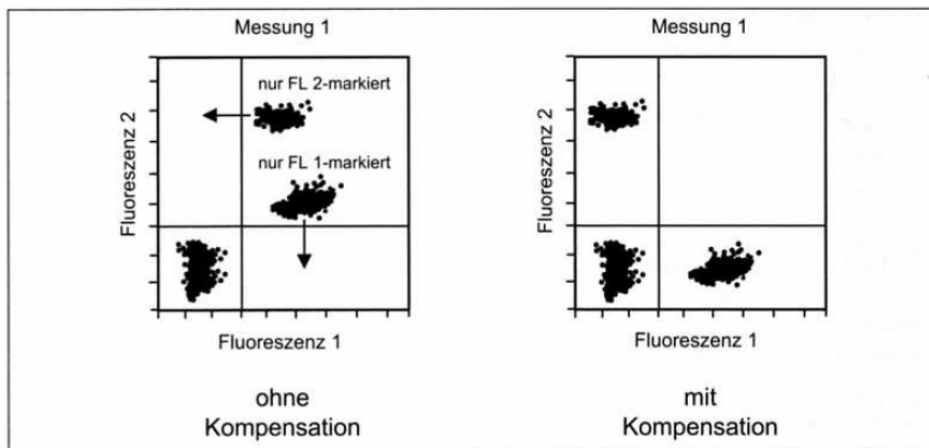


Abbildung 15

Kompensation. Unkompensiert zeigen in einem FL1 / FL2 – Dot Plot auch einfach markierte Zellpopulationen Fluoreszenzsignale in benachbarten Fluoreszenzbereichen. FL1-markierte Zellen zeigen eine gewisse FL2-Fluoreszenz, FL2-markierte Zellen einen Anteil an FL1-Fluoreszenz. Die Kompensation bewirkt, dass diese einfach gefärbten Populationen nur noch durch ihren entsprechenden Fluoreszenzdetektor registriert werden. Zellen, die keinerlei Fluoreszenz zeigen, befinden sich im linken unteren Abschnitt des Dot Plots. (Der Experimentator-Immunologie, Luttmann).

Jetzt kann mit dem Messen der Proben begonnen werden. Die Einstellungen dürfen ab diesem Zeitpunkt nicht mehr verändert werden. Die Zahlenwerte der einzelnen Messungen lassen sich in der Histogrammstatistik darstellen.

3.12 Statistische Auswertung

Zur graphischen Darstellung und Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen wurde Microsoft® Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA) verwendet.

Für die statistische Auswertung der Zellstimulationen wurde die univariate Varianzanalyse (ANOVA) angewandt. Als Statistikprogramm diente SPSS, Version 14.

In der univariaten Varianzanalyse (ANOVA), die alle Einfluss nehmenden Parameter gleichzeitig in die statistische Analyse mit einbezieht, ist die Anzahl der phagozytierenden Zellen als Zielvariable gesetzt. Die Einflussvariablen sind IFN α , IFN β und IFN γ , die Inkubationszeit, sowie bei den Mikrogliaversuchen A β und Beads als Phagozytosematerial. Es wurde nicht der unverbundene t-Test, sondern die univariate Varianzanalyse (ANOVA) zur statistischen Auswertung verwendet, da der Stichprobenumfang mit n=3 für den t-Test zu gering ist.

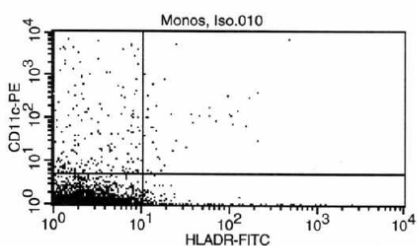
4 Ergebnisse

4.1 Monozytennachweis

Zur Identifikation der Monozyten, wurden die Zellen mit den Antikörpern Anti-CD11c, Anti-CD45 und Anti-HLA-DR gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch erfasst.

4.1.1 Isotypkontrollfärbung der Monozyten

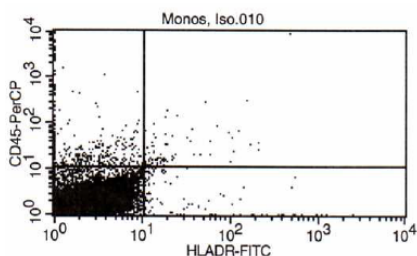
Die Monozyten werden mit den farbmarkierten Isotypkontrollen der drei Rezeptorantikörper unspezifisch gefärbt. Für die Darstellung in Punktwolkendiagrammen werden die einzelnen Fluoreszenzen jeweils gegeneinander aufgetragen. Die Einstellungen bei der FACS-Analyse (Abb.16) werden dabei so gewählt, dass die Mehrzahl der Ereignisse in den unteren linken Quadranten fällt. Die Quadrantenstatistik zeigt unter ‚LL (Lower Left) - % Total‘, dass sich etwa 98% der Isotypkontrollzellen im linken unteren Quadranten finden. Somit ist die Voreinstellung korrekt erfolgt und es sind durch die Antikörper keine Verfälschungen der Fluoreszenzmessungen zu erwarten.



Quadrant Statistics

File: Monos, Iso.010 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: Monos, Iso Acquisition Date: 09-Oct-06
 Gate: No Gate Gated Events: 50000
 Total Events: 50000 X Parameter: HLADR-FITC (Log)
 Y Parameter: CD11c-PE (Log) Quad Location: 10, 5

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	840	1.68	1.68	1.60
UR	43	0.09	0.09	58.75
LL	48960	97.92	97.92	1.99
LR	157	0.31	0.31	88.66



Quadrant Statistics

File: Monos, Iso.010 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: Monos, Iso Acquisition Date: 09-Oct-06
 Gate: No Gate Gated Events: 50000
 Total Events: 50000 X Parameter: HLADR-FITC (Lc)
 Y Parameter: CD45-PerCP (Log) Quad Location: 11, 11

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	357	0.71	0.71	3.18
UR	77	0.15	0.15	40.61
LL	49449	98.90	98.90	1.98
LR	117	0.23	0.23	113.29

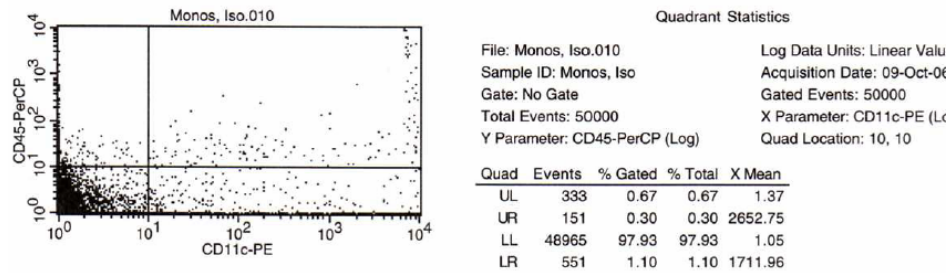


Abbildung 16

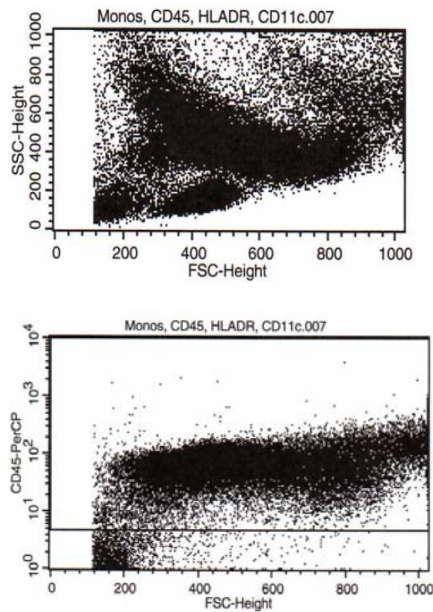
Dotplots der Isotypkontrollen für Anti-CD11c, Anti-CD45 und Anti-HLA-DR. Die linke Seite zeigt die Dotplots der FACS-Analyse, die rechte Seite die statistische Auswertung durch das Analyseprogramm CellQuestPro®. Die Quadrantenstatistik zeigt unter ‚LL (Lower Left) - % Total‘, dass sich in der Isotypkontrollfärbung etwa 98% der Zellen im linken unteren Quadranten befinden.

4.1.2 Spezifische Färbung der Monozyten

In Abb. 17 sind im ersten Punktwolkendiagramm alle gemessenen Zellen dargestellt, indem das Vorwärtsstreulicht gegen das Seitwärtsstreulicht aufgetragen ist. Im zweiten Punktwolkendiagramm ist der PerCP-markierte Anti-CD45-Antikörper gegen das Vorwärtsstreulicht aufgetragen. Der Anti-CD45-Antikörper wurde als allgemeiner Leukozytenmarker eingesetzt. Somit stellen alle CD45-positiven Zellen in diesem Dotplot Leukozyten dar. Im dritten Punktwolkendiagramm ist der PE-markierte CD11c-Antikörper gegen den FITC-markierten Anti-HLA-DR-Antikörper aufgetragen. Die CD11c-positive Population repräsentiert alle Monozyten, während die HLA-DR-positive Population die aktivierten Monozyten repräsentiert.

Um zu bestimmen, bei wie viel Prozent der vorliegenden Zellen es sich um Monozyten handelt, wurde Region 1 im Dotplot CD45/FSC um die CD45-positive Population gesetzt und dieses Feld dann in das Dotplot CD11c/HLA-DR übertragen. Bei der CD45-positiven Population handelt es sich um die gewonnenen Leukozyten. Wie aus der Regionsstatistik unter ‚R1 - % Gated‘ hervorgeht, stellen die Leukozyten fast 96% aller Zellen dar.

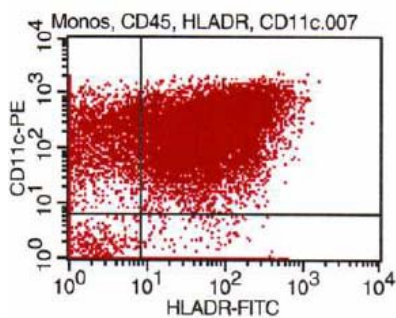
Aus der Quadrantenstatistik des dritten Dotplots ergibt sich, dass die in den oberen beiden Quadranten ‚Upper left‘ (UL) und ‚Upper right‘ (UR) liegenden CD11c-positiven Monozyten circa 70% der Leukozyten ausmachen. Da es sich bei 96% der vorliegenden Zellen um Leukozyten handelt, lässt sich daraus bestimmen, dass insgesamt ebenfalls circa 70% aller vorliegenden Zellen Monozyten sind. Die aktivierten Monozyten, die HLA-DR-positiv sind, machen etwa 26% aller Zellen aus, was sich aus der Statistik zu den Quadranten ‚Upper right‘ (UR) und ‚Lower right‘ (LR) ergibt.



