

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

**Pharmakologische Intervention der sauren Sphingomyelinase im Mausmodell der  
Alzheimer-Erkrankung**

*Dissertation*

*zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von:

Eva Portscheller

geb. am: 23.09.1987 in Paderborn

---

Für meine Familie

## I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis .....	3
II	Abkürzungsverzeichnis .....	7
1	Zusammenfassung/Summary .....	10
2	Einleitung .....	14
2.1	Historie.....	14
2.2	Epidemiologie.....	14
2.3	Definition und klinischer Verlauf.....	15
2.4	Risikofaktoren.....	16
2.5	Pathogenetische Merkmale.....	17
2.5.1	β-Amyloid.....	17
2.5.1.1	Formationen des β-Amyloids .....	17
2.5.1.2	Pathogenese und Pathophysiologie des β-Amyloids.....	18
2.5.2	Neurofibrilläre Bündel.....	20
2.6	Morbus Alzheimer und das Immunsystem.....	21
2.7	Morbus Alzheimer und Mikrogliazellen.....	22
2.8	Die Bedeutung von Rezeptoren und Membran Rafts in der Alzheimer- Erkrankung.....	24
2.9	Morbus Alzheimer und die saure Sphingomyelinase .....	25
2.10	FIASMA (Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase) .....	26
2.11	Morbus Alzheimer und Entzündungsmediatoren/-faktoren .....	28
2.12	Morbus Alzheimer und die neuronale Integration bzw. Funktion.....	30
2.13	Fragestellungen und Ziele dieser Arbeit.....	32
3	Material und Methodik .....	33
3.1	Material.....	33

3.1.1	Arbeitsmaterialien.....	33
3.1.2	Versuchstiere .....	40
3.2	Methodik.....	40
3.2.1	Materialgewinnung und Asservation .....	40
3.2.2	Immunhistochemie (IHC).....	41
3.2.2.1	Vorbereitungen für IHC .....	41
3.2.2.1.1	Silanisierung der Objektträger .....	41
3.2.2.1.2	Mikrotomie.....	42
3.2.2.2	Protokoll IHC .....	42
3.2.2.3	Auswertung IHC.....	47
3.2.2.4	Kontrollen und Prüfung der Spezifität der Antikörper .....	47
3.2.3	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay = ELISA) .....	48
3.2.3.1	Vorbereitungen für ELISA .....	48
3.2.3.1.1	Präparation von Gehirnhomogenaten.....	48
3.2.3.2	Protokoll ELISA.....	49
3.2.3.3	Auswertung ELISA .....	50
3.2.3.4	Gesamtproteinbestimmung.....	51
3.2.4	Quantitative Echtzeit Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) .....	51
3.2.4.1	Vorbereitungen für qRT-PCR .....	52
3.2.4.1.1	RNS-Isolation.....	52
3.2.4.1.2	DNS-Elimination.....	53
3.2.4.2	Protokoll qRT-PCR .....	53
3.2.4.3	Auswertung qRT-PCR.....	56
4	Ergebnisse.....	58
4.1	Mikrogliaanzahl .....	58

4.1.1	Geringere Anzahl Iba-1 positive Zellen im Hippocampus von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen im Vergleich zu ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen .....	58
4.1.2	Nicht signifikant geringere Anzahl Mac-3 positive Zellen im Hippocampus von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen im Vergleich zu ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen .....	62
4.2	A $\beta$ -Last .....	66
4.2.1	Nicht signifikant geringere A $\beta$ -Plaqueexpression in Gehirnschnitten von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen im Vergleich zu ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen.....	66
4.2.2	Geringere A $\beta$ 42- und A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Spiegel in Guanidin-Gehirnhomogenaten von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen im Vergleich zu ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen .....	71
4.2.3	Geringere A $\beta$ 42- und A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Spiegel im Blutplasma von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen im Vergleich zu ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen .....	73
4.3	Entzündungsparameter.....	75
4.3.1	Höhere TNF- $\alpha$ -, IL-1 $\beta$ -, CCL-2-mRNS-Expression und geringere IL-10-mRNS-Expression in ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen im Vergleich zu ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen .....	75
4.4	Neurotrophe und neuroprotektive Parameter.....	76
4.4.1	Höhere BDNF-, Arc- und NMDA-R1-mRNS-Expression in ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen im Vergleich zu ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen .....	76
5	Diskussion .....	78
5.1	Versuchsgruppen .....	79
5.2	Fragestellung 1: Wie wirkt sich die Gabe von Amitriptylin als Hemmstoff der ASM auf die Mikrogliaanzahl im Gehirn von TgCRND8-Alzheimer-Mäusen aus (IHC) ? .....	80

5.3	Fragestellung 2: Wie wirkt sich die Gabe von Amitriptylin als Hemmstoff der ASM auf die $\beta$ -Amyloid-Last im Gehirn und im Plasma von TgCRND8-Alzheimer-Mäusen aus (IHC, ELISA)? .....	84
5.4	Fragestellung 3: Wie wirkt sich die Gabe von Amitriptylin als Hemmstoff der ASM auf die Aktivität des Immunsystems aus, gemessen anhand der Analyse der mRNS-Transkriptionsrate von iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL-2 und IL-10 in Gehirnproben von TgCRND8-Alzheimer-Mäusen (qRT-PCR)? .....	87
5.5	Fragestellung 4: Wie wirkt sich die Gabe von Amitriptylin als Hemmstoff der ASM auf die Expression von neurotrophen/neuroprotektiven Stoffen aus, gemessen anhand der Analyse der mRNS-Transkriptionsrate von IGF-1, BDNF, Arc, NMDA-R1 in Gehirnproben von TgCRND8-Alzheimer-Mäusen (qRT-PCR)? .....	91
5.6	Schlussfolgerung .....	92
6	Literaturverzeichnis .....	93
7	Abbildungsverzeichnis .....	107
8	Tabellenverzeichnis .....	109
9	Danksagung .....	110
10	Lebenslauf .....	111

## II Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
A $\beta$ 40 bzw. 42	Amyloid $\beta$ 1-40 bzw. 1-42
AC	Acid Ceramidase
AD	Alzheimer-Demenz
AG	Antigen
AICD	APP Intracellular Domain
AK	Antikörper
AMPA-R	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptor
APH 1	Anterior Pharynx-Defective 1
APP	Amyloid-Precursor-Protein
Arc	Activity-Regulated Cytoskeleton-Associated Protein
ASM	Acid Sphingomyelinase
BACE 1	Beta-site APP Cleaving Enzyme 1
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
CCL-2 (=MCP-1)	Chemokine (C-C motif) Ligand 2 (=Monocyte Chemotactic Protein-1)
CCR2	Chemokine (C-C motif) Receptor 2
CdK5	Cyclin-Dependent Kinase 5
cDNS	Komplementäre DNS
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
COX-2	Cyclooxygenase-2
Ct	Cycle Threshold
CTF	COOH-Terminal Fragment
CTF $\beta$	C-Terminal $\beta$ -Secretase Fragment
DAB	Diaminobenzidin

DAMPs	Danger-Associated Molecular Patterns
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fc	Crystallisable Fragment
FIASMA	Functional Inhibitor(s) of Acid Sphingomyelinase
HRP	Horseradish Peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Iba-1	Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1
ICD-10	International Classification of Diseases 10
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor 1
Ig(G)	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
LPS	Lipopolysaccharide
LTP	Long-Term Potentiation
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MHC II	Major Histocompatibility Complex
(m)RNS	(Messenger)Ribonukleinsäure
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor ' $\kappa$ -Light-Chain-Enhancer' of Activated B-Cells
NGF	Nerve Growth Factor
NLRP3	NOD-Like Receptor Family, Pryn Domain Containing 3
NMDA(-R)	N-Methyl-D-Aspartat(-Rezeptor)
NSAID	Non-Steroidal Anti-inflammatory Drug
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns

PBS(/T)	Phosphate Buffered Saline (/Tween20)
PEN 2	Presenilin-Enhancer 2
PRR	Pattern Recognition Receptor
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RT	Raumtemperatur
Sphingosin-1-P	Sphingosin-1-Phosphat
Tab.	Tabelle
TBS(T)	Tris Buffered Saline (Tween 20)
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
TLR4	Toll-Like-Receptor 4
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TNFR-1/-2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1/-2
U.a.	Unter anderem
Usw.	Und so weiter
V.a.	Vor allem
Z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1 Zusammenfassung/Summary

### **Pharmakologische Intervention der sauren Sphingomyelinase im Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung**

Der Morbus Alzheimer ist eine bis dato unheilbare progressive Demenz-Erkrankung, die mit charakteristischen neuropathologischen Veränderungen einhergeht. Zu diesen gehören typischerweise die Akkumulation von  $\beta$ -Amyloid und die Ausprägung von neurofibrillären Bündeln. Weiterhin lässt sich eine Aktivierung bzw. Modifizierung von zahlreichen Entzündungsreaktionen beobachten. Inwiefern diese Reaktionen neuroprotektiv bzw. neurodestruktiv wirken, ist jedoch unklar. Ein Enzym, welches im Verdacht steht sowohl die  $\beta$ -Amyloid-Synthese als auch eine Vielzahl an inflammatorischen Prozessen zu beeinflussen, ist die saure Sphingomyelinase (ASM). Eine vermehrte Enzymtätigkeit sowie eine erhöhte Konzentration des zugehörigen Produktes Ceramid in Gehirnproben von Alzheimer-Patienten lassen auf eine bedeutende Funktion der ASM hinsichtlich der Alzheimer-Pathogenese schließen. Daher stellt sich die Frage, ob durch eine Hemmung der ASM die A $\beta$ -Last und die Ausprägung der Entzündungsreaktionen und somit letztendlich die Progression der Erkrankung beeinflusst werden kann.

In TgCRND8-Alzheimer-Mäusen wurde aufgrund dessen untersucht, wie sich eine pharmakologische Hemmung der ASM durch Amitriptylin auf die A $\beta$ -Last, auf verschiedene Entzündungsparameter sowie auf neuroprotektive/-trophe Faktoren auswirkt.

Unter Verwendung der Immunhistochemie ließ sich im Hippocampus der ASM-defizitären TgCRND8-Alzheimer-Mäuse im Vergleich zum selben Areal der ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäuse eine signifikant geringere Iba-1 positive Mikrogliaanzahl nachweisen. Mittels der quantitativen Echtzeit Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion wurde gezeigt, dass die Entzündungsparameter TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  und CCL-2 in Gehirnproben der mit Amitriptylin behandelten Nagetiere signifikant vermehrt exprimiert waren. Der antiinflammatorische Faktor IL-10 wies hingegen eine signifikant geringere Transkriptionsrate auf. Der Spiegel von iNOS wurde durch die Applikation von Amitriptylin nicht wesentlich beeinflusst. Weiterhin konnte durch

diese Methode eine signifikant erhöhte Expression der neuroprotektiven/-trophen Parameter BDNF, Arc und NMDA-R1 in Gehirnproben der ASM-gehemmten Tiere gemessen werden, jedoch keine Veränderung des IGF-1-Spiegels. Darüber hinaus wurde mittels eines ELISAs ein Rückgang der A $\beta$ 42-Last und der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 Relation in Plasmaproben und in Guanidin-Gehirnhomogenaten der mit Amitriptylin behandelten Mäuse sichtbar.

Durch die ASM-Hemmung in TgCRND8-Mäusen resultierten somit neben erhöhten Spiegeln von Entzündungsparametern ein teils signifikanter Rückgang der A $\beta$ -Last und gestiegene Konzentrationen von neuroprotektiven/-trophen Komponenten. Dies rechtfertigt die Annahme einer potenziell positiven Einflussnahme einer ASM-Hemmung durch Amitriptylin auf die Alzheimer-Pathogenese. Allerdings repräsentieren die erhobenen Daten lediglich die Situation in 6 Monate alten TgCRND8 Mäusen. Unklar ist somit, ob die angestiegenen Spiegel der Entzündungsfaktoren unter ASM-Hemmung den Krankheitsprogress vorantreiben oder verzögern, sodass ergänzende Forschungen in weiter fortgeschrittenen Krankheitsphasen nötig sind.