Region Statistics

File: Monos, CD45, HLADR, CD11c.007
 Sample ID: Monos, CD45, HLADR, CD11c
 Gate: No Gate
 Total Events: 50000
 Y Parameter: CD45-PerCP (Log)
 Log Data Units: Linear Values
 Acquisition Date: 31-Jul-06
 Gated Events: 50000
 X Parameter: FSC-Height (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean
R1	47830	95.66	95.66	562.50



Quadrant Statistics

File: Monos, CD45, HLADR, CD11c.007
 Sample ID: Monos, CD45, HLADR, CD11c
 Gate: G1
 Total Events: 50000
 Y Parameter: CD11c-PE (Log)
 Log Data Units: Linear Values
 Acquisition Date: 31-Jul-06
 Gated Events: 47830
 X Parameter: HLADR-FITC (Log)
 Quad Location: 8, 6

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	22273	46.57	44.55	1.26
UR	11929	24.94	23.86	109.75
LL	12969	27.11	25.94	1.14
LR	659	1.38	1.32	80.55

Abbildung 17

FACS-Analyse der Dreifachfärbung für Anti-HLA-DR, Anti-CD11c und Anti-CD45. Die drei Abbildungen zeigen Dotplots der FACS-Analyse. Die oberste Abbildung zeigt alle gemessenen Zellen, wobei das Vorwärtsstreulicht gegen das Seitwärtsstreulicht aufgetragen ist. Die mittlere Abbildung zeigt ein Dotplot bei dem CD45 gegen das Vorwärtsstreulicht aufgetragen ist. Die CD45-positiven Zellen stellen die Leukozyten dar und machen circa 96% aller Zellen aus. Sie sind als Region 1 erfasst und wurden auf die untere Abbildung übertragen.

Die untere Abbildung zeigt ein Dotplot bei dem CD11c gegen HLA-DR aufgetragen ist. Die beiden oberen Quadranten ‚Upper left‘ (UL) und ‚Upper right‘ (UR) enthalten die CD11c-positiven Zellen. Sie machen circa 70% aller gemessenen Zellen aus. Die beiden Quadranten ‚Upper right‘ (UR) und ‚Lower right‘ (LR) enthalten die HLA-DR-positiven Zellen, die circa 26% aller gemessenen Zellen ausmachen.

4.2 Monozyten-Stimulationsversuche

Um Aufschluss darüber zu bekommen ob IFN α , IFN β oder IFN γ die Phagozytosekapazität von mononukleären Zellen steigern können, wurden zuerst die Monozyten mit den Interferonen der Konzentrationen 100 U/ml, 500 U/ml und 1000 U/ml für 2, 6, 12, 24, 48 und 72h inkubiert. Danach wurden den Monozyten als Phagozytosematerial FITC-markierte Fluoreszenzpartikel (Beads) geboten. Die Zellen wurden für 60 min mit 1 μ l Beads inkubiert. Die Phagozytosekapazität wurde durch die FACS-Analyse quantifiziert, indem die phagozytierten FITC-markierten Beads erfasst wurden.

4.2.1 Stimulation humaner Monozyten mit IFN α 100 U/ml, IFN α 500 U/ml und IFN α 1000 U/ml

Abb.18 stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytosekapazität der mit IFN α 100 U/ml behandelten Monozyten dar. Abb.19 stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytosekapazität der mit IFN α 500 U/ml und Abb.20 die Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytosekapazität der mit IFN α 1000 U/ml behandelten Monozyten dar. Verglichen wird die Phagozytosekapazität der mit IFN α behandelten Monozyten mit der Phagozytosekapazität unbehandelter Monozyten. Der Mittelwert der Phagozytosekapazität unbehandelter Zellen wurde als 100% gesetzt. Dieser ist in der Graphik nicht dargestellt. Die Mittelwerte der Phagozytosekapazität der mit IFN α behandelten Monozyten sind ebenfalls in Prozentwerten und werden graphisch dargestellt.

Bei den Stimulationsversuchen mit IFN α 100 U/ml (Abb.18) zeigt sich nach zwei- und sechsständiger Inkubation ein Phagozytoseanstieg auf 103% und 124% der Phagozytosekapazität unbehandelter Zellen. Nach 12h zeigt sich ein leichter Abfall auf 90% und nach 24h und 48h Inkubationsdauer zeigt sich kein Unterschied mehr zu den unbehandelten Zellen. Somit lässt sich hier ein Trend zur Phagozytosesteigerung bei kurzer Inkubationszeit von 2h und 6h erkennen. Die Unterschiede in der Phagozytose zwischen unbehandelten und mit IFN α behandelten Monozyten sind jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$, ANOVA).

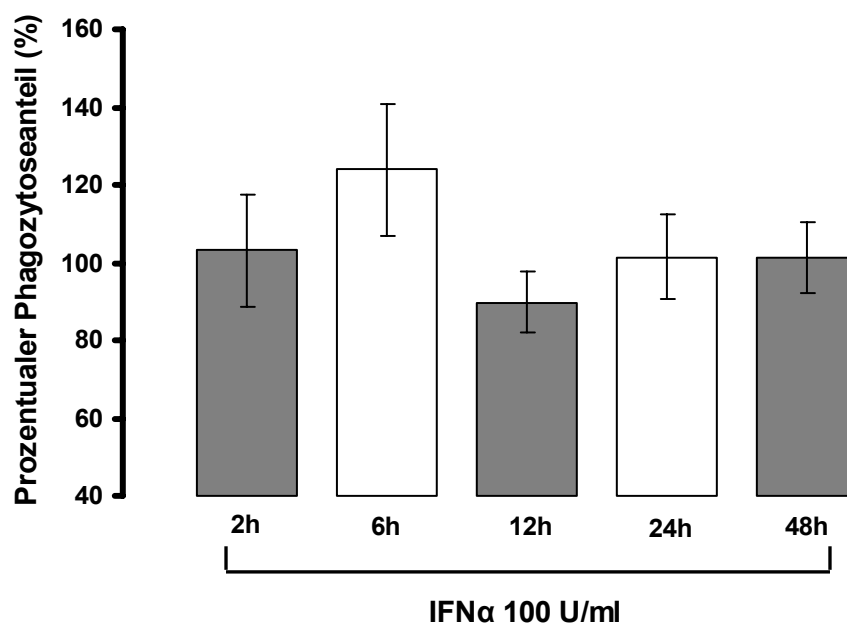


Abbildung 18: Prozentualer Phagozytoseanteil der mit IFN α der Konzentration 100 U/ml behandelten Monozyten.

Dargestellt ist die Anzahl der Zellen, die Beads phagozytiert haben, in Prozentwerten ausgedrückt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Phagozytosekapazität der unbehandelten Monozyten wurde als 100% gesetzt. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Phagozytosekapazität der mit 100 U/ml IFN α behandelten Monozyten zu der der unbehandelten Zellen ($p > 0,05$, ANOVA). Nach 2h Inkubationszeit ist die Phagozytosekapazität auf 103% und nach 6h auf 124% der Phagozytosekapazität unbehandelter Zellen gestiegen. Allerdings beträgt sie nach 12h nur 90% und ist nach 24h und 48h identisch mit der Phagozytosekapazität unbehandelter Zellen.

Bei den IFN α Inkubationen mit 500 U/ml (Abb.19) lässt sich der Trend der Inkubation mit 100 U/ml IFN α zum Phagozytoseanstieg bei frühen Inkubationszeiten nicht erkennen. Es zeigen sich nach zwei-, zwölf- und 48-stündiger Inkubation leichte Phagozytoseanstiege auf 106%, nach sechs- und 24-stündiger Inkubation mit 500 U/ml IFN α allerdings Phagozytoseabnahmen auf 96% und 90%. Sowohl die Anstiege als auch die Abnahmen sind statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$, ANOVA).

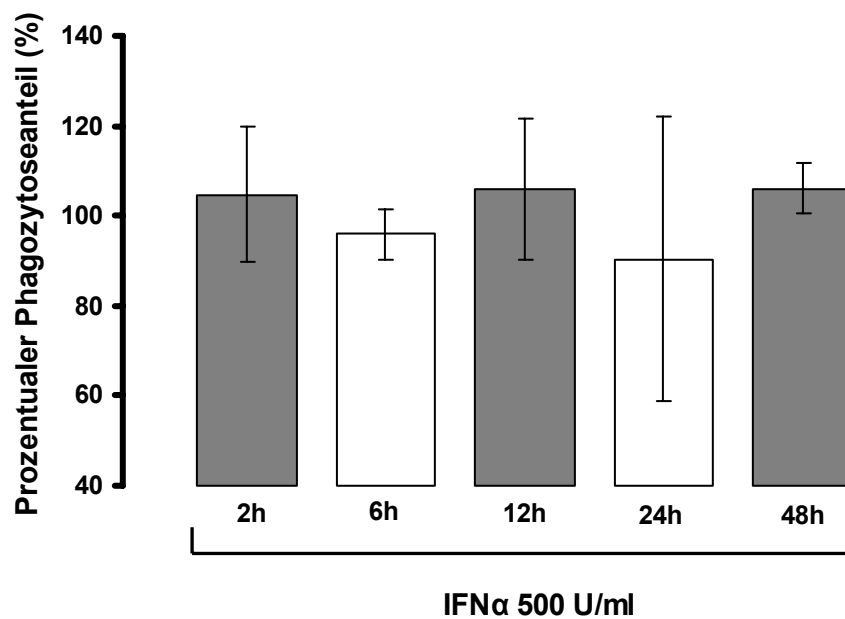


Abbildung 19: Prozentualer Phagozytoseanteil der mit IFN α der Konzentration 500 U/ml behandelten Monozyten.

Dargestellt ist die Anzahl der Zellen, die Beads phagozytiert haben, in Prozentwerten ausgedrückt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Phagozytosekapazität der unbehandelten Monozyten wurde als 100% gesetzt. Nach zwei-, zwölf- und 48-stündiger Inkubation zeigt sich ein leichter Phagozytoseanstieg auf jeweils 106%, während sich nach sechs- und 24-stündiger Inkubation eine leichte Phagozytoseabnahme auf 96% bzw. 90% zeigt. Der Unterschied zwischen der Phagozytosekapazität der mit 500 U/ml IFN α behandelten Monozyten und der Phagozytosekapazität der unbehandelten Zellen ist jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$, ANOVA).

Bei den Inkubationen mit IFN α 1000 U/ml (Abb.20) zeigt sich nach zwei- und zwölfstündiger Inkubation eine geringe Phagozytoseabnahme von 99% bzw. 94% gegenüber den unbehandelten Zellen. Nach 6h zeigt sich ein Anstieg auf 109%, nach 24h auf 108% und nach 48h waren es noch 102%. Die Unterschiede in der Phagozytose zu den unbehandelten Zellen sind nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$, ANOVA). Hier zeigt sich auch keine klare Tendenz zu Phagozytoseanstiegen oder -abnahmen.

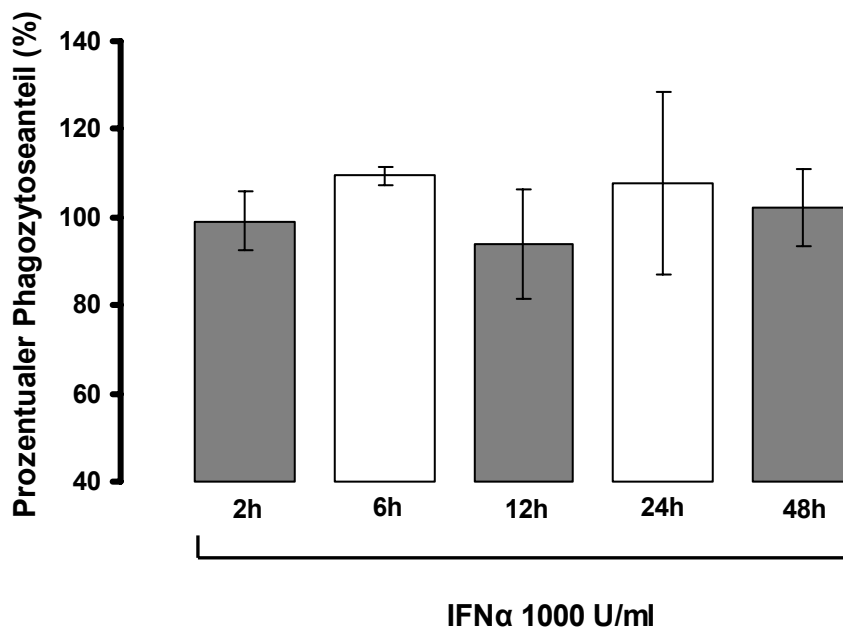


Abbildung 20: Prozentualer Phagozytoseanteil der mit IFN α der Konzentration 1000 U/ml behandelten Monozyten.

Dargestellt ist die Anzahl der Zellen, die Beads phagozytiert haben, in Prozentwerten ausgedrückt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Phagozytosekapazität der unbehandelten Monozyten wurde als 100% gesetzt. Es zeigen sich leichte Phagozytoseanstiege nach 6h sowie nach 24h auf 109% bzw. 108%, die aber nicht signifikant sind, sowie eine leichte Phagozytoseabnahme nach 12h auf 94%, die aber ebenfalls nicht signifikant ist ($p > 0,05$, ANOVA). Nach 2h und 48h zeigte sich keine Veränderung.

Da die Phagozytosekapazität der Monozyten nach Inkubation mit IFN α sich nicht signifikant unterschied von der Phagozytosekapazität der nicht behandelten Monozyten ($p = 0,760$, ANOVA) und sich auch keine klare Tendenz zu Phagozytoseveränderungen ergab, war dadurch auch nicht zu erwarten, dass IFN α bei den Mikroglia zu einer Steigerung der Phagozytosekapazität führt. Deshalb wurde IFN α nicht zur Stimulation von Mikrogliazellen verwendet. Die Ergebnisse der Monozytenbehandlung lassen darauf schließen, dass IFN α sich nicht dazu eignet, mononukleäre Phagozyten zu verstärkter Phagozytose anzuregen.

4.2.2 Stimulation humaner Monozyten mit IFN β 100 U/ml, IFN β 500 U/ml und IFN β 1000 U/ml

Nach der Stimulation der Monozyten mit IFN β der Konzentrationen 100 U/ml, 500 U/ml und 1000 U/ml wurden die Zellen ebenfalls wieder für 60 min mit 1 μ l Beads inkubiert und danach durchflusszytometrisch erfasst.

Abb.21 stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytosekapazität der mit IFN β 100 U/ml behandelten Monozyten dar. Abb.22 stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytosekapazität der mit IFN β 500 U/ml und Abb.23 die Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytosekapazität der mit IFN β 1000 U/ml behandelten Monozyten dar. Verglichen wird die Phagozytosekapazität der mit IFN β behandelten Monozyten mit der Phagozytosekapazität unbehandelter Monozyten. Der Mittelwert der Phagozytosekapazität unbehandelter Zellen wurde als 100% gesetzt. Dieser ist in der Graphik nicht dargestellt. Die Mittelwerte der Phagozytosekapazität der mit IFN β behandelten Monozyten sind ebenfalls in Prozentwerten und werden graphisch dargestellt.

Bei den Stimulationsversuchen mit IFN β 100 U/ml (Abb.21) zeigt sich eine signifikante Zunahme der Phagozytose ($p < 0,05$, ANOVA). Die größte Phagozytosezunahme zeigt sich nach zwei- und sechsständiger Inkubation. So beträgt die Phagozytose nach zweistündiger Inkubation mit IFN β 100 U/ml 126% der Phagozytosekapazität der unbehandelten Monozyten, während es nach sechsständiger Inkubation noch 116% sind. Nach längeren Inkubationszeiten unterscheidet sich die Phagozytosekapazität nur noch geringfügig von der Phagozytosekapazität der unbehandelten Monozyten mit 102% nach 24- bis 72-stündiger Inkubationsdauer.

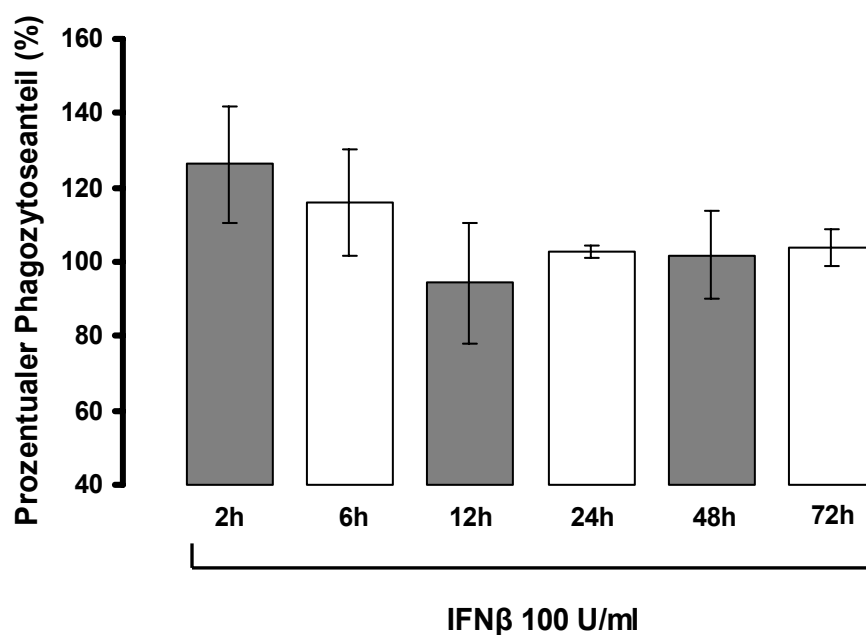


Abbildung 21: Prozentualer Phagozytoseanteil der mit IFN β der Konzentration 100 U/ml behandelten Monozyten.

Dargestellt ist die Anzahl der Zellen, die Beads phagozytiert haben, in Prozentwerten ausgedrückt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Phagozytosekapazität der unbehandelten Monozyten wurde als 100% gesetzt. Die größte Zunahme der Phagozytose zeigt sich bei einer Konzentration von 100 U/ml nach zwei- und sechsständiger Inkubation (126% beziehungsweise 116% der Phagozytosekapazität unbehandelter Zellen) ($p < 0,05$, ANOVA), während sich nach längerer Inkubationsdauer die Phagozytosekapazität nur geringfügig (102%) von der Phagozytosekapazität der unbehandelten Monozyten unterscheidet. Nach zwölfstündiger Inkubation zeigt sich ein Abfall der Phagozytose auf 94%.

Bei den Stimulationsversuchen mit IFN β 500 U/ml (Abb.22) zeigt sich ein Phagozytoseanstieg nicht nur nach zwei- und sechsständiger Inkubation, sondern auch noch nach einer Inkubationsdauer von 12h und 48h. So beträgt die Phagozytose nach 2h 116% der Phagozytosekapazität un behandelter Monozyten, nach 6h 110%, nach 12h 121% und nach 48h 110% ($p < 0,05$, ANOVA). Die Phagozytose nach 24h zeigt sich als fast identisch mit der Phagozytosekapazität der un behandelten Monozyten, und die Phagozytosekapazität nach 72h ist um 5% vermindert, sodass es hier den Anschein hat, als würde bei 72h die Phagozytosekapazität wieder abnehmen.

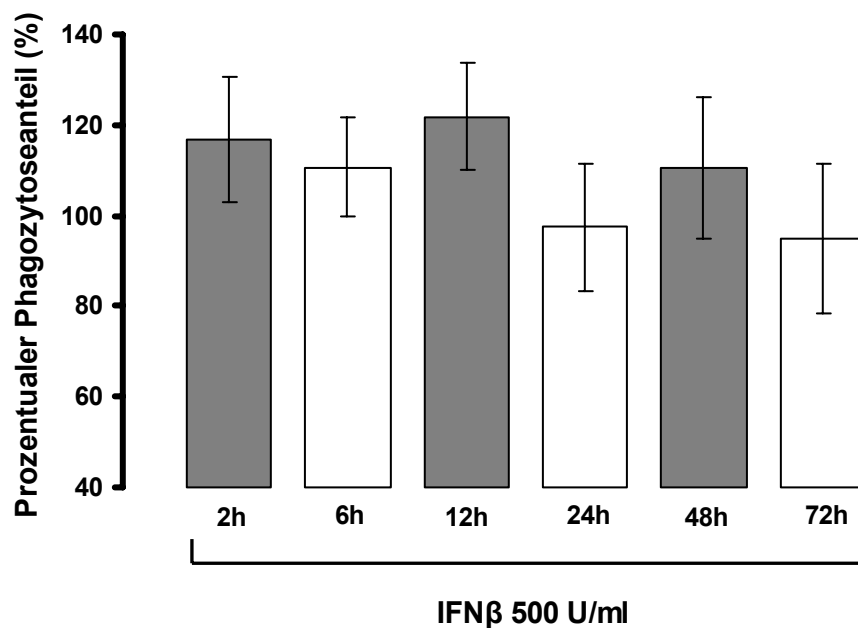


Abbildung 22: Prozentualer Phagozytoseanteil der mit IFN β der Konzentration 500 U/ml behandelten Monozyten.

Dargestellt ist die Anzahl der Zellen, die Beads phagozytiert haben, in Prozentwerten ausgedrückt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Phagozytosekapazität der un behandelten Monozyten wurde als 100% gesetzt. Nach zweistündiger Inkubation mit IFN β 500 U/ml beträgt die Phagozytose 116% der Phagozytosekapazität der un behandelten Monozyten, nach sechsständiger Inkubation 110%, nach 12h 121% und nach 48h 110% ($p < 0,05$, ANOVA). Die Phagozytose nach 24h ist hier fast identisch mit der Phagozytosekapazität der un behandelten Zellen, und die Phagozytose nach 72h ist um 5% vermindert.

Nach Inkubation mit 1000 U/ml IFN β (Abb.23) zeigt sich nach allen Inkubationszeiten eine verstärkte Phagozytose. Während die Phagozytosekapazität nach zwei-, sechs- und zwölfstündiger Inkubation mit IFN β noch etwas gering ist mit 112%, 106% und 103% der Phagozytose un behandelter Monozyten, zeigt sich mit 131% eine deutlich verstärkte Phagozytose nach 24-stündiger Inkubation. Nach 48h beträgt die Phagozytose 113% und nach 72h 124% der Phagozytosekapazität un behandelter Monozyten ($p < 0,05$, ANOVA).