**Pharmacological intervention of the acid sphingomyelinase in a mouse model of the Alzheimer's disease**

Alzheimer's disease is an incurable and progressive dementia that is associated with characteristic neuropathological alterations. Typically these changes comprise the accumulation of  $\beta$ -amyloid and the forming of neurofibrillary bundles. Furthermore, there is an activation or modification of several inflammatory reactions to be found. Still it remains unclear whether these reactions are of neuroprotective or neurodegenerative character. An enzyme that is suspected to influence the  $\beta$ -amyloid synthesis as well as numerous inflammatory processes is the acid sphingomyelinase (ASM). An increased enzyme activity and an elevated concentration of its product ceramide in samples of Alzheimer brains both point out a prominent implication of the ASM in the disease's pathogenesis. This brings up the question whether the inhibition of this particular enzyme might influence not only the  $A\beta$  load and the characteristics of the inflammatory reactions but also the progression of the Alzheimer's disease at last.

Therefore, using TgCRND8 Alzheimer mice it was investigated how the  $A\beta$  burden, miscellaneous parameters of inflammation as well as neuroprotective/-trophic factors can be influenced by pharmacological inhibition of the ASM by amitriptyline.

Applying immunohistochemistry the hippocampus of the ASM-inhibited TgCRND8 Alzheimer mice revealed a significantly lower count of Iba-1 positive microglia compared to the same area of ASM-uninhibited TgCRND8 Alzheimer mice. Quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction showed a significantly higher expression of the inflammatory parameters  $TNF-\alpha$ ,  $IL1-\beta$  and  $CCL-2$  in brain samples of the rodents treated with amitriptyline. On the other hand, the anti-inflammatory factor  $IL-10$  presented a significantly lower transcription rate, while the iNOS level was not affected considerably by the application of amitriptyline. Furthermore, this method demonstrated a significantly higher expression of the neuroprotective/-trophic factors BDNF, Arc and NMDA-R1 in brain samples of the ASM-inhibited animals, whereas there was no difference of the IGF-1 level. Moreover, ELISA revealed a decline of the  $A\beta_{42}$  burden and also of the  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  ratio in both plasma specimen and guanidine-brain homogenates of the mice treated with amitriptyline.

Consequently, ASM-inhibition in TgCRND8 mice resulted in increased levels of inflammatory parameters, a partly significant decrease of the A $\beta$  burden as well as raised concentrations of neuroprotective/-trophic factors. This justifies the assumption that ASM-inhibition can influence the Alzheimer's pathogenesis in a potentially positive way. However, the collected data represent the situation only in 6 months old TgCRND8 mice. Therefore, it still remains uncertain whether the increased levels of the inflammatory parameters in the ASM-inhibited rodents promote or delay the disease's progression so that additional research is needed in more advanced cases of this disease.

## 2 Einleitung

### 2.1 Historie

1906 beschrieb der deutsche Psychiater und Neuropathologe Alois Alzheimer (1864-1915) den klinischen und histologischen Befund einer bis dahin unbekannt Form der Demenz. Er berichtete vom Krankheitsbild einer desorientierten Patientin namens Auguste Deter, die unter einer zunehmenden Gedächtnisschwäche und einer ausgeprägten Aphasie litt. Die 51-Jährige plagten darüber hinaus Verwirrheitszustände, Stimmungsschwankungen und akustische Halluzinationen (1), (2).

Post-Mortem zeigte sich anatomisch ein atrophisches Gehirn ohne makroskopisch sichtbare Herde. Mithilfe der histologischen Silbermethode nach Bielschowsky stellte Alzheimer eine Degeneration kortikaler Ganglienzellen und auffällige neurofibrilläre Bündel dar. Er beobachtete miliare Herde, die er als Einlagerungen einer eigenartigen Substanz in die Hirnrinde begründete (2). Später wurden diese Einlagerungen als beta-Amyloid (A $\beta$ )-Plaques klassifiziert (1).

Anfang des 20. Jahrhunderts forschten neben Alzheimer auch Wissenschaftler wie Bonfiglio, Perusini und Fischer am gleichen Krankheitsbild (3). Jedoch benannte Emil Kraepelin in der 8. Auflage seines Werkes über die Psychiatrie diese Erscheinungsform der Demenz nach seinem Schüler Alois Alzheimer, sodass wir heute von der Alzheimer-Krankheit sprechen (1).

### 2.2 Epidemiologie

In den letzten Jahrzehnten ist durch den steigenden Wohlstand, die verbesserten Arbeitsbedingungen und die enormen medizinischen Entwicklungen die Lebenserwartung in den Industrienationen stetig gestiegen (4). Gegenwärtig beträgt das durchschnittliche Sterbealter eines 2011 geborenen Kindes weltweit 69 Jahre. Speziell in Deutschland kann ein Neugeborenes mit 81 Lebensjahren rechnen (5). Ebenfalls ist die absolute Zahl der über 65-Jährigen von 1990 bis 2009 in Deutschland um 5 Millionen gewachsen (6).

Mit diesem Trend steigt aber auch die Prävalenz und Inzidenz altersbedingter Krankheiten wie die der Demenz (7). Denn 97% aller Demenzleidenden treten oberhalb des

65. Lebensjahres auf, wobei sich mit dieser Grenze die Erkrankungswahrscheinlichkeit alle 5 Jahre verdoppelt (4). Leiden aktuell in Deutschland ca. 1,3 Millionen Menschen an einer Form der Demenz, werden es voraussichtlich 2050 2,6 Millionen sein. Ursächlich ist in 2/3 der Fälle der Morbus Alzheimer, welchen man bis dato nicht kausal behandeln kann (4), (7).

### **2.3 Definition und klinischer Verlauf**

Nach der internationalen Klassifikation der Krankheiten (ICD-10, Version 2012) ist die Demenz als ein Syndrom definiert, welches meist auf einer chronischen oder fortschreitenden Erkrankung des Gehirns basiert und sich durch zahlreiche kortikale Störungen und Defizite äußert (8).

Je nachdem, welcher Ätiologie die vorherrschende Demenz unterliegt, teilt man sie verschiedenen Hauptgruppen zu. Die größte dieser Gruppen ist die der Alzheimer-Erkrankung (9).

Durch die langsam fortschreitenden neuronalen Degenerationen äußert sich der Morbus Alzheimer jedoch nicht sofort im Vollbild der Demenz. Erst wenn ein gewisses Stadium der neuropathologischen Veränderung eintritt, kommt es zu dieser klinischen Manifestation (10), (11), (12).

Im sogenannten präklinischen Stadium ist es somit kaum möglich, die lediglich dezenten Verschlechterungen des Gedächtnisses, des Sprachverständnisses oder der Stimmungslage zu erkennen und zu deuten bzw. sie von einer physiologischen Hirnalterung abzugrenzen (13), (14). Dem präklinischen Stadium folgt die Phase der sogenannten leichten kognitiven Beeinträchtigung. Zu diesem Zeitpunkt ist der Patient noch im Stande, alltägliche Aktivitäten und gewohnte Arbeiten zu verrichten - anders als im anschließendem Stadium, dem der eigentlichen Alzheimer-Demenz (AD) (15). Mit dieser einher geht eine starke Störung des Kurzzeitgedächtnisses und der visuell-räumlichen Orientierung. Das Benennen von Gegenständen oder das Wiedererkennen von Personen stellt den Betroffenen vor eine unlösbare Aufgabe. Exekutive Funktionen wie das Bewältigen von Problemen oder das Urteilsvermögen sind gehemmt. Die Persönlichkeit ist verändert und der häufig apraxische Patient bedarf der ständigen Hilfe (10), (15).

Oftmals kommt es daraufhin durch Immobilisation, Mangelernährung oder Abwehrschwäche zum Tod (16).

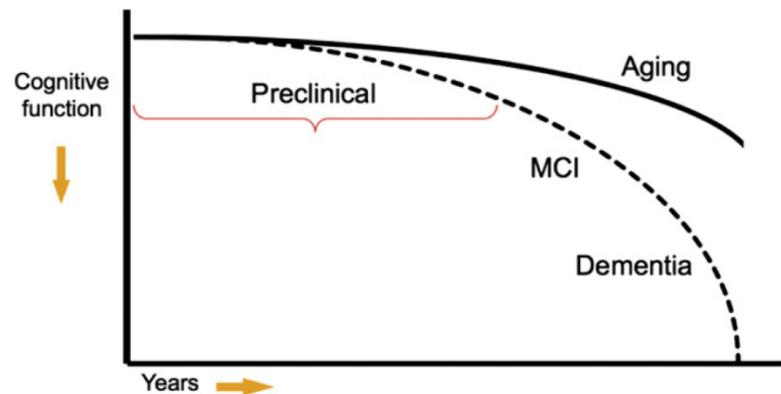


Abb. 1 Der typische Verlauf der Alzheimer-Erkrankung

Charakteristisch für den Morbus Alzheimer ist ein langsam progressiver Verlauf über Jahre hinweg. Er beginnt mit einem präklinischen Stadium, in dem sich die Krankheit klinisch kaum nachweisen lässt, setzt sich in das Stadium der leichten kognitiven Beeinträchtigung fort und mündet im Vollbild der Demenz. MCI= mild cognitive impairment. (Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR, Jr., Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV, Phelps CH. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia, The Alzheimer's Association, 2011, 7,280-292*).

Zum jetzigen Zeitpunkt existiert keine kurative Therapie einer Alzheimer-Erkrankung. Allerdings können medikamentöse Therapien und supportive Behandlungsverfahren Symptome mildern und die Lebensqualität verbessern (17).

## 2.4 Risikofaktoren

Hinsichtlich seines Ausprägungsmusters lässt sich der Morbus Alzheimer in die sporadische und die familiäre Form einteilen. Letztere wird durch Gendefekte bedingt, die eine Überproduktion von A $\beta$ 40 und/oder A $\beta$ 42 zur Folge haben (18). Beispielsweise führt eine Mutation im Amyloid-Precursor-Protein (APP)-Gen oder eine Duplikation dieses Genes, wie es bei der Trisomie 21 vorliegt, zu einem Anstieg von A $\beta$ -Peptiden. Häufiger finden sich jedoch Genmutationen in Präsenilin 1 bzw. 2. Dies führt zu einer Überproduktion des hydrophoben und somit schnell aggregierenden A $\beta$ 42 (18), (19). All diese Genmalformationen resultieren in einer frühzeitigen Akkumulation von A $\beta$  und infolgedessen in einem Erkrankungsalter unter 65 Jahren (18), (19).

Die meisten Fälle der Alzheimer-Erkrankung lassen sich allerdings der später auftretenden sporadischen Variante zuordnen. Prädisponierender Faktor dieser ist das Allel  $\epsilon 4$  des Apolipoproteins E. Dieses Allel ist ebenfalls in der spät beginnenden familiären AD überproportional vertreten (20), (21), (22).

Neben den genetischen Komponenten sind als Risikofaktoren einer Alzheimer-Erkrankung das hohe Alter oder das weibliche Geschlecht bekannt. Ebenso begünstigen Rauchen, ein niedriger Bildungsstand, erhöhte Cholesterinspiegel oder Diabetes mellitus die Pathogenese (23), (24), (25). Desweiteren gibt es Hinweise darauf, dass eine systemische oder lokal begrenzte Inflammation auch außerhalb des ZNS eine Alzheimer-Erkrankung begünstigen kann (26).

## **2.5 Pathogenetische Merkmale**

Die Alzheimer-Erkrankung charakterisiert sich durch einen langsam progressiven Verlauf, der mit typischen neuropathologischen Veränderungen korreliert. Klassischerweise lassen sich histologisch extrazelluläre  $\beta$ -Amyloid-Plaques und intrazelluläre neurofibrilläre Bündel nachweisen (27). Desweiteren kann man neuronale Degenerationen, amyloide Angiopathien und Entzündungsreaktionen erfassen (28).