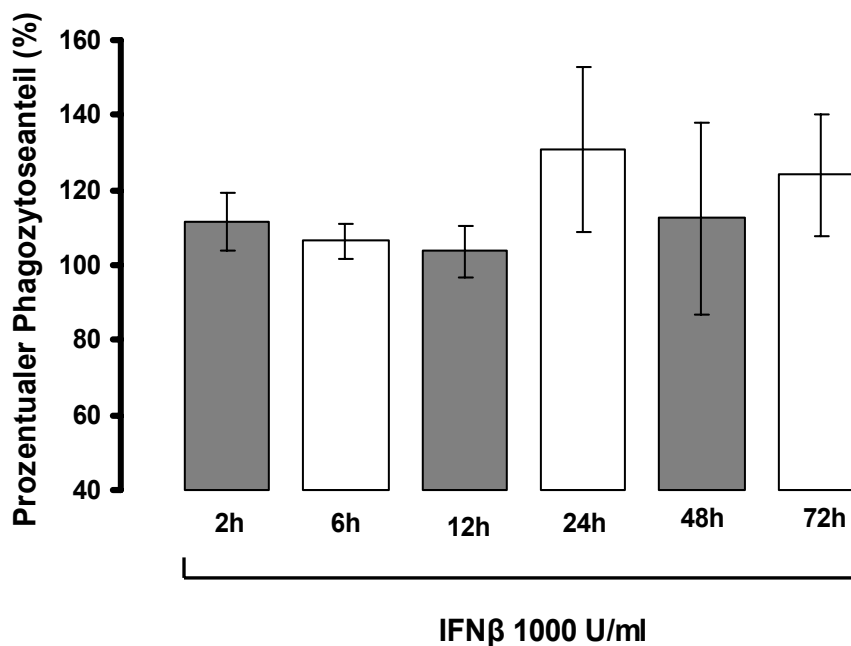


Abbildung 23: Prozentualer Phagozytoseanteil der mit IFN β der Konzentration 1000 U/ml behandelten Monozyten. Dargestellt ist die Anzahl der Zellen, die Beads phagozytiert haben, in Prozentwerten ausgedrückt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Phagozytosekapazität der un behandelten Monozyten wurde als 100% gesetzt. Nach zweistündiger Inkubation mit IFN β beträgt die Phagozytose 112% der Phagozytose un behandelter Monozyten, nach 6h 106%, nach 12h 103%, nach 24h 131%, nach 48h 113% und nach 72h 124%. Somit zeigen sich nach allen Inkubationszeiten Phagozytoseanstiege, wobei sich die höchsten Phagozytoseanstiege nach 24- und 72-stündiger Inkubation ergeben ($p < 0,05$, ANOVA).

Eine verstärkte Phagozytose zeigt sich nach IFN β -Behandlung mit allen drei Konzentrationen. Während sich nach Behandlung mit 100 U/ml IFN β die vermehrte Phagozytose am stärksten nach zwei- und sechsstündiger Inkubation zeigt, besteht nach Inkubation mit 1000 U/ml IFN β mit längeren Inkubationszeiten ein Trend zu einer Phagozytosezunahme. Der signifikante Anstieg der Phagozytosekapazität nach Behandlung der Monozyten mit IFN β ($p = 0,033$, ANOVA), ließ vermuten, dass sich dieser auch bei den Mikrogliaversuchen wiederholt. Die Zellstimulation wurde bei den Mikrogliaversuchen mit IFN β 500 U/ml fortgeführt.

4.2.3 Stimulation humaner Monozyten mit IFN γ 100 U/ml, IFN γ 500 U/ml und IFN γ 1000 U/ml

Nach Stimulation der Monozyten mit IFN γ der Konzentrationen 100 U/ml, 500 U/ml und 1000 U/ml wurden die Zellen ebenfalls wieder für 60 min mit 1 μ l Beads inkubiert und danach durchflusszytometrisch erfasst.

Abb.24 stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytosekapazität der mit IFN γ 100 U/ml behandelten Monozyten dar. Abb.25 stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytosekapazität der mit IFN γ 500 U/ml und Abb.26 die Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytosekapazität der mit IFN γ 1000 U/ml behandelten Monozyten dar. Verglichen wird die Phagozytosekapazität der mit IFN γ behandelten Monozyten mit der Phagozytosekapazität unbehandelter Monozyten. Der Mittelwert der Phagozytosekapazität unbehandelter Zellen wurde als 100% gesetzt. Dieser ist in der Graphik nicht dargestellt. Die Mittelwerte der Phagozytosekapazität der mit IFN γ behandelten Monozyten sind ebenfalls in Prozentwerten und werden graphisch dargestellt.

Die Behandlung mit 100 U/ml IFN γ (Abb.24) zeigt nach 2h einen Phagozytoseanstieg auf 120%, nach 6h sind es noch 111%, nach 24h 107% und nach 72h 108% der Phagozytose unbehandelter Monozyten. Nach zwölfstündiger Inkubation zeigt sich keine Veränderung und nach 48h eine geringfügige Abnahme der Phagozytose auf 97% des Bezugswertes. Somit besteht zwar eine leichte Tendenz zu einem Anstieg der Phagozytose, vor allem nach kurzer Inkubationszeit, diese ist jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$, ANOVA).

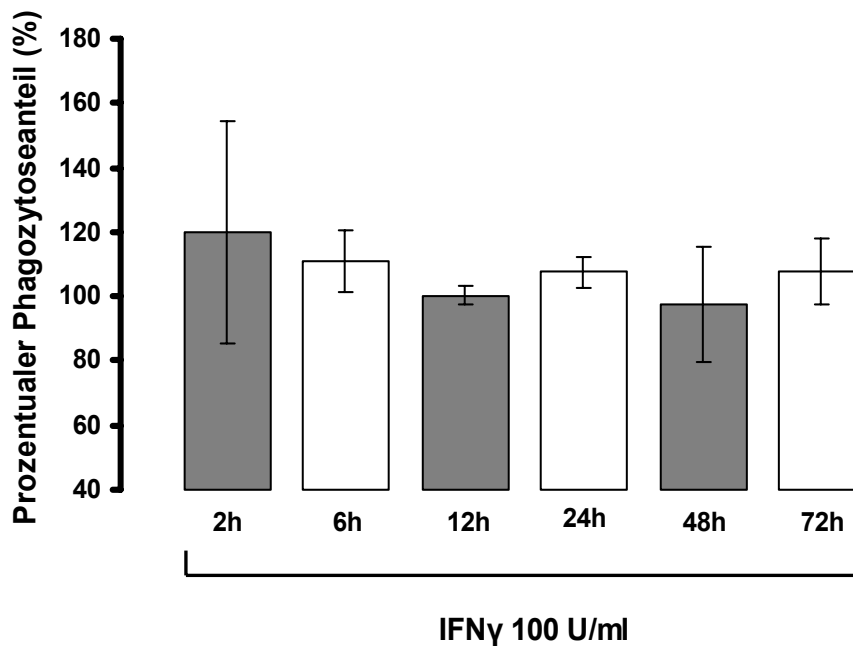


Abbildung 24: Prozentualer Phagozytoseanteil der mit IFN γ der Konzentration 100 U/ml behandelten Monozyten.

Dargestellt ist die Anzahl der Zellen, die Beads phagozytiert haben, in Prozentwerten ausgedrückt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Phagozytosekapazität der unbehandelten Monozyten wurde als 100% gesetzt. Es zeigt sich ein Phagozytoseanstieg nach 2h (120%), nach 6h (111%), sowie nach 24h (107%) und 72h (108%). Die Phagozytose nach 12h unterscheidet sich nicht von der Phagozytose unbehauelter Zellen, und nach 48-stündiger Inkubation zeigt sich sogar eine leichte Abnahme (97%). Die Veränderungen der Phagozytose sind statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$, ANOVA).

Nach Inkubation mit 500 U/ml IFN γ (Abb.25) zeigt sich ebenfalls eine Tendenz zum Anstieg der Phagozytose. Allerdings sind die Anstiege sehr gering und somit nicht signifikant ($p > 0,05$, ANOVA). In Bezug zu den unbehandelten Monozyten beträgt die Phagozytosekapazität nach IFN γ -Behandlung nach 2h 106%, nach 6h 104%, nach 12h 112%, nach 24h 99%, nach 48h 105% und nach 72h ebenfalls 105%.

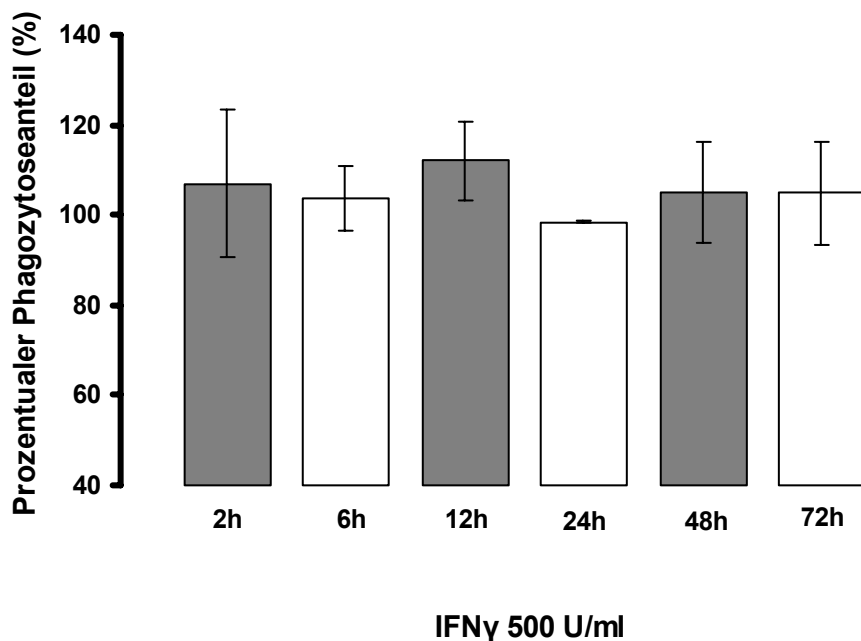


Abbildung 25: Prozentualer Phagozytoseanteil der mit IFN γ der Konzentration 500 U/ml behandelten Monozyten.

Dargestellt ist die Anzahl der Zellen, die Beads phagozytiert haben, in Prozentwerten ausgedrückt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Phagozytosekapazität der unbehandelten Monozyten wurde als 100% gesetzt. Die Phagozytosekapazität nach zweistündiger Inkubation mit IFN γ beträgt 106%, nach 6h 104%, nach 12h 112%, nach 24h 99%, nach 48h 105% und nach 72h 105%. Somit ist ein leichter Trend zum Phagozytoseanstieg nach IFN γ -Behandlung sichtbar, der allerdings nicht signifikant ist ($p > 0,05$, ANOVA).

Nach Inkubation mit 1000 U/ml IFN γ (Abb.26) zeigt sich bei der 2h-, 6h- und 12h-Inkubation jeweils ein Phagozytoseanstieg. Nach zweistündiger Inkubation beträgt die Phagozytose 102% der Phagozytosekapazität un behandelter Monozyten, nach 6h 115% und nach 12h 110%. Nach 24h fällt die Phagozytosekapazität jedoch auf 95% ab, nach 48h beträgt sie 97% und nach 72h 102%. Weder der Phagozytoseanstieg noch die Phagozytoseabnahme sind statistisch signifikant ($p = 0,309$, ANOVA), es zeigt sich jedoch bei der 2h-, 6h- und 12h-Inkubation ein Trend zur Phagozytosesteigerung, der sich bei längeren Inkubationszeiten nicht fortsetzt.

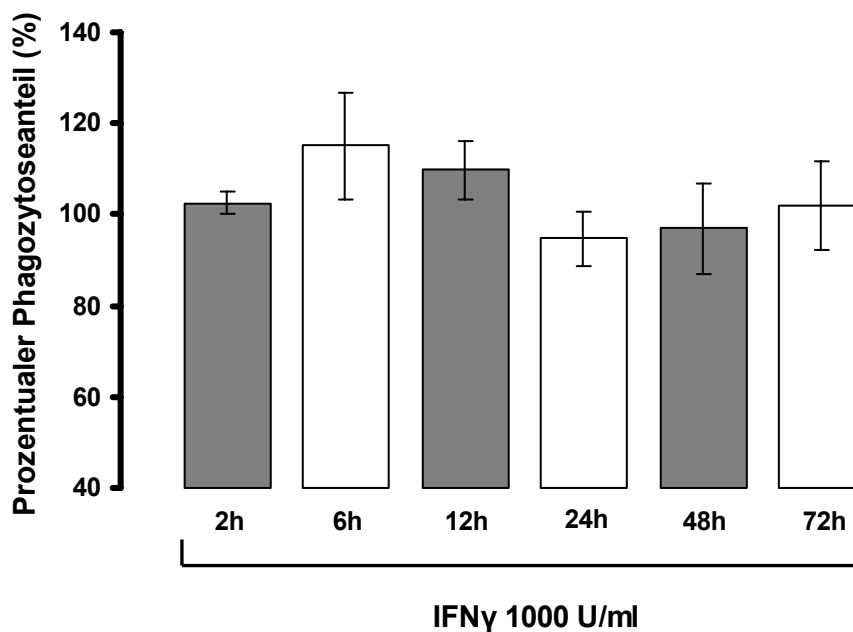


Abbildung 26: Prozentualer Phagozytoseanteil der mit IFN γ der Konzentration 1000 U/ml behandelten Monozyten.

Dargestellt ist die Anzahl der Zellen, die Beads phagozytiert haben, in Prozentwerten ausgedrückt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Phagozytosekapazität der un behandelten Monozyten wurde als 100% gesetzt. Nach zweistündiger Inkubation beträgt die Phagozytosekapazität 102%, nach 6h 115%, nach 12h 110%, nach 24h hingegen 95%, nach 48h 97% und nach 72h Inkubation 102%. Die Änderungen der Phagozytosekapazität der mit IFN γ behandelten Zellen sind nicht signifikant ($p > 0,05$, ANOVA).

Bei den Monozytenversuchen mit IFN γ -Behandlung zeigen sich zwar keine signifikanten Veränderungen der Phagozytosekapazität ($p = 0,309$), es kann aber dennoch ein Trend zum Phagozytoseanstieg vor allem bei kurzen Inkubationszeiten von 2h, 6h und 12h erkannt werden. Die Zellstimulation mit IFN γ wurde bei den Mikrogliaversuchen mit der Konzentration 100 pg/ml fortgeführt.

4.3 Mikroglia-Stimulationsversuche

Um Aufschluss darüber zu gewinnen, ob IFN β und IFN γ die Phagozytosekapazität von Mikroglia steigern können, wurden die Mikroglia zuerst mit 500 U/ml IFN β für 2h, 24h und 48h, bzw. 100 pg/ml IFN γ für 2h, 24h, 48h und 72h inkubiert. Anschließend wurden den Monozyten FITC-markierte Fluoreszenzpartikel (Beads) bzw. CY3-markiertes A β geboten.

Die Zellen wurden für 60 min mit 1 μ l Beads, bzw. für 2,5h mit 1 μ l A β inkubiert. Die Phagozytosekapazität wurde durch die FACS-Analyse quantifiziert, indem die phagozytierten FITC-markierten Beads, bzw. das CY3-markierte A β erfasst wurden.

4.3.1 Stimulation von Mikroglia mit IFN β 500 U/ml

Die Abbildungen 27 und 28 stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytosekapazität der mit IFN β 500 U/ml behandelten Mikroglia dar. In Abb. 27 ist die Phagozytose von A β dargestellt, während Abb. 28 die Beads-Phagozytose zeigt.

Verglichen wird die Phagozytosekapazität der mit IFN β behandelten Mikroglia mit der Phagozytosekapazität unbehandelter Mikroglia. Der Mittelwert der Phagozytosekapazität unbehandelter Zellen wurde als 100% gesetzt. Die Mittelwerte der Phagozytosekapazität der mit IFN β behandelten Mikroglia sind in der Graphik in Prozentwerten dargestellt.

Bei der Behandlung mit 500 U/ml IFN β (Abb.27) zeigt sich keine signifikante Veränderung der Phagozytose ($p > 0,05$, ANOVA). Nach zweistündiger Inkubation ist die A β -Phagozytose leicht vermindert (96%) gegenüber der Phagozytosekapazität der nicht behandelten Mikroglia. Nach 24h steigt die Phagozytose auf 107% und nach 48h auf 123% der Phagozytosekapazität unbehandelter Zellen. So zeigt sich ein Trend dahingehend, dass mit längerer Inkubationszeit die Phagozytose von A β zunimmt. Allerdings sind die Unterschiede nicht signifikant.

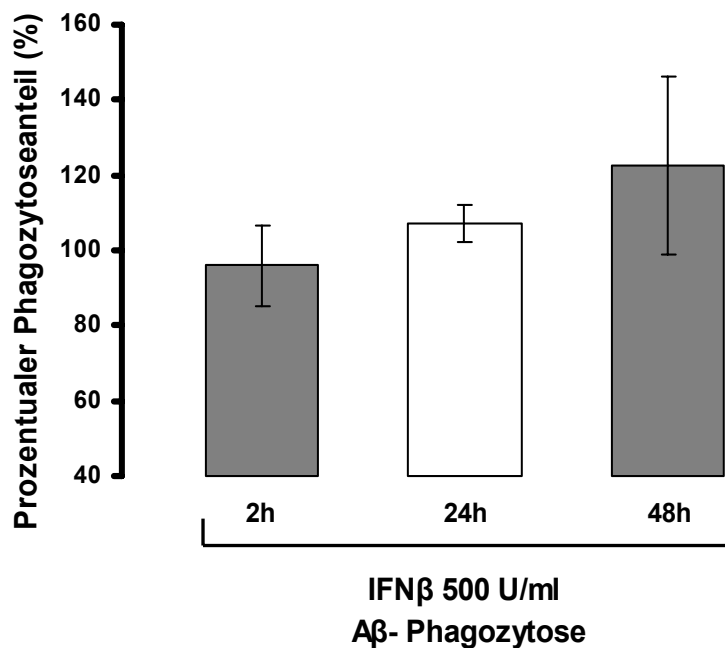


Abbildung 27: Prozentualer A β -Phagozytoseanteil der mit IFN β der Konzentration 500 U/ml behandelten Mikroglia.

Dargestellt ist die Anzahl der Mikrogliazellen, die A β phagozytiert haben, in Prozentwerten ausgedrückt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Phagozytosekapazität der unbehandelten Mikroglia wurde als 100% gesetzt. Nach zweistündiger Inkubation beträgt die Phagozytosekapazität 96% der Phagozytosekapazität unbehandelter Zellen, nach 24h 107% und nach 48h 123%. Somit zeigt sich die Tendenz zum Phagozytoseanstieg bei längerer Inkubationszeit, die allerdings nicht signifikant ist ($p > 0,05$, ANOVA).

Bei der Beads-Phagozytose zeigt sich nach Inkubation mit 500 U/ml IFN β (Abb.28) kaum eine Veränderung der Phagozytose. Nach 2h und 24h ist die Phagozytose identisch mit der der unbehandelten Mikroglia und nach 48h zeigt sich ein geringer Anstieg auf 103%, sodass sich hier kein deutlicher Einfluss des IFN β auf die Phagozytosekapazität der Mikroglia zeigt ($p > 0,05$, ANOVA).

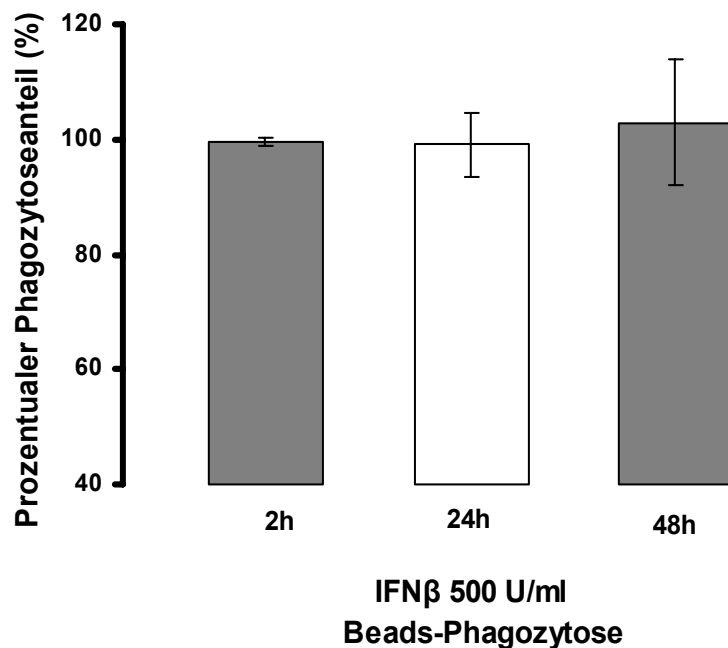


Abbildung 28: Prozentualer Beads-Phagozytoseanteil der mit IFN β der Konzentration 500 U/ml behandelten Mikroglia.

Dargestellt ist die Anzahl der Mikrogliazellen, die Beads phagozytiert haben, in Prozentwerten ausgedrückt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Phagozytosekapazität der unbehandelten Mikroglia wurde als 100% gesetzt. Nach zwei- und 24-stündiger Inkubation ist die Phagozytosekapazität identisch mit der der unbehandelten Zellen und nach 48h zeigt sich ein geringer Anstieg auf 103% ($p > 0,05$, ANOVA).

4.3.2 Stimulation von Mikroglia mit IFN γ 100 pg/ml

Die Abbildungen 29 und 30 stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytosekapazität der mit IFN γ 100 pg/ml behandelten Mikroglia dar. In Abb. 29 ist die Phagozytose von A β dargestellt, während Abb. 30 die Beads-Phagozytose zeigt.

Verglichen wird die Phagozytosekapazität der mit IFN γ behandelten Mikroglia mit der Phagozytosekapazität unbehandelter Mikroglia. Der Mittelwert der Phagozytosekapazität unbehandelter Zellen wurde als 100% gesetzt. Die Mittelwerte der Phagozytosekapazität der mit IFN γ behandelten Mikroglia sind in der Graphik in Prozentwerten dargestellt.