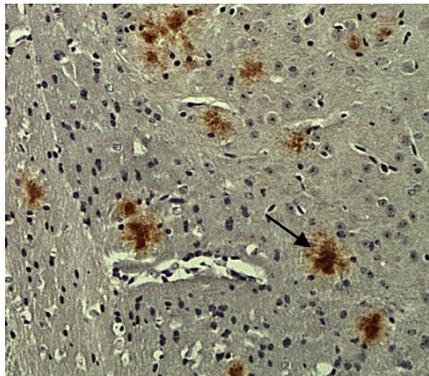
### **2.5.1 $\beta$ -Amyloid**

#### **2.5.1.1 Formationen des $\beta$ -Amyloids**

$\beta$ -Amyloid ist ein Peptid, welches aus dem Vorläuferprotein APP abgespalten wird und je nach Aufbauprozess eine Länge von 36-43 Aminosäuren aufweisen kann (28). Es ist in der Lage, sich zu zahlreichen Formen zusammen zu lagern. So entstehen koexistierende  $A\beta$ -Pools von Monomeren, über lösliche Oligomere bis hin zu fibrillären Plaques aus  $\beta$ -Faltblatt-geformtem Amyloid (28), (29).

Typisch für den Morbus Alzheimer sind extrazelluläre neuritische Plaques. Diese werden hauptsächlich durch filamentöse  $A\beta 40$ - und  $A\beta 42$ -Peptidansammlungen gebildet. Unmittelbar anliegend und im Kern der Ansammlung selbst befinden sich dystrophe Neurite mit modifizierten intrazellulären Strukturen. Die Plaques interagieren mit Mikrogliazellen und Astrozyten (18), (30).

Neben diesen neuritischen Plaques existieren amorph aussehende, nicht-fibrilläre Läsionen. Diese sogenannten diffusen Plaques sind größtenteils aus A $\beta$ 42 aufgebaut und sind weder mit neuritischen Degenerationen noch mit aktivierten Mikrogliazellen assoziiert. Möglicherweise stellen sie eine unreife Form der neuritischen Plaques dar (18), (31).



**Abb. 2 Nachweis von A $\beta$ -Ansammlungen (braun) in einem immunhistochemisch präparierten Gehirnschnitt einer TgCRND8-Alzheimer-Maus**

Verwendet wurde ein monoklonaler Maus Antikörper gegen Human Beta Amyloid (Dako). (Das Foto stammt aus eigener Herstellung).

Eine signifikante Rolle im Krankheitsprozess wird jedoch hauptsächlich den löslichen Oligomeren zugeschrieben. Zahlreiche Studien zeigen, dass v.a. dieser Pool von A $\beta$  mit neuronalen Schäden und kognitiven Defiziten korreliert (19), (32), (33), (34), wohingegen die Rate der Plaques wenig mit den klinischen Symptomen gekoppelt ist (19). Allerdings könnten die Plaques der Alzheimer-Erkrankung ein Reservoir für Oligomere darstellen (18).

Auch in Arteriolen und Venolen des Gehirns eines Alzheimer-Patienten findet man Amyloid-Ansammlungen. Hier liegen filamentöse A $\beta$ 40-Peptide in der Basalmembran der Gefäße (18).

### **2.5.1.2 Pathogenese und Pathophysiologie des $\beta$ -Amyloids**

Die A $\beta$ -Peptide resultieren aus dem Amyloid-Precursor-Protein (APP), einem auf Chromosom 21 kodierten Transmembranprotein Typ 1, welches in neuronalen sowie auch anderen Zellen vorkommt (19). Es besteht aus einem langen extrazellulären Teil,

einem helikalen transmembranösen Bereich und einer kurzen intrazellulären Domäne (27). Dieses APP kann auf zwei Arten prozessiert werden, u.a. möglicherweise abhängig vom Vorliegen des APP innerhalb oder außerhalb von Lipid Rafts (25).

- Im nicht-amyloiden Weg schneidet die  $\alpha$ -Sekretase APP im Bereich der A $\beta$ -Domäne. Es bildet sich sAPP $\alpha$  und ein C-terminales C83-Fragment, welches durch die  $\gamma$ -Sekretase in p3 und AICD gespalten wird. Es entsteht kein A $\beta$  (19), (28).
- Im amyloiden Weg wird der extrazelluläre Anteil des Vorläuferproteins durch die  $\beta$ -Sekretase BACE 1 abgetrennt und sAPP $\beta$  freigesetzt (19), (28). Der verbleibende transmembranöse Anteil, auch CTF $\beta$  oder C99 genannt, bindet an den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex, welcher aus Präsenilin 1 oder 2, APH1, PEN2 und Nicastrin besteht (19), (28). Der Komplex spaltet CTF $\beta$  im Bereich der Lipidmembran und erzeugt A $\beta$  sowie AICD. Abhängig davon, nach welcher Aminosäure die  $\gamma$ -Sekretase schneidet, entstehen unterschiedlich lange A $\beta$ -Peptide (19).

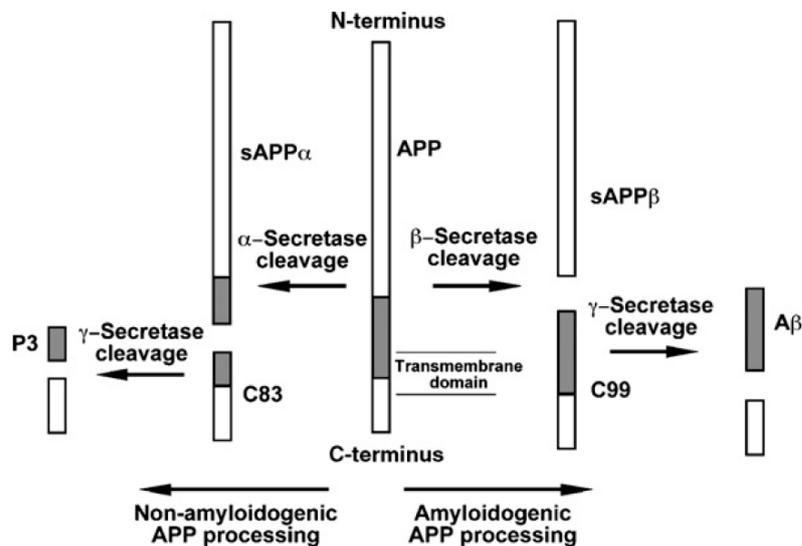


Abb. 3 Sekretase-abhängige Prozessierung des APP

Abhängig von der Sekretase wird das APP innerhalb oder außerhalb der amyloidbildenden Sequenz geschnitten. So führt nur die kombinierte Verarbeitung durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase zum A $\beta$ -Produkt. (Crouch PJ, Harding SME, White AR, Camakaris J, Bush AI, Masters CL. Mechanisms of A $\beta$  mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2008. 40, 2, 181-198).

Die Produktion von A $\beta$ -Monomeren ist ein physiologischer Prozess (35). Entwickelt sich jedoch eine Dysbalance zwischen Auf- und Abbau der A $\beta$ -Peptide, kann dies zur Akkumulation von A $\beta$  und so möglicherweise zur Alzheimer-Erkrankung führen (28). Dementsprechend lässt sich - v.a. bei der familiären Alzheimer-Form - ein verschobenes A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Peptidverhältnis zu Gunsten der leichter aggregierenden A $\beta$ 42-Monomere beobachten (19), (28). Die A $\beta$ -Monomere lagern sich zu Oligomeren zusammen und bilden darüber hinaus fibrilläre Amyloid-Plaques, die von Entzündungsreaktionen und neuritischer Dystrophie begleitet werden (19).

Die entstandenen A $\beta$ -Peptide begünstigen, hauptsächlich in ihrer Oligomerenform, über komplexe Prozesse eine Reihe von Veränderungen. Beispielsweise interagieren sie an präsynaptischen  $\alpha$ -7 Nicotin-Acetylcholin-Rezeptoren und hemmen die Acetylcholin-Freisetzung (28), (36). Auch modifizieren sie das synaptische Profil, indem sie die Endozytose von NMDA- und AMPA-Rezeptoren erleichtern (28). Ferner lässt sich experimentell in Zellen durch A $\beta$ 42-Oligomer-Exposition ein Defizit des für Gedächtnisleistungen wichtigen Neurotrophins BDNF's bzw. dessen Transkripts erzeugen (28), (37). Intrazellulär richtet A $\beta$  Schaden an, indem es reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen generiert. Dies führt zu Ionenungleichgewichten, eingeschränktem Glukosetransport und indirekt zu einer Phosphorylierung und Aggregation von Tau (28). Darüber hinaus attackiert A $\beta$  wichtige Enzyme in den Mitochondrien, infolgedessen die Energieproduktion, der Sauerstoffmetabolismus und das Membranpotenzial der Mitochondrien verändert werden (28).

Letztendlich endet diese Kaskade in einer zunehmenden neuronaler Dysfunktion, dem Absterben zahlreicher Zellen und in einer progressiven klinischen Symptomatik (19).

### **2.5.2 Neurofibrilläre Bündel**

Ein weiteres Kennzeichen der Alzheimer-Erkrankung ist die Anhäufung neurofibrillärer Bündel im Zellsoma und neuropiler Fäden in distalen Anteilen der Dendriten (11), (38). Diese pathologischen Veränderungen lassen sich nach ihrer Ausbreitung in sechs Stadien einteilen, die mit der klinischen Symptomatik korrelieren (11), (39) Sie beginnen in der transentorhinalen Area, setzen sich in limbische Regionen fort und erreichen schließlich den Isocortex (39). Hauptkomponente dieser neurofibrillären

Bündel und neuropilen Fäden sind atypisch phosphorylierte Tau-Proteine, welche zu gepaarten helikalen oder geradlinigen Filamenten aggregieren (28), (38).

In seiner physiologischen löslichen Form ist Tau für die Stabilisierung der Mikrotubuli und für den Vesikeltransport verantwortlich. Diesen Aufgaben kann das unlösliche hyperphosphorylierte Tau nicht mehr nachgehen. Es kommt zum Zerfall des Zytoskeletts und somit auch zur Einschränkung des axonalen Transports (28).

Ursächlich für die Aggregation und Phosphorylierung von Tau könnte laut zahlreichen Studien A $\beta$  sein (28), (40), (41). Z.B. kann durch A $\beta$ -induzierte Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen oder A $\beta$ -vermittelter Dysregulation der Zyklin-abhängigen Kinase Cdk5 eine Phosphorylierung des Taus resultieren (18), (28), (42). Wiederum ist das entstandene Tau wahrscheinlich relevant, um A $\beta$ -induzierte Schäden zu vermitteln wie z.B. die Verminderung der synaptischen Plastizität und somit von Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippocampus (43).

## 2.6 Morbus Alzheimer und das Immunsystem

Gewebsschädigende Prozesse und Faktoren wie Infektionen, Verletzungen oder Stress führen im menschlichen Organismus zu einer Aktivierung komplexer Abwehrmechanismen. So werden über bestimmte Stimuli zahlreiche interagierende Reaktionen unseres angeborenen und erworbenen Immunsystems induziert, um den Körper zu verteidigen (16), (44).

In der Alzheimer-Erkrankung fungieren als derartige Stimuli beispielsweise A $\beta$ , neurofibrilläre Bündel, Faktoren des Immunsystems selbst und später auch geschädigte Neurone (31), (45), (46), (47). Primär wirken die angestoßenen Immunreaktionen neuroprotektiv, indem sie beispielsweise die A $\beta$ -Last minimieren und somit den Krankheitsverlauf verzögern sollen (48). In diesem Sinne erlauben Chemokine wie das CCL-2 die Rekrutierung von peripheren Monozyten, welche sich in Phagozytose leistende Mikrogliazellen umwandeln und die A $\beta$ -Last minimieren (49), (50). Weiterhin werden zahlreichen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  oder dem Komplementsystem neuroprotektive und/oder vor A $\beta$  schützende Effekte zugeschrieben (31), (51), (52).