Nach Behandlung der Mikroglia mit 100 pg/ml IFN γ zeigt sich keine signifikante Veränderung ihrer Phagozytosekapazität ($p > 0,05$, ANOVA).

Die A β -Phagozytose (Abb.29) verändert sich nach zwei- und 24-stündiger IFN γ -Inkubation nicht, steigt dann allerdings nach 48h auf 111% und nach 72h auf 113% der Phagozytosekapazität unbehandelter Zellen, sodass sich ein Trend dahingehend zeigt, dass nach längerer Inkubationsdauer die Phagozytosekapazität zunimmt. Allerdings sind die Unterschiede zu den unbehandelten Zellen nicht signifikant ($p > 0,05$, ANOVA).

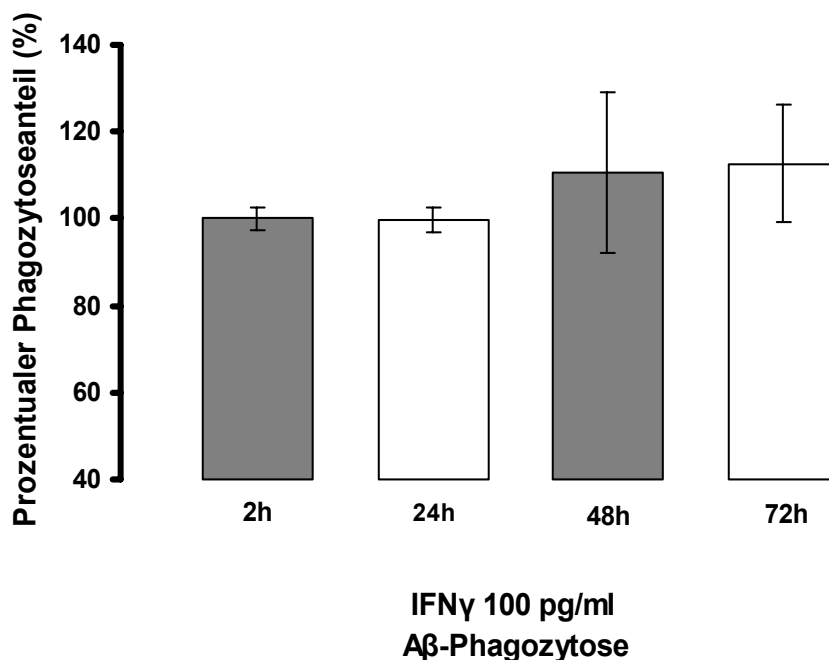


Abbildung 29: Prozentualer A β -Phagozytoseanteil der mit IFN γ der Konzentration 100 pg/ml behandelten Mikroglia. Dargestellt ist die Anzahl der Mikrogliazellen, die A β phagozytiert haben, in Prozentwerten ausgedrückt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Phagozytosekapazität der unbehandelten Mikroglia wurde als 100% gesetzt. Die Phagozytosekapazität nach zwei- und 24-stündiger Inkubation ist unverändert, nach 48h steigt sie auf 111% und nach 72h auf 113%. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Phagozytosekapazität der mit IFN γ behandelten Zellen zu den unbehandelten Zellen ($p > 0,05$, ANOVA).

Bei der Beads-Phagozytose nach Inkubation mit IFN γ (Abb.30) zeigt sich ebenfalls keine signifikante Veränderung der Phagozytosekapazität der IFN γ -behandelten zu den unbehandelten Mikroglia ($p > 0,05$, ANOVA). Nach 2h beträgt die Phagozytosekapazität 101%, nach 24h 100%, nach 48h 99% und nach 72h 98% der Phagozytose unbehandelter Zellen. Die Veränderungen sind minimal, sodass es scheint, als würde IFN γ die Beads-Phagozytose nicht beeinflussen.

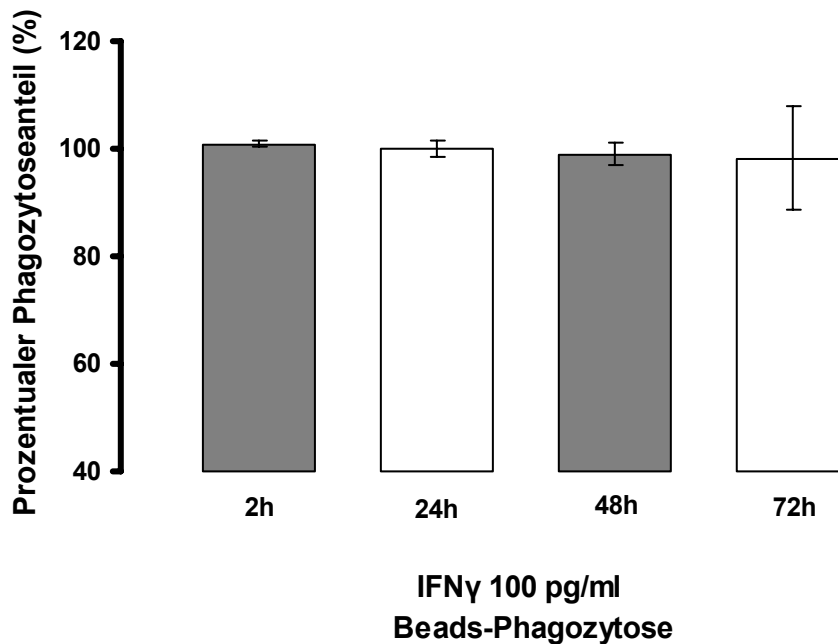


Abbildung 30

Prozentualer Phagozytoseanteil der Beads und mittlere Fluoreszenzintensität der mit IFN γ der Konzentration 100 pg/ml behandelten Mikroglia. Dargestellt ist die Anzahl der Mikrogliazellen, die Beads phagozytiert haben, in Prozentwerten ausgedrückt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Phagozytosekapazität der unbehandelten Mikroglia wurde als 100% gesetzt. Nach IFN γ -Inkubation verändert sich die Phagozytosekapazität minimal. Die stärkste Abweichung zeigt sich nach 72-stündiger Inkubation mit einem geringfügigen Abfall auf 98% der Phagozytosekapazität unbehandelter Zellen.

5 Diskussion

Die kausale Therapie der Alzheimer Erkrankung ist bislang noch nicht bekannt. Allerdings konnten kürzliche Therapiestudien zeigen, dass durch Aktivierung der Mikroglia mit verstärkter Phagozytose eine Verbesserung sowohl der klinischen Symptome (Hock et al. 2003), als auch eine Reduktion der histopathologischen Merkmale (Ferrer et al. 2004) erreicht werden kann. Allerdings zeigte die Aktivierung der Mikroglia durch eine aktive Immunisierung mit Amyloid β gravierende Nebenwirkungen mit tödlich verlaufenden aseptischen Meningoenzephalitiden (Gilman et al. 2005).

Im Rahmen dieser Studie sollte untersucht werden, ob durch eine alternative Therapie mit immunmodulierenden Interferonen eine Erhöhung der Phagozytoseaktivität der Mikroglia erreicht werden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit IFN β zu einem signifikanten Anstieg der Phagozytosekapazität bei Monozyten führt. Während sich mit 100 U/ml IFN β nur nach zwei- und sechsständiger Inkubation Phagozytoseanstiege zeigten, nahm die Phagozytosekapazität nach Behandlung der Monozyten mit 1000 U/ml auch nach längeren Inkubationszeiten bis 72h zu. Dies deutet darauf hin, dass die Wirkung des IFN β dosisabhängig und bei höherer Konzentration effektiver ist.

Auch bei den Mikroglia zeigte sich eine leichte Tendenz zur Phagozytosesteigerung nach 48h. Die fehlende Signifikanz bei den Mikrogliainkubationen könnte darauf beruhen, dass die Konzentration von 500 U/ml IFN β nicht ausreichend hoch war, zumal bei den Monozyteninkubationen die Konzentration von 1000 U/ml die deutlichsten Phagozytoseanstiege bewirkte. Doch eine Tendenz zur verstärkten A β -Phagozytose durch Mikroglia ist erkennbar. Dieses Ergebnis ist zum Teil vereinbar mit einer 2003 veröffentlichten Studie der Gruppe Chan et al., die im Zusammenhang mit autoimmunen Entzündungen des ZNS nachwies, dass IFN β die Phagozytosekapazität von Mikroglia für apoptotische T-Zellen signifikant zu steigern vermag (Chan et al. 2003). Die Studie unterscheidet sich darin, dass Mikroglia von Ratten behandelt wurden. Hier zeigte sich ebenfalls, dass die Phagozytosesteigerung von Mikroglia unter IFN β -Einfluss dosisabhängig ist. Allerdings erreichten sie eine maximale Phagozytosesteigerung mit 300 U/ml IFN β , im Gegensatz zu unserer Studie, bei der sich die deutlichsten Phagozytoseanstiege bei einer Konzentration von 1000 U/ml zeigten. Chan et al. konnten

unter höheren Konzentrationen (600-3000 U/ml) keine weitere Phagozytosesteigerung mehr nachweisen.

Eine signifikante Steigerung der Phagozytose bei Mikroglia unter IFN β -Behandlung zeigte sich in der Studie von Chan et al. allerdings nur für apoptotische T-Zellen, nicht aber für nicht-apoptotische T-Zellen. Sodass nicht von einer generellen Steigerung der Phagozytosekapazität von IFN β auf Mikrogliazellen ausgegangen werden kann, sondern eher, dass sich der phagozytosesteigernde Effekt nur für bestimmte „Phagozytosematerialien“ zeigt. Der gleiche Unterschied im Phagozytoseverhalten zeigte sich bei Chan et al. auch bei der Behandlung humaner Mikroglia. In unserer Studie erwies sich IFN β als phagozytosesteigernd für Amyloid β und in geringerem Maße auch für Beads. Weitere in vitro-Versuche könnten hier zusätzlichen Aufschluss über den Einfluss von IFN β auf das Phagozytoseverhalten von Mikroglia geben.

Die Untersuchung der Wirkung von IFN α auf die Phagozytoseleistung humaner Monozyten zeigte keinen signifikanten Effekt. Deshalb war auf der Grundlage unserer Monozytenversuche nicht damit zu rechnen, dass IFN α auf Mikroglia einen phagozytosesteigernden Effekt ausübt. IFN α ist bekannt als Induktor hunderter von Genen, die antivirale Aktivität bewirken oder involviert sind in Lipidmetabolismus, Apoptose, Proteinabbau und Zellantworten auf Entzündungen und wird bisher erfolgreich eingesetzt zur Behandlung von Hepatitis C und verschiedenen Tumorerkrankungen (Feld und Hoofnagle 2005, Weigand 2007). Über die Aktivierung von mononukleären Phagozyten hinsichtlich verstärkter Produktion und Ausschüttung von Zellmediatoren und Stoffwechselprodukten durch IFN α , besteht eine widersprüchliche Datenlage (Colton et al. 1992). Die Steigerung der Phagozytosekapazität als Form der Aktivierung von Monozyten durch IFN α , hat sich in unserer Studie jedenfalls nicht gezeigt.