Allerdings kann eine permanente Stimulation des Immunsystems, ausgelöst beispielsweise durch Stressoren wie A $\beta$  oder durch das Immunsystem selbst, auch gegenteilig wirken (31), (44), (45). Die Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren

wie Zytokine oder akute Phase Proteine, die Aktivierung von Enzymen wie der iNOS oder der COX-2 sowie die Initiierung des Komplementsystems und Rekrutierung von weiteren Entzündungszellen können zu neurologischen Dysfunktionen und Degenerationen führen (31). Forschungsergebnissen zufolge wird eine Entgleisung des Immunsystems bei Alzheimer-Patienten durch die Degeneration von aminergen, entzündungshemmenden Nervenzellen im Locus Ceruleus und Nucleus Basalis Meynert weiter unterstützt (31). Darüber hinaus können Mediatoren des Abwehrsystems *direkten* Einfluss auf die Pathogenese der Alzheimer-Krankheit nehmen. So verändert beispielsweise TNF- $\alpha$  in Kombination mit IFN- $\gamma$  die Prozessierung von APP zu Gunsten der A $\beta$ -Last (31), (53), (54), (55).

Entsprechend lassen sich neben A $\beta$  und den neurofibrillären Bündeln als dritter entscheidender Faktor entzündliche Veränderungen in Alzheimer-Patienten beobachten, welche sowohl positive wie auch negative Effekte ausüben (31).

## 2.7 Morbus Alzheimer und Mikrogliazellen

Besonders das angeborene Abwehrsystem spielt in der Alzheimer-Erkrankung eine wesentliche Rolle (46). Eine zugehörige Komponente ist die Mikrogliazelle, eine spezialisierte Makrophage des Zentralen Nervensystems (26). Schon in der Embryonal- und Fetalperiode immigrieren vom Dottersack abstammende Mikroglia- Vorläuferzellen in das ZNS (56). Postnatal werden unter bestimmten pathologischen Bedingungen wie z.B. A $\beta$ 40- bzw. 42-Produktion darüber hinaus wahrscheinlich vom Knochenmark-abgeleitete Monozyten rekrutiert (26), (49), (56). Auch die ortsansässigen Mikrogliazellen werden dann aktiviert, proliferieren und akkumulieren. Dies bezeichnet man als Mikrogliose (56). Aufzuzeigen ist jedoch, dass sich die Eigenschaften der eingewanderten und der ortsansässigen Mikroglia unterscheiden. So bestehen z.B. Hinweise, dass vom Knochenmark abstammende Zellen eine effizientere A $\beta$ -Elimination betreiben (49), (56).

Die Mikrogliazelle ist charakteristischerweise durch ihre zahlreichen Zellarmchen in der Lage, mit umliegenden Neuronen und Gliazellen zu kommunizieren (26). Sie gewährleistet durch die Ausschüttung von neurotrophen Faktoren wie IGF1, BDNF, TGF $\beta$  oder NGF sowie gezielter Phagozytose eine Homöostase im ZNS (26), (56).

Darüber hinaus detektiert die Mikrogliazelle als eine der ersten aktiven Abwehrzellen im ZNS mithilfe des Komplementsystems Pathogene und wandert zum Schädigungsort (16), (46), (57). Demgemäß lassen sich auch schon in frühen Stadien der Alzheimer-Krankheit Ansammlungen von aktivierten Mikrogliazellen dokumentieren (55), (58). Beispielsweise werden durch A $\beta$  als potentiellen Schädigungsfaktor, den es zu beseitigen gilt, zahlreiche mikrogliale Rezeptoren wie Toll-Like Rezeptoren (TLR), NLRP3 oder RAGE aktiviert (26). Die polarisierten Mikrogliazellen produzieren proinflammatorische Mediatoren wie Zytokine, Chemokine, Prostaglandine, Radikale und aktivieren eine T-Zell-Antwort, das Komplementsystem sowie umliegende Astrozyten. U.a. tragen letztere zu einer Amplifikation der Entzündungsreaktion bei, indem sie ebenfalls entzündungsvermittelnde Faktoren produzieren und weitere Mikrogliazellen stimulieren (26), (31), (59).

In Abhängigkeit der Stimuli konvertieren die Mikrogliazellen in verschiedene, aktivierte Phänotypen, mit bestimmten/r Oberflächenrezeptoren und Morphologie (26), (31), (60). Man differenziert einen klassischen (M1) und einen alternativen (M2) Aktivierungstyp. Im ersten agiert die Mikrogliazelle im Sinne der Defensivantwort. Sie produziert proinflammatorische Botenstoffe und NO. In der Alzheimer-Pathogenese ist dieser Phänotypus mit neurotoxischen Auswirkungen verbunden, jedoch auch mit der Sekretion von CCL-2, ein für die Rekrutierung von Phagozyten zu Amyloid-Depots verantwortliches Chemokin. Dagegen wirkt der M2-Aktivierungsstatus von Mikrogliazellen eher neurotroph und antiinflammatorisch (26), (57), (61), (62). Die Tatsache, dass in der Alzheimer-Erkrankung eine kombinierte Ansammlung der obigen Mikroglia-Phänotypen vorliegt, lässt auf die Komplexität der ablaufenden Immunreaktionen schließen (60), (62).

In Anbetracht der obigen Erläuterungen nehmen die Mikrogliazellen in der Alzheimer-Erkrankung eine gespaltene Rolle ein, welche es weiter zu erforschen gilt. Auf der einen Seite wirken sie durch die Ausschüttung von neurotrophen Substanzen und der Phagozytose von A $\beta$  neuroprotektiv. Andererseits kann eine Stimulation dieser Zellen mit schädigenden Auswirkungen verbunden sein (26), (49). Hinzu kommt, dass höchst wahrscheinlich zwei Pools von Mikrogliazellen existieren, der der ortsansässigen und der vom Knochenmark eingewanderten Monozyten, welche aufgrund ihrer andersartigen Phänotypen unterschiedlich in der Alzheimer-Pathogenese agieren (49), (56).

Anzumerken ist, dass neben den Mikrogliazellen weitere Gruppen von sogenannten ZNS-assoziierten Makrophagen existieren, etwa die perivaskulären oder die meningealen Makrophagen, sowie die Plexus choroideus-spezifischen Makrophagen. Sie grenzen sich durch ihre Morphologie, ihren Phänotypus und ihren Wirkungsort von der typischen Mikrogliazelle ab (56).

## **2.8 Die Bedeutung von Rezeptoren und Membran Rafts in der Alzheimer-Erkrankung**

Notwendig für die Registrierung und Abwehr von Stressoren sind sogenannte „Pattern Recognition Receptors“ (PRR's). V.a. Mikrogliazellen und Astrozyten weisen ein umfangreiches Sortiment dieser Rezeptoren auf, wodurch sie fremde Pathogene, sogenannte Pathogen-Associated Molecular Patterns“ (PAMPs) und körpereigene, schädliche Strukturen „Danger-Associated Molecular Patterns“ (DAMPs) detektieren. In der Alzheimer-Krankheit fungiert u.a. A $\beta$  als DAMP für PRR wie z.B. die Toll-Like Rezeptoren auf den Gliazellen (26), (59), (63). Durch die Aktivierung von TLR wird die A $\beta$ -Phagozytose durch Mikroglia angeregt, allerdings werden auch (neurotoxische) Entzündungsmediatoren freigesetzt (31).

Entscheidend für die Funktion von PRR auf der Zelloberfläche sind Lipid Rafts bzw. Membrane Rafts. Nach passendem Stimulus diffundieren beispielsweise zahlreiche TL-Rezeptoren in solche Rafts und erleichtern die Immunantwort (64). Diese Membrane Rafts sind versatile, heterogene Domänen in der Membran der Zellen von 10-200nm Größe. Sie werden aus Sterolen, v.a. Cholesterin und Sphingolipiden gebildet und formen bewegliche, abgegrenzte Kompartimente in der Plasmamembran, aber auch in der Membran von Zellorganellen. Durch Protein-Lipid- oder Protein-Protein-Interaktionen können sich kleine Domänen zu größeren organisieren (25), (65). Allgemein führen Rafts Signalmoleküle zu verschiedenen reagiblen Einheiten zusammen und gewährleisten auf diese Weise eine transmembrane Signaltransduktion (66). Abgesehen davon beeinflussen sie viele weitere zelluläre Prozesse. Vermutet wird, dass A $\beta$  bevorzugt in solchen Regionen produziert wird. Zu beachten ist eine Hypothese, die besagt, dass APP und BACE1 in unterschiedlichen Rafts lokalisiert sind und nur nach Zusammenschluss der Rafts die A $\beta$ -Produktion ermöglicht wird (25).

Entscheidend für die Funktionalität dieser Rafts sind deren Bestandteile. So lässt sich eventuell der Einfluss von Cholesterin auf die Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung erklären (67). Zudem müssen weitere Bestandteile der Rafts begutachtet werden, wie das Ceramid, ein Sphingolipid, welches u.a. durch die Sphingomyelinase erzeugt wird (66).

## 2.9 Morbus Alzheimer und die saure Sphingomyelinase

In menschlichen Zellen existieren diverse Arten der sogenannten Sphingomyelinase, ein Enzym, welches eine entscheidende Rolle im Aufbau der obigen Lipid Rafts sowie der Signaltransduktion einnimmt. Die verschiedenen Arten differenzieren sich u.a. bezüglich des pH-Wertes in ihrer maximalen Funktionsfähigkeit, der Zelllokalisierung und ihrer Kofaktoren (66), (68).

Speziell die saure Sphingomyelinase (=ASM) ist  $Zn^{2+}$  abhängig und hauptsächlich in Lysosomen und Endosomen lokalisiert. Es existiert jedoch auch eine sekretorische Form. Die ASM ist charakterisiert durch ein pH-Leistungsoptimum von 4,5, katalysiert wahrscheinlich aber auch unter einem höheren pH-Wert (69), (70), (71). Dies ist auch nötig, denn in Reaktion auf bestimmte Stimulanzen fusionieren die Lysosomen mit der Zellmembran und transportieren das Enzym auf dessen äußeres Blatt. Somit gerät die ASM in Kontakt mit ihrem Substrat, dem Sphingomyelin in der Membran. Dieses wird durch das Enzym in Ceramid und Phosphorylcholin hydrolysiert. Nachfolgend schließen sich die derartig synthetisierten Ceramidmikrodomänen zu reagiblen Makroplattformen zusammen. So werden die Eigenschaften von Lipid Rafts verändert bzw. die Rafts „aktiviert“. Sie gewinnen an Größe und Stabilität, Rezeptor- und Signalmoleküle in der Zellmembran werden reorganisiert oder gruppiert. Resultat ist eine Amplifikation oder Veränderung von Signalkaskaden (66), (72), (73).

Durch diese Ceramid-angereicherten Domänen erfolgt somit eine Transmission des ursprünglichen Stimulus mit nachfolgender Verstärkung zu einem effizienten Signal. Auf diese Weise initiieren Ceramid-Rafts beispielsweise die Apoptose (74).

Durch die Modifikation der Membran durch Ceramideinlagerungen werden aber auch Membranfusions- und Aufspaltungsprozesse, die Vesikelbildung sowie vesikulärer Transport und somit ebenfalls zelluläre Signalwege beeinflusst. Es ist zu beobachten, dass Ceramid neben der Apoptose eine Vielzahl an zum Teil kontroversen Aufgaben

erfüllt. Etwa spielt es eine Rolle in proliferativen und differenzierenden Reaktionen, aber auch dem Alterungsprozess. Ob Ceramid selbst als Sekundärbotenstoff agiert oder seine zahlreichen Auswirkungen auf zelluläre Prozesse durch die Modifizierung der Membran resultieren, bleibt unklar (75). Hinzu kommt, dass Ceramid als Ausgangsstoff für anderer Strukturen dient, welche ebenfalls unterschiedlichste umweltspezifische Funktionen innehalten, sodass eine differenzierte Zuordnung der Stoffe zu bestimmten Aufgaben erschwert wird (76). Z.B. wird Ceramid mithilfe der sauren Ceramidase in Sphingosin metabolisiert. Dieses wird weiter zu Sphingosin-1-Phosphat (Sphingosin-1-P) phosphoryliert, ein Produkt mit neuroprotektiven Eigenschaften (68).

Studien zufolge kann A $\beta$  zu einer Aktivierung des Sphingomyelinase-Ceramid Stoffwechselweges führen und (neuronalen) Apoptose einleiten. Vermutlich wird durch Ceramid wiederum die A $\beta$ -Produktion gesteigert, welche abermals die Aktivität der ASM fördert. Entsprechend lässt sich in Alzheimer-Patienten eine erhöhte ASM-Aktivität bzw. ein erhöhter Ceramidlevel dokumentieren (70), (73) (77), (78). Darüber hinaus ist der Sphingosin-1-Phosphat Spiegel reduziert, wodurch die Ceramidproduktion wahrscheinlich ebenfalls weiter angetrieben wird. So entsteht eine massive Dysbalance des Ceramid/Sphingosin-1-Phosphat Spiegels zu Gunsten des Zelltodes (70). Diese Umstände drängen zu einer weiteren Erforschung der zum Teil paradoxen Funktion und Auswirkungen der ASM und zur Untersuchung der damit einhergehenden inflammatorischen Reaktionen in der Alzheimer-Erkrankung.

Beachtet werden muss, dass auch andere Arten der Sphingomyelinasen sowie die Neusynthese von Ceramid den Konzentrationsspiegel dieses Stoffes beeinflussen (68).

## **2.10 FIASMA (Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase)**

Die ASM lässt sich auf zwei Arten in ihrer Funktion beschränken. Direkte Hemmstoffe interagieren unmittelbar mit der sauren Sphingomyelinase, indirekte Blocker bewirken über eine funktionale Hemmung eine Verminderung der Enzymaktivität. Eine klinisch höhere Relevanz besitzen zum jetzigen Zeitpunkt die funktionalen Inhibitoren der ASM (FIASMA) (68).

Diese Substanzgruppe setzt sich aus kationischen, amphiphilen Stoffen mit unterschiedlichen Strukturformeln, aber gemeinsamen physiochemischen Eigenschaften zusammen. Da die ASM im sauren Milieu der Lysosomen lokalisiert ist, müssen die

FIASMA fähig sein, die Zell- sowie Organellmembran zu diffundieren, um an ihren Wirkort zu gelangen. Diese Bedingung wird durch ihre Lipophilie (identifizierter log P-Wert der Hemmstoffe  $\geq 2,3$ ) realisiert. Aufgrund ihres basischen Charakters ( $pK_a$ -Wert der FIASMA  $\geq 8,1$ ) reagieren sie in den Organellen mit Protonen und verlieren ihre Fähigkeit, die Lysosomen über die Membran zu verlassen; ein als *Lysosomotrophismus* bezeichnetes Phänomen. Durch diese Akkumulation erreichen die FIASMA einen relativ hohen Konzentrationsspiegel (68), (73), (79).

Unter normalen Bedingungen schützt sich die saure Sphingomyelinase vor Proteolyse und somit einer Inaktivierung durch elektrostatische Bindung an die intralysosomale Membran. Eine hohe intralysosomale Konzentration der obigen FIASMA löst jedoch die ASM von der inneren Membran und bewirkt eine Deaktivierung dieser (68), (73).

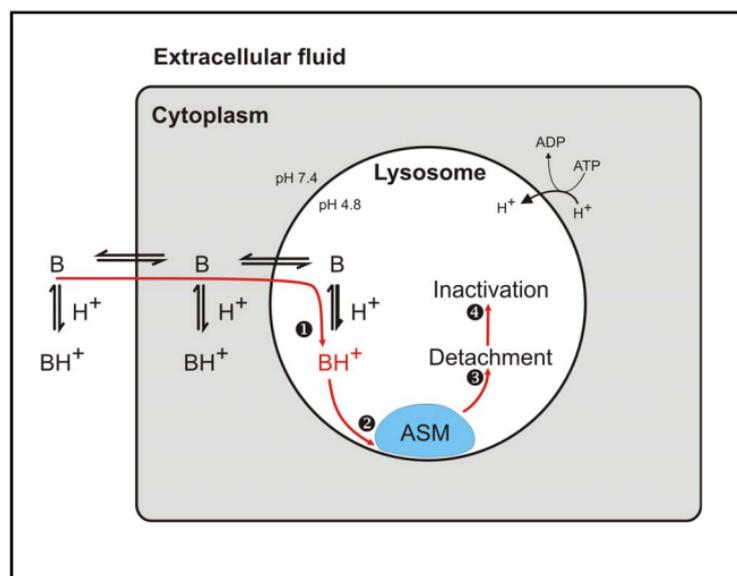
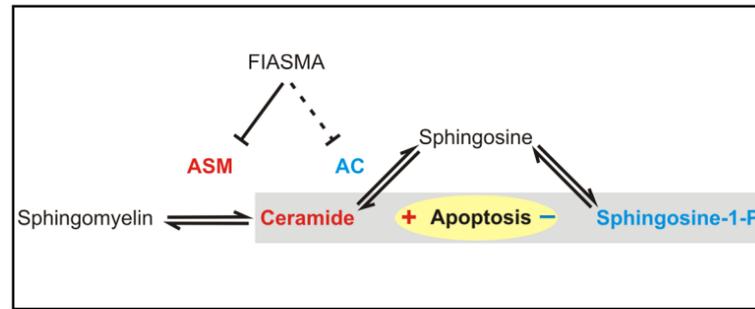


Abb. 4 Schematische Darstellung der Wirkungsweise von funktionellen Hemmstoffen der ASM

FIASMA sind in der Lage, die Membran zu überqueren und an ihrem Zielort, den Lysosomen, zu akkumulieren. Dort lösen sie die ASM von der Organellenmembran und bewirken so deren Hemmung. (Kornhuber J, Tripal P, Reichel M, Terfloth L, Bleich S, Wiltfang J, Gulbins E; *Identification of New Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase Using a Structure-Property-Activity Relation Model. J. Med. Chem.*, 2008. 51;2;219-237).

Durch diese Deaktivierung der ASM kann das Enzym ihr Substrat Sphingomyelin nicht mehr in Ceramid umbauen. Der Ceramidlevel reduziert sich und folglich beispielsweise auch die Apoptoserate. Es ist zu beachten, dass viele FIASMA weitere lysosomal gelegene Enzyme beeinflussen können wie z.B. die saure Ceramidase (AC) (68).



**Abb. 5 Ceramid/Sphingosin-1-Phosphat-Verhältnis**

Durch die Hemmung der ASM mittels FIASMA reduziert sich der Ceramidspiegel und somit die Apoptoserate. (Kornhuber J, Tripal P, Reichel M, Mühle C, Rhein C, Muehlbacher M, Groemer TW, Gulbins E. *Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMA): A Novel Pharmacological Group of Drugs with Broad Clinical Applications. Cell Physiol Biochem, 2010. 26;09-20*).

In den letzten Jahren hat man eine große Anzahl solcher FIASMA identifiziert (68), (73), (79), (80). Ein einsetzbares Medikament dieser Gruppe und auch in hiesiger Dissertation verwendetes Mittel ist das Amitriptylin (80). Dieser Stoff gehört der Gruppe der trizyklischen Antidepressiva an und wird als solches aufgrund der Hemmung der synaptischen Wiederaufnahme von Serotonin und Noradrenalin verwendet (81). Für seinen Einsatz als Hemmstoff der sauren Sphingomyelinase wirken sich ein log P-Wert von 5,04 und ein pKs-Wert von 9,4 des Amitriptylins vorteilhaft aus (79), (80).

## 2.11 Morbus Alzheimer und Entzündungsmediatoren/-faktoren

Die gesteigerte Immunantwort in der Alzheimer-Erkrankung spiegelt sich in erhöhten Konzentrationen unterschiedlichster Entzündungsfaktoren, beispielsweise TNF- $\alpha$ , in Gehirngewebe, Liquorflüssigkeit sowie im Serum von Alzheimer-Patienten wieder (82), (83). Ursächlich ist u.a. die A $\beta$ -induzierte Sekretion von Entzündungsmediatoren durch Zellen wie die Mikrogliazelle. Die Mediatoren tragen nicht selten wiederum zu einer Begünstigung der A $\beta$ -Produktion bei oder bedingen neuronale Schäden. Allerdings üben einige Mediatoren wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  auch neuroprotektive Funktionen aus (31), (83), (84).

Anzunehmen ist, dass die ASM die Produktion bestimmter Mediatoren beeinflussen kann, wobei nicht abschließend geklärt ist, ob das Enzym die Produktion fördert oder hemmt (85), (86).

Einige wichtige Stoffe, welche es gilt, auf ihre Interferenz mit der ASM in der Alzheimer-Krankheit zu untersuchen, sind unten dargestellt.

**IL-1 $\beta$**  (Interleukin-1 $\beta$ ): Das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  übernimmt vielfältige Funktionen. Beispielsweise steigert es die Aktivität von Enzymen wie der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und der Acetylcholinesterase. Weiterhin regt es in Astrozyten die Produktion von Mediatoren wie IL-6 und M-CSF an oder stimuliert über den IL-1R 1 die Synthese von Neurotrophinen wie NGF und CNTF (31), (45), (82), (83).

Möglicherweise ist IL-1 $\beta$  auch in der Entwicklung von hyperphosphoryliertem Tau involviert und unterdrückt hippocampale LTP (31). Auf der anderen Seite existieren Studien, welche IL-1 $\beta$  eine positive Einflussnahme in der Alzheimer-Pathologie zuschreiben. Beispielsweise zeigt die Publikation von Shaftel und Kollegen, dass IL-1 $\beta$  die A $\beta$ -Last reduzieren kann (84).

**TNF- $\alpha$**  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ): TNF- $\alpha$  ist ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin mit sowohl neuroprotektivem als auch -degenerativem Charakter. So kann TNF- $\alpha$  einerseits zum Absterben neuronaler Zellen führen und die A $\beta$ -Produktion fördern, andererseits Neurone vor Radikalen oder A $\beta$  schützen. Unklar ist, wovon diese kontroversen Einflussnahmen abhängen - denkbar wäre eine Abhängigkeit von den untersuchten Zelltypen und Spezies oder von verschiedenen TNF- $\alpha$ -Rezeptortypen und ihren anschließenden Signalwegen (31), (45), (83).

**CCL-2 (=MCP-1)** (Chemokine (C-C motif) Ligand 2 (=Monocyte Chemotactic Protein-1): Die große Gruppe der Chemokine formiert sich aus vier Hauptfraktionen, wobei die Einteilung der Moleküle von der Anzahl und Anordnung der Cysteingruppen am Aminoterminus abhängt (45). Ein wichtiges Mitglied einer dieser Untergruppen, der CC-Subspezies, ist das CCL2 (31). CCL2 reguliert die Rekrutierung und Infiltration von peripheren Monozyten (60), wahrscheinlich indem endotheliale Zellen der Bluthirnschranke den Mediator sezernieren und auf diese Weise im Blut zirkulierende Monozyten über einen CC-Rezeptor 2 kontaktieren und anlocken (50). Desweiteren lassen sich in der Alzheimer-Erkrankung Ansammlungen des Chemokins um reife senile Plaques und aktivierte Mikrogliazellen herum dokumentieren (31).

**iNOS** (Inducible Nitric Oxide Synthase): Durch einen Reiz initiiert, exprimieren Mikrogliazellen, Makrophagen und Astrozyten in sehr kurzer Zeit ein Enzym namens

iNOS. Dieses erzeugt das zytotoxische Radikal NO, welches der Bekämpfung von Mikroorganismen und Tumorzellen dient, aber auch gesunde Zellen schädigen kann (31).

So scheint iNOS auch in der Alzheimer-Pathologie eine Rolle zu spielen. Beispielsweise kann A $\beta$  über die Aktivierung der iNOS von Mikrogliazellen zu einer Verschlechterung der NMDA-R vermittelten LTP führen (31), (87).