Eine Erhöhung der Mikrogliaaktivierung durch IFN α , die in einer früheren Studie nachgewiesen wurde (Milner und Campbell 2003), indem die Zelloberflächenexpression von MHC Klasse I Molekülen und Zelladhäsionsmolekülen, die bei Mikrogliaaktivierung hochreguliert werden, quantifiziert wurde, ließ sich in dieser Arbeit, unter der Fragestellung der Phagozytosesteigerung, nicht nachweisen. Nach meinen Ergebnissen ist davon auszugehen, dass sich IFN α nicht zur Steigerung der Phagozytosekapazität der Mikroglia eignet und dass es somit in dieser Hinsicht als Therapieoption bei Alzheimerpatienten nicht in Betracht kommt. IFN α wurde allerdings auch schon in einer früheren Studie intrathekal verabreicht und führte dabei zu einer Stabilisierung der

neurologischen Zeichen, sowie nach intramuskulärer Injektion zu reduzierter Mortalität, wodurch wiederum der Einsatz des IFN α , unter einem anderen Aspekt, als Therapie für möglich erachtet werden könnte (Cabrera-Gomez und Lopez-Saura 2000).

Die Untersuchung der Wirkung von IFN γ auf die Phagozytosekapazität von Monozyten und Mikroglia zeigte ebenfalls keinen signifikanten Effekt. Während bei den Monozytenversuchen noch eine leichte Tendenz zu einem Phagozytoseanstieg nach kurzen Inkubationszeiten bis zu 12h erkennbar ist, setzt sich dieser Trend bei den Mikrogliaversuchen nicht fort. So lässt sich aus dieser Studie ableiten, dass IFN γ nicht als mögliche Therapieoption für die Alzheimer Erkrankung in Frage kommt.

Meine Studienergebnisse der IFN γ -Behandlung widersprechen den Ergebnissen einer 2006 veröffentlichten Arbeit der Gruppe Monsonogo et al., die eine durch IFN γ verstärkte A β -Clearance nachwies. Hierfür inkubierten sie die Mikroglia nach 7 Tagen mit 100 pg/ml IFN γ für 72h, somit der gleichen Konzentration, die auch in meinen Versuchen verwendet wurde, und führten eine FACS-Analyse durch. Die A β -Phagozytose der mit IFN γ -vorbehandelten Mikroglia war signifikant erhöht, ebenso die Ausbildung von Filipodien, als ein Zeichen von Mikrogliaaktivierung. Die Konzentration der Mikroglia war in meinen Versuchen von 500 U/ml bei den Monozytenversuchen auf 100 pg/ml bei den Mikrogliaversuchen geändert worden. Allerdings ließ sich das Ergebnis der Gruppe Monsonogo et al. nicht replizieren. Unterschiede gibt es zwischen diesen zwei Versuchen nur in der Messung des A β . In meinen Versuchen war A β CY3-markiert in der FACS-Analyse quantifiziert worden, wohingegen die Monsonogo-Gruppe das A β mittels ELISA detektierte.

In einer im Oktober 2007 erschienenen Studie der Gruppe Garcia-Alloza et al. wurde nach Inkubation mit IFN γ die Abnahme von Amyloidablagerungen mit Multiphoton-Mikroskopie auf Mäusegehirn nachgewiesen. Wenn dieser Prozess durch gesteigerte Mikrogliaaktivierung erfolgt ist, würde dies meinen Ergebnissen widersprechen.

Es wurde die A β -Clearance gemessen nach dreitägiger Inkubation mit 50 ng/ml IFN γ . Durch direkte Darstellung von Amyloidablagerungen mit Multiphoton-Mikroskopie vor und nach Behandlung wurde die Abnahme der Plaques detektiert.

IFN γ zeigte in dieser Studie einen signifikanten Effekt auf die Abnahme der A β -Plaquegröße. Das Ergebnis dieser Studie hinsichtlich des Ziels, die A β -Plaques bei der Alzheimer Krankheit zu reduzieren, unterscheidet sich zwar von meinen Ergebnissen, es wird jedoch nur der Effekt der Interferonbehandlung betrachtet, nicht aber der

Mechanismus, wie die Plaquegröße reduziert wird. Unsere Studie untersucht Mikroglia hinsichtlich ihres A β -Phagozytoseverhaltens und detektiert in der FACS-Analyse direkt das phagozytierte CY3-markierte A β . Sodass durch meine Untersuchung eine direkte Aussage über die abgelaufene Phagozytose gemacht werden kann, was durch die äußere Betrachtung der A β -Plaque-Größe nicht geschehen kann, da die Plaques sich auch durch andere Faktoren verkleinert haben können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass einzig IFN β einen signifikanten Einfluss auf die Phagozytosekapazität von mononukleären Phagozyten zeigte. Da IFN β auf viele Wachstumsfaktoren, auf Differenzierung und Signalkaskaden in Mikrogliazellen wirkt (Kim et al. 2002), kann es möglicherweise auch zu verstärkter Phagozytose der bei der Alzheimer Erkrankung gebildeten A β -Plaques durch Mikroglia führen. Zur weiteren Abklärung der gewonnenen Erkenntnisse, sowie zur Beurteilung eines möglichen Therapieansatzes der Alzheimer Erkrankung sind weitere in vivo-Experimente nötig. Nach Inkubation mit IFN γ zeigte sich in dieser Studie kein signifikanter Einfluss auf die Phagozytosekapazität mononukleärer Phagozyten. Da in einer anderen Studie allerdings andere Ergebnisse erzielt wurden, könnten weitere in vitro-Experimente dienlich sein, um dieser Frage noch weiter nach zu gehen.

6 Literaturverzeichnis

1. Balsis S, Carpenter BD, Storandt M (2005) Personality change precedes clinical diagnosis of dementia of the Alzheimer type. *The journals of gerontology. Series B, psychological sciences and social sciences* 60:98-101
2. Bayer TA, Wirths O, Majtényi K, Hartmann T, Multhaup G, Beyreuther K, Czech C (2001) Key factors in Alzheimer's disease: beta-amyloid precursor protein processing, metabolism and intraneuronal transport. *Brain pathology* 11:1-11
3. Bickel H (2000) Demenzsyndrom und Alzheimer Krankheit: Eine Schätzung des Krankenbestandes und der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland. *Gesundheitswesen* 62:211-218
4. Bierer LM, Haroutunian V, Gabriel S, Knott PJ, Carlin LS, Purohit DP, Perl DP, Schmeidler J, Kanof P, Davis KL (1995) Neurochemical Correlates of Dementia Severity in Alzheimer's Disease: Relative Importance of the Cholinergic Deficits. *Journal of Neurochemistry* 64:749-760
5. Blasko I, Grubeck-Loebenstien B (2003) Role of the Immune System in the Pathogenesis, Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *Drugs Aging* 20:101-113
6. Bózzola FG, Gorelick PB, Freels S (1992) Personality changes in Alzheimer's disease. *Archives of neurology* 49:297-300
7. Brookmeyer R, Corrada MM, Curriero FC, Kawas C (2002) Survival following a diagnosis of Alzheimer's disease. *Archives of neurology* 59:1764-1967
8. Cabrera-Gómez JA, López-Saura P (2000) Alpha interferon and Alzheimer's disease. *Revista de Neurología* 30:54-60

9. Calabrese P, Essner U, Förstl H (2007) Memantine (Ebixa) in clinical practice - results of an observational study. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 24:111-117
10. Chan A, Seguin R, Magnus T, Papadimitriou C, Toyka KV, Antel JP, Gold R (2003) Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and its therapeutic implications: termination of CNS autoimmune inflammation and modulation by interferon-beta. *Glia* 43:231-242
11. Chew LJ, Takanohashi A, Bell M (2006) Microglia and Inflammation: Impact on Developmental Brain Injuries. *Mental retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 12:105-112
12. Clark CM, Karlawish JH (2003) Alzheimer disease: current concepts and emerging diagnostic and therapeutic strategies. *Annals of internal medicine* 138:400-410
13. Colonna M (2007) TLR pathways and IFN-regulatory factors: To each its own. *European Journal of Immunology* 37:306-309
14. Colton CA, Yao J, Keri JE, Gilbert D (1992) Regulation of microglial function by interferons. *Journal of Neuroimmunology* 40:89-98
15. Dheen ST, Kaur C, Ling EA (2007) Microglial Activation and its Implications in the Brain Diseases. *Current medicinal chemistry* 14:1189-1197
16. Dickson DW (1997) The Pathogenesis of Senile Plaques. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 56:321-339
17. Doody RS, Stevens JC, Beck C, Dubinsky RM, Kaye JA, Gwyther L, Mohs RC, Thal LJ, Whitehouse PJ, DeKosky ST, Cummings JL (2001) Practice parameter: management of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 56:1154-1166
18. Duke DC, Moran LB, Turkheimer FE, Banati R, Graeber MB (2004) Microglia in culture: what genes do they express? *Developmental Neuroscience* 26:30-37

19. Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, Diamond MS, Koebel CM, Arthur C, White JM, Schreiber RD (2005) A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nature Immunology* 6:722-729
20. Egert S, Wagenpfeil S, Förstl H (2007) Cholinesterase inhibitors and Alzheimer's disease: meta-analysis of the verification of effectiveness, origin and bias of results in published studies. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 132:1207-1213
21. Eikelenboom P, Veerhuis R, Scheper W, Rozemuller AJ, van Gool WA, Hoozemans JJ (2006) The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission* 113:1685-1695
22. Feld JJ, Hoofnagle JH (2005) Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 436:967-972
23. Ferrer I, Boada Rovira M, Sánchez Guerra ML, Rey MJ, Costa-Jussá F (2004) Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathology* 14:11-20
24. Fiala M, Lin J, Ringman J, Kermani-Arab V, Tsao G, Patel A, Lossinsky AS, Graves MC, Gustavson A, Sayre J, Sofroni E, Suarez T, Chiappelli F, Bernard G (2005) Ineffective phagocytosis of amyloid- β by macrophages of Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimer's Disease* 7:221-232
25. Fiala M, Cribbs DH, Rosenthal M, Bernard G (2007) Phagocytosis of amyloid-beta and inflammation: two faces of innate immunity in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 11:457-463
26. Fiala M, Liu PT, Espinosa-Jeffrey A, Rosenthal MJ, Bernard G, Ringman JM, Sayre J, Zhang L, Zaghi J, Dejbakhsh S, Chiang B, Hui J, Mahanian M, Baghaee A, Hong P, Cashman J (2007) Innate immunity and transcription of MGAT-III and Toll-like receptors in Alzheimer's disease patients are improved by bisdemethoxycurcumin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:12849-12854

27. Fukumoto H, Rosene DL, Moss MB, Raju S, Hyman BT, Irizarry MC 2004 Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain. *The American journal of pathology*: 164:719-725
28. Garcia-Alloza M, Ferrara BJ, Dodwell SA, Hickey GA, Hyman BT, Bacskai BJ (2007) A limited role for microglia in antibody mediated plaque clearance in APP mice. *Neurobiology of disease* 28:639-647
29. Geula C, Mesulam MM (1996) Systematic Regional Variations in the Loss of Cortical Cholinergic Fibers in Alzheimer's Disease. *Cerebral Cortex* 6:165-177
30. Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, Eisner L, Kirby L, Rovira MB, Forette F, Orgogozo JM; AN1792(QS-21)-201 Study Team (2005) Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 64:1553-1562
31. Goedert M, Spillantini MG (2006) A century of Alzheimer's Disease. *Science* 314:777-781
32. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews. Immunology*. 3:23-35
33. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and Macrophage Heterogeneity. *Nature reviews. Immunology* 5:953-964
34. Götz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM (2001) Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 293:1491-1495
35. Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H, Ernst M (2001) Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *European Journal of Immunology* 31:48-56
36. Gray AJ, Sakaguchi G, Shiratori C, Becker AG, LaFrancois J, Aisen PS, Duff K, Matsuoka Y (2007) Antibody against C-terminal Abeta selectively elevates plasma

- Abeta. *Neuroreport* 18:293-296
37. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1968) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:4913-4917
38. Hock C, Konietzko U, Streffer JR, Tracy J, Signorell A, Müller-Tillmanns B, Lemke U, Henke K, Moritz E, Garcia E, Wollmer MA, Umbricht D, de Quervain DJ, Hofmann M, Maddalena A, Papassotiropoulos A, Nitsch RM (2003) Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron*. 38:547-54
39. Honda K, Yanai H, Takaoka A, Taniguchi T (2005) Regulation of the type I IFN induction: a current view. *International Immunology* 17:1367-1378
40. Hume DA (2006) The mononuclear phagocyte system. *Current opinion in immunology* 18:49-53
41. Hussain I, Hawkins J, Harrison D, Hille C, Wayne G, Cutler L, Buck T, Walter D, Demont E, Howes C, Naylor A, Jeffrey P, Gonzalez MI, Dingwall C, Michel A, Redshaw S, Davis JB (2007) Oral administration of a potent and selective non-peptidic BACE-1 inhibitor decreases beta-cleavage of amyloid precursor protein and amyloid-beta production in vivo. *Journal of neurochemistry* 100:802-809
42. Ishii K, Muelhauser F, Liebl U, Picard M, Kühl S, Penke B, Bayer T, Wiessler M, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T, Fassbender K (2000) Subacute NO generation induced by Alzheimer's beta-amyloid in the living brain: reversal by inhibition of the inducible NO synthase. *The FASEB journal* 14:1485-1489
43. Janeway CA Jr, Medzhitov R (2002) Innate Immune Recognition. *Annual review of immunology* 20:197-216
44. Jeohn GH, Kong LY, Wilson B, Hudson P, Hong JS (1998) Synergistic neurotoxic effects of combined treatments with cytokines in murine primary mixed neuron/glia

- cultures. *Journal of Neuroimmunology* 85:1-10
45. Kawai T, Akira S (2006) Innate immune recognition of viral infection. *Nature immunology* 7:131-137
46. Kidd M (1963) Paired Helical Filaments in Electron Microscopy of Alzheimer's Disease. *Nature* 197:192-193
47. Kim MO, Si Q, Zhou JN, Pestell RG, Brosnan CF, Locker J, Lee SC (2002) Interferon-beta activates multiple signaling cascades in primary human microglia. *Journal of Neurochemistry* 81:1361-1371
48. Knopman DS, Parisi JE, Salviati A, Floriach-Robert M, Boeve BF, Ivnik RJ, Smith GE, Dickson DW, Johnson KA, Petersen LE, McDonald WC, Braak H, Petersen RC (2003) Neuropathology of cognitively normal elderly. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 62:1087-1095
49. Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ (1986) Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:4044-4048
50. Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Martinez A, Madrigal L, Hincapie L, Arango JC, Anthony DC, Koo EH, Goate AM, Selkoe DJ, Arango JC (1996) The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nature medicine* 2:1146-50
51. Lipton SA (2004) Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx: The journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics* 1:101-110

52. Lleó A, Greenberg SM, Growdon JH (2006) Current Pharmacotherapy for Alzheimer's Disease. *Annual review of medicine* 57:513-533
53. Lorenzo A, Yankner BA (1994) Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:12243-12247
54. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D (eds) (2006) *Der Experimentator, Immunologie*, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
55. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y (2006) Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:5644-5651
56. Mantovani A, Sica A, Locati M (2007) New vistas on macrophage differentiation and activation. *European Journal of Immunology* 37:14-16
57. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A (2006) Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *Journal of Immunology* 177:7303-7311
58. McGeer PL, McGeer EG (2002) Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. *Journal of Neurovirology* 8:529-538
59. McGeer PL, McGeer EG (2007) NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiology of Aging* 28:639-647
60. Milner R, Campbell IL (2003) The extracellular matrix and cytokines regulate microglial integrin expression and activation. *Journal of Immunology* 170:3850-3858
61. Mirakhor A, Craig D, Hart DJ, Mc Llroy SP, Passmore AP (2004) Behavioural and psychological syndromes in Alzheimer's disease. *International journal of geriatric psychiatry* 19:1035-1039

62. Monsonego A, Imitola J, Petrovic S, Zota V, Nemirovsky A, Baron R, Fisher Y, Owens T, Weiner HL (2006) Abeta-induced meningoencephalitis is IFN-gamma-dependent and is associated with T cell-dependent clearance of Abeta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:5048-5053
63. Monsonego A, Weiner HL (2003) Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Science* 302:834-838
64. Müller-Hill B, Beyreuther K (1989) Molecular Biology of Alzheimer's Disease. *Annual review of biochemistry* 58:287-307
65. Ott A, Breteler MM, van Harskamp F, Stijnen T, Hofmann A (1998) Incidence and risk of dementia. The Rotterdam Study. *American Journal of Epidemiology* 147: 574-80
66. Palmer AM (1996) Neurochemical studies of Alzheimer's disease. *Neurodegeneration: a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection and neuroregeneration* 5:381-391
67. Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402:615-622
68. Rogers J, Cooper NR, Webster S, Schultz J, McGeer PL, Styren SD, Civin WH, Brachova L, Bradt B, Ward P, et al. (1992) Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:10016-10020
69. Samanta MK, Wilson B, Santhi K, Kumar KP, Suresh B (2006) Alzheimer disease and its management: a review. *American journal of therapeutics* 13:516-526
70. Schaeffer EL, Gattaz WF (2008) Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A(2)

- enzyme. *Psychopharmacology* 198:1-27
71. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173-177
72. Schindowski K, Belarbi K, Buée L (2008) Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes, brain and behavior* 7 Suppl 1:43-56
73. Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:9649-53
74. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004) Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* 75:163-189
75. Schroder K, Sweet MJ, Hume DA (2006) Signal integration between IFN γ and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* 211:511-524
76. Selkoe DJ (2001) Alzheimer's Disease: Genes, Proteins and Therapy. *Physiological Reviews* 81:741-766
77. Shen J, Kelleher RJ 3rd (2007) The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:403-409
78. Solomon B (2006) Alzheimer's disease immunotherapy: from in vitro amyloid immunomodulation to in vivo vaccination. *Journal of Alzheimer's Disease* 9:433-438
79. Swann JB, Hayakawa Y, Zerafa N, Sheehan KC, Scott B, Schreiber RD, Hertzog P, Smyth MJ (2007) Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and

- antitumor function. *Journal of Immunology* 178:7540-7549
80. Takaoka A, Yanai H (2006) Interferon signalling network in innate defence. *Cellular microbiology* 8:907-922
81. Thal DR, Braak H (2005) Postmortale Diagnosestellung bei Morbus Alzheimer. *Der Pathologe* 26:201-213
82. Tokuda T, Fukushima T, Ikeda S, Sekijima Y, Shoji S, Yanagisawa N, Tamaoka A (1997) Plasma levels of amyloid beta proteins Abeta1-40 and Abeta1-42(43) are elevated in Down's syndrome. *Annals of neurology* 41:271-273
83. Wallesch CW, Förstl H (eds) (2005) Demenzen. Referenz-Reihe Neurologie. Thieme, Stuttgart, New York
84. Weigand K, Stremmel W, Encke J (2007) Treatment of hepatitis C virus infection. *World journal of Gastroenterology* 13:1897-1905
85. Whitmire JK, Eam B, Benning N, Whitton JL (2007) Direct interferon-gamma signaling dramatically enhances CD4+ and CD8+ T cell memory. *Journal of immunology* 179:1190-1197
86. Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A, Subbarao S, Freeman MJ, Gordon MN, Morgan D (2004) Passive immunotherapy against Abeta in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *Journal of Neuroinflammation* 1:24
87. Wong GT, Manfra D, Poulet FM, Zhang Q, Josien H, Bara T, Engstrom L, Pinzon-Ortiz M, Fine JS, Lee HJ, Zhang L, Higgins GA, Parker EM (2004) Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *Journal of biological chemistry* 279:12876-12882

-
88. Xia W, Zhang J, Perez R, Koo EH, Selkoe DJ (1997) Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:8208-8213
89. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL (1999) Up-regulated production and activation of the complement system in Alzheimer's disease brain. *The American journal of pathology* 154:927-936
90. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL (2000) Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease. *Brain research* 887:80-89

7 Veröffentlichung

Walter S, Schall U, Letiembre M, Commerçon N, Fassbender K (2008)

Increase of cellular phagocytotic capacity by IFN β

(Zur Publikation eingereicht)

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Klaus Faßbender danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas. Er gestaltete für mich Rahmenbedingungen, die ganz wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beitrugen.

Des Weiteren bedanke ich mich sehr herzlich bei Frau Dr. med. Silke Walter für ihre sehr gute fachkundige und engagierte Betreuung meiner Doktorarbeit. Ihr gilt mein ganz besonderer Dank für die konstruktive Unterstützung und Förderung meiner Arbeit.

Ganz besonders danke ich auch Frau Nadine Commerçon und Frau Andrea Schotteck, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Ebenso danke ich Frau Dr. Maryse Letiembre und Herrn Dr. Alex Liu, die mir mit ihrer Fachkompetenz sehr weitergeholfen haben.

Im Besonderen bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie für ihre Motivation in schwierigen Phasen und ihr großes Verständnis. Ihre ständige Unterstützung hat wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Ein Dankeschön geht auch an das hilfsbereite Laborteam aus der Kardiologie, deren FACS-Gerät ich jederzeit nutzen durfte.

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Ursula Schall
Geburtsdatum 14. März 1983
Geburtsort Ehingen/Donau

Schulbildung

1989 – 1993 Grundschule Oberdischingen-Öpfingen
1993 – 2002 Gymnasium Ehingen
2002 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

08/2002 – 09/2002 Pflegedienstpraktikum im Kreiskrankenhaus Ehingen
Seit 10/2002 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
09/2004 Ärztliche Vorprüfung
09/2004 – 07/2005 Studium der Humanmedizin an der Universidad de Valladolid, Spanien
Seit 02/2008 Praktisches Jahr

Famulaturen:

09/2005 - Innere Medizin: Kreiskrankenhaus Ehingen
08/2006 - Neurologie: Universitätsklinikum Homburg/Saar, Poliklinik
03/2007 - Gynäkologie: Clínica Alemana, Santiago de Chile
08/2007 - Chirurgie: Städtisches Krankenhaus Pirmasens

Nebentätigkeiten

2007-2008 Pflegerische Hilfskraft im Universitätsklinikum Homburg/Saar, Robert-Koch-Klinik