**IL-10** (Interleukin-10): Dem proinflammatorischen System stehen entzündungshemmende Faktoren gegenüber. Ein solch antagonisierender Botenstoff ist IL-10 (31). Zu seinen Aufgaben gehört die Unterdrückung der T-Zellantwort, u.a. durch die Hemmung der Antigenpräsentation. Letztere wird mitunter durch die Zurückhaltung von Peptid geladenen MHCII Partikeln im Zytosol bewerkstelligt. Dennoch steigert es die Phagozytose, wahrscheinlich durch die Aufbauförderung von Fc-Rezeptoren an der Zelloberfläche von Phagozyten. Weiterhin antagonisiert es diverse proinflammatorische Zytokine und Chemokine (88). So unterdrückt es z.B. die A $\beta$ -induzierte Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (89). IL-10 zusammen mit Mediatoren wie TGF $\beta$  begrenzen die durch einen Stimuli induzierte Immunantwort und schützen somit den angegriffenen Organismus vor seiner eigenen Immunreaktion (88).

## **2.12 Morbus Alzheimer und die neuronale Integration bzw. Funktion**

Der Morbus Alzheimer ist eine mit kognitiven Defiziten einhergehende Erkrankung. Demensprechend ist es nicht verwunderlich, dass diese Krankheit mit veränderten Spiegeln bzw. Ausprägungen neurotropher/neuroprotektiver Mediatoren wie IGF-1 und Rezeptoren beispielsweise des NMDA-R, korreliert (28), (90). Eine therapeutische Überlegung ist somit, die Expression neurotropher Stoffe anzuregen und derartig möglicherweise Gedächtnisleistungen zu verbessern. Weiterhin stellt sich die Frage, inwiefern eine ASM-Hemmung die Produktion solcher Stoffe beeinflusst, sodass unten dargestellte Parameter in der hiesigen Dissertation untersucht wurden.

**BDNF** (Brain-Derived Neurotrophic Factor): BDNF ist ein für das neuronale Überleben und die synaptische Funktionalität wichtiges Neurotrophin. In der Alzheimer-Krankheit lassen sich verminderte Spiegel eruieren und korrelieren mit fehlerhafter Langzeitpotenzierung und kognitiver Leistungsminderung (28), (37).

**NMDA-R** (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor): Der NMDA-Rezeptor gehört zu den glutamatgesteuerten Kationkanälen, welcher Calcium und Natriumionen in die Zelle schleust. Er ist wichtig für den Lernprozess und die Gedächtnisleistungen. In einem physiologischen Aktivitätsgleichgewicht fördern diese Rezeptoren neuronales Überleben. In einem chronischen- oder überaktivierten Zustand, können sie allerdings auch zum Zelltod führen (91).

A $\beta$  begünstigt die Endozytose von NMDA-Rezeptoren an Nervenzellen und somit eine synaptische Dysfunktion (28). Paradoxerweise trägt in der Alzheimer-Erkrankung ein Ca<sup>2+</sup> Einstrom über diesen Rezeptor in die Zelle zu einer resultierenden Ca<sup>2+</sup> Überlastung im Zytosol und den Mitochondrien bei, wodurch Zelldegenerationen begünstigt werden. Im diesem Sinne werden in der Alzheimer-Therapie NMDA-Rezeptor-Blocker wie das Memantin eingesetzt (28).

**Arc** (Activity-Regulated Cytoskeleton-Associated Protein): Anzunehmen ist, dass in Reaktion auf synaptische Aktivität, nicht zuletzt durch BDNF oder NMDA-R, intrazelluläre Signalkaskaden angestoßen werden, welche die Synthese von Arc-mRNS zur Konsequenz haben. Mithilfe von Mikrotubuli wird die mRNS in die Dendriten transportiert und translatiert. Dort optimiert Arc vermutlich durch F-Aktin die synaptische Plastizität und somit die Speicherung und Konsolidierung von eingehenden Informationen (92).

**IGF-1** (Insulin-Like Growth Factor 1): IGF-1 agiert als ein neuroprotektiver Botenstoff. Es unterstützt die Genese und Differenzierung der Neuronen und antagonisiert TNF- $\alpha$ . Ferner fördert es den Abbau von A $\beta$  und reduziert (evtl. dadurch) die Last der hyperphosphorylierten Tauproteine (90).

### 2.13 Fragestellungen und Ziele dieser Arbeit

Wie in der Einleitung aufgezeigt, wird der Neuroinflammation in der Alzheimer-Erkrankung eine bivalente Funktion eingeräumt, welche wahrscheinlich von der ASM-Enzymarbeit moduliert wird (31), (70), (85), (86), (93). Allerdings sind die Interferenzen zwischen der ASM und der Inflammation sowie der Alzheimer-Pathologie unbefriedigend geklärt. Eine vermehrte Enzymtätigkeit sowie ein erhöhter Ceramidlevel bei Alzheimer-Probanden lassen jedoch auf eine pathogenetische Funktion spekulieren und animieren zur weiteren Forschung (70).

Unter dieser Prämisse sollen mittels eines Alzheimer-Mausmodells die Auswirkungen einer pharmakologischen Hemmung der sauren Sphingomyelinase durch Amitriptylin studiert werden. Hierdurch sollen neue Informationen über die Bedeutung einer therapeutischen Intervention der ASM bei der Alzheimer-Erkrankung gewonnen werden.

Folgende Fragestellungen gilt es zu beantworten bzw. näher zu untersuchen:

Fragestellung 1: Wie wirkt sich die Gabe von Amitriptylin als Hemmstoff der ASM auf die Mikrogliaanzahl im Gehirn von TgCRND8-Alzheimer-Mäusen aus (IHC)?

Fragestellung 2: Wie wirkt sich die Gabe von Amitriptylin als Hemmstoff der ASM auf die  $\beta$ -Amyloid-Last im Gehirn und im Plasma von TgCRND8-Alzheimer-Mäusen aus (IHC, ELISA)?

Fragestellung 3: Wie wirkt sich die Gabe von Amitriptylin als Hemmstoff der ASM auf die Aktivität des Immunsystems aus, gemessen anhand der Analyse der mRNS-Transkriptionsrate von iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL-2 und IL-10 in Gehirnproben von TgCRND8-Alzheimer-Mäusen (qRT-PCR)?

Fragestellung 4: Wie wirkt sich die Gabe von Amitriptylin als Hemmstoff der ASM auf die Expression von neurotrophen/neuroprotektiven Stoffen aus, gemessen anhand der Analyse der mRNS-Transkriptionsrate von IGF-1, BDNF, Arc, NMDA-R1 in Gehirnproben von TgCRND8-Alzheimer-Mäusen (qRT-PCR)?

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Arbeitsmaterialien

Tab. 1: Geräte

Bezeichnung	Firma
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Brutschrank (Typ A)	Melag, Berlin, Deutschland
Digital Camera DXM1200	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Eismaschine	Eurfrigor Ice Makers Srl, Lainate, Italien
Elektronische Analysewaage (770)	Kern, Balingen-Frommern, Deutschland
HERAfreeze-85°C freezer	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kühlbank (Cold Plate, B3120060)	Thermo ELECTRON CORPORATION, Waltham, USA
Microtome Blades A35	Feather, Osaka, Japan
Mikroskop (Eclipse E600)	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Mikrotom (SM 2000 R)	Leica, Nussloch, Deutschland
Mikrowelle R-204	Sharp Electronics (Europe) GmbH, Hamburg, Deutschland
Objektträger-Strecktisch (OTS 40)	Medite, Burgdorf, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischkühlzentrifuge 4K15C	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Ultrasonic bath, Transsonic T780	Elma, Singen, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA

Tab. 2: Hilfsmittel

Bezeichnung	Firma
96 Well Mikrotestplatten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Filterspitze 10µl, 100µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Deckgläser (24x32mm, Glasdicke 0,13-0,16)	R.Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Dounce Homogenisator	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
EDTA Röhrchen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Färbekasten mit Falzdeckel 2480	Assistent (Glaswarenfabrik, Karl Hecht GmbH&Co KG), Sondheim/Rhön, Deutschland
Färberahmen 2481	Assistent (Glaswarenfabrik, Karl Hecht GmbH&Co KG), Sondheim/Rhön, Deutschland
Imaging Software, NIS Elements, Basic Research 3.00	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Labortücher (KIMTECH Science)	Kimberly-Clark® Professional, Koblenz-Rheinhafen, Deutschland
Messzylinder, 1000ml	VitLab GmbH, Großostheim, Deutschland
Mikroplattenlesegerät, Sunrise	TECAN, Männedorf, Schweiz
Objektträger (76x26mm/3x1inch, geputzt, gebrauchsfertig)	R.Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Objektträgerkasten nach Hellendahl 2460	Assistent (Glaswarenfabrik, Karl Hecht GmbH&Co KG), Sondheim/Rhön, Deutschland
Optical 96-Well-Fast Thermal Cycling Plates	Applied Biosystem, Carlsbad, USA
Parafilm M all-purpose laboratory film	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR Soft Tubes, 0,2ml	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Pipette (Research 0,5-10µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette (Research 100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette (Research 10-100µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Pipettierhelfer (accu-jet)	BrandTech Scientific, Essex, USA
Plastikküvette	Kartell, Noviglio, Italien
Präparierbesteck, rostfrei, 8-teilig, Art. Nr. 12017	Bochem Instrumente GmbH, Weilburg, Deutschland
Reagenz- und Zentrifugentuben 15ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie (Entellan®Neu)	MerckKGaA, Darmstadt, Deutschland
Schwenkbank, Rocky 3d	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, Deutschland
Selbstklebende optische Folie, MicroAmp	Applied Biosystem, Carlsbad, USA
Serological Pipetten 5ml (Ref. 86.1253.001), 10ml (Ref. 86.1254.001), 25ml (Ref. 86.1685.001)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Software Image J	<a href="http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html">http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html</a> (Entwickler Wayne Rasband (Mitarbeiter von National Institutes of Health))
Software PCR, SDS v.1.3.1	Applied Biosystem, Carlsbad, USA

Tab. 3: Substanzen

Bezeichnung	Firma
(3-Aminopropyl)triethoxysilane A3648	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
2-Propanol (=Isopropylalkohol)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aceton	Hedinger, Stuttgart, Deutschland
Albumin Fraktion V aus Rinderserum, Katalognr.A7906-100G	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Amitriptyline hydrochloride, Katalognr. A8404-25G	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland

DAB tetrahydrochloridhydrat = 3,3'-Diaminobenzidinetetrahydrochloride hydrate, 97% (D5637-5G)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit	FINNZYMES, Espoo, Finnland
Ethanol (99% vollst. verg. MEK/BITREX, ETO-5000-99-1)	SAV-LIQUID PRODUCTION GMBH, Flintsbach, Deutschland
Isofluran	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Methanol (AnalaR NORMAPUR)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Nuklease freies Wasser	Life Technologies, Carlsbad, USA
Nukleotidenmix (je 10mM)	Roche, Mannheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Katalognr. 05892970001	Roche, Mannheim, Deutschland
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Random Primers Hexamers	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
SuperScript™II Reverse Transcriptase (Cat. No. 18064-014)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
TaqMan® Gene Expression Assays für TNF- $\alpha$ , iNOS, IL1 $\beta$ , CCL-2, IL-10, IGF-1, BDNF, Arc, NMDA-R1, 18sRNS	Applied Biosystem, Carlsbad, USA
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X 100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol® Reagent Cat.No. 15596-026	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Tween®20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid-Lösung 30% (PZN 7284667)	Otto Fischer GmbH und Co KG, Saarbrücken, Deutschland
Xylol Pharma. Helv. VI (Isomergemisch, PZN-7475522, CAS-Nr.:1330-20-7)	Hedinger, Stuttgart, Deutschland

Tab. 4: Lösungen

Bezeichnung	Firma
<u>10x PBS (Phosphate Buffered Saline):</u> 400g NaCl, 10g KCl, 71g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 69g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·xH <sub>2</sub> O, 5l dH <sub>2</sub> O zufügen	
<u>10xTBS (Tris Buffered Saline):</u> 302,5g Trisbase, 425g NaCl, auf pH7,4-7,5 (32%HCL) einstellen, 5l dH <sub>2</sub> O	
<u>1xPBS/T:</u> 100ml (1x)PBS +100µl Tween20	
<u>1xPBS:</u> 100ml (10x)PBS + 900ml dH <sub>2</sub> O	
<u>1xTBS/T:</u> (100ml (10xTBS) + 900ml dH <sub>2</sub> O) + 1ml Tween-20	
<u>Blockpuffer immunhistochemische Färbung:</u> 0,2% Casein, 0,1% Tween-20, 0,1% Triton-X, in 1xPBS	
<u>Citratpuffer (1x):</u> 100ml Zitronensäure Monohydrate 2,1014g/l, pH 6,0 zu 900ml dH <sub>2</sub> O	
<u>DAB Lösung:</u> 1mg/ml DAB in 1x PBS + 1µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /3ml Lösung	
<u>Guanidinpuffer:</u> 5M Guanidin-HCL, 50mM Tris, pH 8,0	
<u>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Methanol-dH<sub>2</sub>O-Lösung:</u> 36,5ml dH <sub>2</sub> O, 8,5ml Methanol, 5ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	
Mayers Hämalaunlösung für die Mikroskopie	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

RQ1 RNase-Free DNase (Cat.# M6101) mit: RQ1 RNase-freier DNase, Stopplösung, RQ1 DNase 10x Reaktionspuffer	Promega Corporation, Madison, USA
<u>Standard Reconstitution Buffer für Elisa:</u> 55mM NaHCO <sub>3</sub> , pH 9,0	
<u>Verdünnungslösung</u> <u>immunhistochemische Färbung:</u> 0,02% Casein, 0,01 Tween-20, 0,01% Triton-X, in 1xPBS	

Tab. 5: Kits

Bezeichnung	Firma
ELISA Kit Human A $\beta$ 40	Invitrogen Corporation, Camarillo, USA
ELISA Kit Human A $\beta$ 42	Invitrogen Corporation, Camarillo, USA
Vectastain Elite ABC Kit, (Rat IgG), PK-6104, HRP	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

Tab. 6: Antikörper

Antikörper	Antigen	Firma
Anti Iba1, Polyclonal Antibody, Rabbit, for Immunocytochemistry (Cat.: #019-19741), färbt eine Bande bei ca. 17kDa (94), (95)	Mit dem C-terminalen Ende (N`PTGPPAKKAISELP-C`) von Iba-1 übereinstimmendes synthetisiertes Peptide (94), AK spezifisch für Mikroglia und Makrophagen, keine Kreuzreaktion mit Neuronen oder Astrozyten (95)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan
Biotinylated Goat-Anti Rabbit IgG (H+L), BA-1000	Erkennung von Kaninchen Primärantikörper	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA

Biotinylated Goat-Anti Rat IgG (H+L), BA-9400	Erkennung von Ratten Primärantikörper	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Biotinylated Horse Anti-Mouse IgG (H+L), BA-2001	Erkennung von Maus Primärantikörper	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Monoclonal Mouse Anti-Human Beta Amyloid, IgG <sub>1</sub> , κ, Clone 6F/3D, Code No.: M 0872	synthetisiertes Peptid, bestehend aus den Resten 8-17 (ser-gly-tyr-glu-val-his-his-gln-lys-leu) von β-Amyloid mit zusätzlichem C-terminalem Cystein, das über den Cystein-Rest an KLH (keyhole limpet hemocyanin) gekoppelt ist, markiert β-Amyloid, das das N-terminale Epitop enthält, färbt hpts. extrazelluläres Aβ seniler Plaques (Produktinfo), (96), (97), (98)	Dako, Glostrup, Dänemark
PE Mouse IgG <sub>1</sub> , κ, Isotype Control, Cat.No: 550617 (Was 03255A), Lot: M063023, Clone MOPC-31C	Isotyp-Kontrolle für Aβ-Primärantikörper	BD Pharmingen, USA
Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP, IgG, Code No. P016002-2	Isotyp-Kontrolle für Iba-1-Primärantikörper	Dako, Glostrup, Dänemark
Purified Rat Anti-Mouse Mac-3 Monoclonal Antibody for IHC, IgG <sub>1</sub> κ, (Cat. 550292), Clone M3/84, färbt eine Bande bei 110kDa (99), (100)	membranöse Glykoproteine vom Typ Mac-3 von C57BL/6 Mäusen (Produktinfo), markiert das Glykoprotein Mac-3 auf mononukleare Phagozyten von Mäusen (99), (100)	BD Pharmingen, USA

Purified Rat IgG <sub>1</sub> , $\kappa$ , Monoclonal Immunoglobulin Isotype Standard, Cat.No.: 11010D, Lot: M040040, Clone R3-34	Isotyp-Kontrolle für Mac-3 Primärantikörper	BD Pharmingen, USA
---	--	-----------------------

Obige Informationen entstammen neben den angegebenen Quellen aus den jeweiligen firmeneigenen Produktinformationen der Antikörper.

### 3.1.2 Versuchstiere

Grundlage der durchgeführten Experimente bildeten genveränderte weibliche Mäuse vom Typ TgCRND8 mit C57BL6/129-Hintergrund (die Kreuzung erfolgte für mindestens vier Generationen). Die ursprünglich von D. Westaway (Universität Toronto) erhaltenen Nagetiere wiesen ein doppelt mutiertes Erbgut bzgl. des APP695 (KM670/671NL+V717F) auf. Es waren erste A $\beta$ -Plaques im Alter von 3 Monaten zu erwarten sowie eine Verschiebung des A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Verhältnisses in Richtung der A $\beta$ 42-Produktion. Weiterhin konnte mit neuritischen Dystrophien im Alter von 5 Monaten und einer mit reifen Plaque-assoziierten Entzündungsreaktion gerechnet werden. So dienten die Mäuse als Modell der Alzheimer-Erkrankung bzw. der Amyloidogenese (101). Genehmigt wurden die Tierexperimente von der regionalen Ethikkommission des Saarlandes.

Im Experiment wurden 6 der 13 transgenen Mäuse 100mg Amitriptylin pro ein Liter Trinkwasser substituiert. Die Applikation erfolgte ab dem dritten Lebensmonat bis zur Exekution der Mäuse im Alter von sechs Monaten. Die restlichen 7 Alzheimer-Tiere erhielten reines Wasser zum Trinken und dienten als Kontrollgruppe. Die Zuordnung der Gruppen wurde zufällig gewählt.

## 3.2 Methodik

### 3.2.1 Materialgewinnung und Asservation

Im Sinne der Forschung wurden die transgenen Mäuse nach 6-monatiger Lebenszeit durch Inhalation von Isofluran anästhesiert und getötet. Die Bauchdecke wurde eröffnet und 0,5ml Blut mittels Punktion der Aorta abdominalis entnommen. Das Blut wurde 3

Minuten zentrifugiert (5000rpm) und das Plasma gewonnen. Durch Infusion von kalter PBS-Lösung in den linken Herz-Ventrikel der Mäuse wurden restliche Blutbestandteile ausgewaschen und durch eine Perforation des rechten Vorhofs drainiert. Nachfolgend eröffnete man die Schädelkalotte und extrahierte das Gehirn. Dieses wurde sagittal halbiert und wie folgt aufgeteilt:

- Die linke Hemisphäre wurde für die Immunhistochemie unverzüglich durch eine Medizinisch-technische Assistentin mit 4% Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet, um es für die Mikrotomie und die weitere immunhistochemische Prozessierung zugänglich zu machen.
- Von der rechten Gehirnhälfte (ohne Kleinhirn) schnitt man medial eine 0,5mm dicke sagittale Scheibe. Diese wurde in Trizol gelöst, homogenisiert und für die spätere Weiterverarbeitung bei -80°C tiefgefroren. Aus diesem Schnitt isolierte man die Gesamt-RNS für die qRT-PCR.
- Das restliche Gewebe der rechten Hemisphäre (abermals ohne das Gewebe des Kleinhirns) wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und später für das ELISA genutzt.

### **3.2.2 Immunhistochemie (IHC)**

Mit der Immunhistochemie sollte die Anzahl von Mikrogliazellen sowie die A $\beta$ -Last in ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen und in den nicht gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen analysiert und verglichen werden. Eingefärbt wurden pro Antikörpersystem vier Schnitte eines Gehirnes, jeweils im Abstand von ca. 70 $\mu$ m zueinander.

#### **3.2.2.1 Vorbereitungen für IHC**

##### **3.2.2.1.1 Silanisierung der Objektträger**

Um die haftenden Eigenschaften der Objektträger zu stärken, wurden diese silanisiert. Unter dem Abzug tauchte man die Objektgläser der Reihe nach einmal in reines Aceton, um sie von oberflächlichem Schmutz zu befreien, inkubierte sie 1 Minute in einer Aceton-Silanlösung (50:1) und badete sie nachfolgend wieder kurz in Aceton.

Abschließend wurden die Gläser in destilliertes Wasser getaucht und über Nacht bei 37°C im Brutschrank getrocknet.

#### **3.2.2.1.2 Mikrotomie**

Von den gekühlten formaldehydfixierten und paraffin-eingebetteten Gehirnhälften wurden mithilfe des Schlittenmikrotoms hauchdünne Scheiben geschnitten. Hierfür wurden die Präparate horizontal in einer vorgesehenen Halterung eingespannt. Der Block wurde bis zum vollständigen Querschnitt des Gewebes medial angeschnitten. Nachfolgend setzte man im Wechsel mit Hilfe von zwei Pinseln je 10 Schnitte von 2µm bzw. 5µm Dicke ab. Nachdem die einzelnen Schnitte in destilliertem Wasser (36°Celsius) gebadet worden waren, war es möglich das eingrenzende Paraffin auszudehnen. Die durch das Schneiden leicht zusammengefallenen Zuschnitte konnten sich so wieder strecken. Daraufhin wurden sie der Reihe nach auf durchgehend nummerierte, silanisierte Objektträger überführt und glatt „gebügelt“. Abschließend inkubierte man sie eine Nacht bei 60°Celsius im Brutkasten, wodurch sich das Paraffin verflüchtigte, Wasserreste verdampften und das Gewebe an das Glas angebacken wurde (102).

#### **3.2.2.2 Protokoll IHC**

##### **(1.Tag)**

##### Entparaffinierung und Rehydrierung:

Erster Arbeitsschritt war die Befreiung der Präparate von Paraffin durch Xylol und die allmähliche Überführung der Schnitte in eine wässrige Lösung durch eine absteigende Alkohollösungsreihe. Dies beinhaltete zwei Inkubationen der Schnitte in unterschiedlichen Schalen reinem Xylol für 5 Minuten und zwei nachfolgende Zeiteinheiten in 100% Ethanol, ebenfalls jeweils für 5 Minuten. Je 3 Minuten wurden die Proben der Reihe nach in 96%, 70%, 50% Ethanol und schlussendlich einmal kurz in destilliertes H<sub>2</sub>O eingetaucht.

Zu beachten war, dass die Schnitte ab dem Zeitpunkt der Entparaffinierung feucht gehalten werden mussten um ein Austrocknen zu verhindern.

### Antigendemaskierung:

Nachteil der vorangegangenen Formalinfixierung war die Strukturmodifikation von Gewebeproteinen und der damit einhergehende etwaige Verlust der Antigenität der zu detektierenden Epitope. Das hieße, die Antigene (AGe) wären nicht mehr von passenden Antikörpern entdeckt worden- sie wären maskiert (103). Eine Möglichkeit, die Epitope für Antikörper wieder zugänglich zu machen, war die Hitzebehandlung in einer geeigneten Pufferlösung (104). Demgemäß wurden die Schnitte in einen (1x) Citratpuffer aus Zitronensäuremonohydrat und dH<sub>2</sub>O gegeben und in der Mikrowelle bei 560Watt 5x3 Minuten gekocht. Nachfolgend ließ man die Schnitte im Citratpuffer 30 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen. Abschließend wurde das Gewebe 3x in destilliertes Wasser getaucht und der Citratpuffer weggespült.

### Inaktivierung der gewebeeigenen Peroxidase:

Die durchgeführte Methode der Immunhistochemie beruhte auf der enzymatischen Wirkung des eingesetzten AK-detektierenden Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes. Um eine möglichst hohe Präzision dieses Verfahrens zu etablieren, mussten die gewebeeigenen Peroxidasen inaktiviert werden. Die Inaktivierung wurde durch eine exzessive Substratsubstitution von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und die resultierende kompetitive Hemmung der Enzyme erzielt (102). Demnach wurden die Schnitte 30 Minuten unter Raumtemperatur in einer Lösung aus 36,5ml dH<sub>2</sub>O mit 8,5ml Methanol und 5ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Eine gründliche Waschung in TBS für 2x5 Minuten und nachfolgend 1x5 Minuten in TBS/T beendete den Arbeitsschritt. Das im TBS/T enthaltene Tween 20 fungierte als Detergenz. Es ermöglichte daher eine gleichförmige Benetzung des Gewebes durch die folgend substituierten Stoffe und ein besseres Eindringen dieser (105).

### Block:

In der Immunhistochemie war es unverzichtbar, freie unspezifische Bindungsstellen auf der Oberfläche von Gewebeschnitten zu blockieren bzw. zu sättigen und so Hintergrundfärbung zu minimieren. Hinsichtlich dessen blockierte man die Gewebeproben mit einer Lösung aus 0,2%Casein, 0,1% Tween-20 und 0,01% Triton-X in 1xPBS. Auf die Oberfläche eines jeden aus der Waschlösung entnommenen Schnittes pipettierte man 80µl der vorbereiteten Blocksubstanz. In einer Feuchten Kammer

lagerten die Proben so für eine Stunde bei Raumtemperatur. Auch die später benutzen AK waren in einer verdünnten Blocklösung gelöst.

### 1. Antikörper:

Entsprechend der Fragestellung, wie sich die Anzahl der (aktivierten) Mikrogliazellen und die A $\beta$ -Last in TgCRND8-Alzheimer-Mäusen darstellten, wurden passende Antikörper gewählt. Für den Nachweis von Mikrogliazellen/Makrophagen wurden Iba-1 (Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1)-AK verwendet, mit Mac-3-AK detektierte man vermehrt die aktivierten Mikroglia/Makrophagen. Anti-Human A $\beta$ -AK veranschaulichte die  $\beta$ -Amyloid-Last.

Im Versuch wurden die Schnitte aus der Feuchtkammer entnommen und der Blockpuffer durch 80 $\mu$ l vorbereitete AK-Verdünnungslösung ersetzt. Verwendet wurden die folgenden Verhältnisse:

- 1:500 verdünnter polyklonaler Anti-Iba-1 Kaninchen-AK in Verdünnungslösung aus 0,02% Casein, 0,01% Tween-20, 0,01% Triton in 1xPBS;
- 1:10 verdünnter monoklonaler Anti-Mac-3 Ratten-AK in Verdünnungslösung aus 0,02% Casein, 0,01% Tween-20, 0,01% Triton in 1xPBS;
- 1:50 verdünnter monoklonaler Anti-Human  $\beta$ -Amyloid Maus-AK in Verdünnungslösung aus 0,02% Casein, 0,01% Tween-20, 0,01% Triton in 1xPBS.

Alle Schnitte inkubierten über Nacht im Kühlhaus bei 4°Celsius.

## **(2.Tag)**

### 2. Antikörper (biotinyliert):

Erster Schritt dieses Arbeitstages war eine erneute Waschung der Schnitte nach obigem Schema mit TBS und TBS/T, um nicht gebundene AK zu extrahieren. Um eine Verbindung zwischen Primärantikörper und später zuzuführendem Enzymkomplex zu schaffen, wurden im weiteren Verlauf pro Schnitt 80 $\mu$ l folgende, entsprechende Sekundärantikörper in Verdünnungslösung auf das Gewebe pipettiert:

- 1:200 verdünnter biotinylierter Ziegenantikörper gerichtet gegen Kaninchen auf die Schnitte mit Anti-Iba-1 Primärantikörper;

- 1:200 verdünnter biotinylierter Ziegenantikörper gerichtet gegen Ratte auf die Schnitte mit Anti-Mac-3 Primärantikörper;
- 1:250 verdünnter biotinylierter Pferdeantikörper gerichtet gegen Maus auf die Schnitte mit Anti-Human  $\beta$ -Amyloid.

Die Objektträger wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur in die feuchte Kammer gelegt.

#### Vorbereiten des AB-Komplexes (ABC = Avidin-Biotin-Complex):

Das System der ABC-Methode beruht auf der hohen Affinität von Avidin zu dem Vitamin Biotin (106). In Reagenz B war im Sinne dieser Affinität das Enzym Peroxidase mit Biotin konjugiert. Dieses Reagenz wurde mindestens 30 Minuten vor Gebrauch mit Reagenz A (Avidin) zusammengebracht, sodass sich Makromoleküle ausbilden konnten. Dies hatte den Vorzug, dass relativ viele Enzyme über *einen* Primär-Sekundärantikörperkomplex das zu detektierende Antigen markierten und so das Signal verstärkten (102).

Im Versuch wurde Reagenz A und B jeweils im Verhältnis von 1:100 in PBS/T vermischt. Es wurde eine Gesamtmenge von 80  $\mu$ l pro Schnitt angesetzt. Die Lösung wurde unter Ausschluss einer Lichtquelle für wenigstens 30 Minuten vor Gebrauch verwahrt.

#### Inkubation mit ABC:

Da auch der 2. Antikörper mit Biotin versetzt war, haftete das Avidin des Avidin-Biotin-Peroxidase Komplexes mit seinen freien Bindungsstellen an diesem AK.

Nach erneuter 2x5 minütiger Waschung mit TBS und 1x5 minütiger mit TBS in einer Glasküvette wurden 80  $\mu$ l pro Schnitt des angesetzten ABC-Reagenz auf das Gewebe gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

#### Färbung mit 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloridhydrat (=DAB tetrahydrochloridhydrat):

Oxidation und Reduktion verliefen im Einklang in der sogenannten Redoxreaktion. Daher benötigte die gekoppelte Peroxidase für die Reduktion ihres Substrates  $H_2O_2$  ein Reduktionsmittel, welches durch Elektronenabgabe oxidiert wurde. Diese Aufgabe wurde dem Chromogen DAB zuteil. Es war Elektronendonator und gewann durch die

Oxidation eine bräunlich unlösliche Farbe (106). Mit diesem Schritt wurde der Ort der markierten AG mikroskopisch sichtbar gemacht.

Vorab wurden die Schnitte nach Protokoll wiederholt 2x5 Minuten mit TBS und 1x5 Minuten mit TBS/T gewaschen. Während dessen wurden „x“ mg DAB mittels einer Analysewaage abgemessen. Unter dem Abzug löste man das Chromogen in einer betragsgleichen Millilitermenge 1xPBS. Unmittelbar vor der Nutzung substituierte man 1µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro 3ml DAB Lösung.

Die Schnitte wurden für 40 Sekunden in eine Küvette mit der produzierten Chromogenlösung getaucht und abschließend 3x in destilliertem Wasser gespült.

#### Kontrastierende Färbung der Zellkerne mit Hämalaun:

Zwecks der späteren Auszählung der Mikrogliazellen und des Aβ in einer definierten Area (dem Hippocampus) war es erforderlich, eine grobe Zell- bzw. Gewebemorphologie darzustellen. Dieses Ziel erreichte man durch das Anfärben der Zellkerne mit Hämalaun nach Meyer. Die Schnitte wurden für 40 Sekunden in einer Glasküvette mit Hämalaun gefärbt und anschließend 3x in destilliertem Wasser gereinigt. Durch die 5-minütige Waschung mit Leitungswasser stieg der pH-Wert in der Glasküvette und die Färbung entwickelte sich zu einem charakteristisch blau-violetten Farbton (102).

Letzten Endes erfolgte die Rückführung der Zuschnitte in destilliertes H<sub>2</sub>O.

#### Dehydrierung:

Um die Proben in bewährten hydrophoben Eindeckmitteln wie dem Entellan®Neu zu konservieren, war eine Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe nötig (105). Dies beinhaltete eine Inkubation in einer 50%, 70% und 96% Ethanollösung und eine zweimalige in 100% Ethanol für je 1 Minute. Zum Schluss überdauerten die Schnitte in Xylol für 2x5 Minuten. Hier agierte letzteres als Intermedium zwischen dem Alkohol und dem xylolhaltigen Eindeckmittel Entellan®Neu (105).

#### Eindecken:

Vollendender Schritt der immunhistochemischen Methode war das Eindecken der Proben in Entellan und die Auftragung eines Deckgläschens. Mit diesen letzten

Maßnahmen wurden die Gewebeschnitte planiert und mitsamt ihrer Färbungen für lange Zeit konserviert.

### **3.2.2.3 Auswertung IHC**

Unter Zuhilfenahme des Lichtmikroskops (Eclipse E600) wurde jeder Schnitt 10fach (ausschnittsweise auch 20fach) vergrößert und mit der Imaging Software NIS Elements Basic Research 3.00 dargestellt. Manuell wurden die Flächen des Hippocampus bestimmt, die dazugehörigen Mikrogliazellen mit Hämatoxylin-gefärbtem Zellkern gezählt und das Verhältnis Zellzahl/Fläche berechnet.

Für die Determinierung der A $\beta$ -Plaqueeexpression wurden mittels Image J manuell die Hippocampusflächen und die darin enthaltenen Plaques ausgemessen.

### **3.2.2.4 Kontrollen und Prüfung der Spezifität der Antikörper**

Für jeden Primärantikörper wurden Isotyp-Kontrollen angefertigt und somit etwaige unspezifische Bindungsreaktionen detektiert. Dazu wurde anstelle des Primärantikörpers ein entsprechender isotypengleicher Antikörper in gleicher Konzentration wie sein Primärantikörper auf Gewebeschnitte von ASM gehemmt und ungehemmt Mäusen aufgetragen. Der weitere Versuchsaufbau sowie die verwendeten Lösungen und Materialien entsprachen denen des zu kontrollierenden Primärantikörpers (siehe oben).

Folgende Antikörper wurden verwendet:

- Für Iba-1 Primärantikörper: polyclonal Rabbit Anti-Goat IgG
- Für Mac-3 Primärantikörper: monoclonal purified Rat IgG<sub>1,  $\kappa$</sub>
- Für A $\beta$ -Primärantikörper: PE Mouse IgG<sub>1,  $\kappa$</sub>

Darüber hinaus wurde eine 7 Monate alte Wildtyp-Maus mit gleicher Hintergrundabstammung wie die eigentlichen Versuchstiere, aber ohne APP-Mutation und somit A $\beta$ -Akkumulation, auf ihre Markierung durch den A $\beta$ -Primärantikörper untersucht.

Um die Spezifität der Sekundärantikörper zu überprüfen, wurde bei ansonsten äquivalentem Versuchsaufbau die Zugabe des Primärantikörpers ausgelassen. Die

Gewebeschnitte von mit Amitriptylin behandelten und unbehandelten Mäusen inkubierten daher weiterhin in der vorher aufgetragenen Blocklösung. Am Ende wurde die Anfärbbarkeit der Schnitte kontrolliert.

### **3.2.3 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay = ELISA)**

Da A $\beta$  einen zentralen Faktor in der Alzheimer-Erkrankung einnimmt, war es von Interesse, die A $\beta$ -Last in den mit Amitriptylin-therapierten sowie den unbehandelten Tieren zu bestimmen und zu vergleichen. Unter dieser Prämisse wurde neben der Analyse der A $\beta$ -Ansammlungen mittels der IHC die Ausprägung von A $\beta$ 40 als auch von A $\beta$ 42 im Blutplasma und verschiedene Gehirnhomogenaten der Tiere mithilfe eines ELISAs identifiziert.

#### **3.2.3.1 Vorbereitungen für ELISA**

##### **3.2.3.1.1 Präparation von Gehirnhomogenaten**

Die Gewinnung der Gehirnhomogenate erfolgte nach bekannten Protokollen (33), (107). Die Gewebestücke wurden mechanisch in einer TBS-Lösung im Verhältnis 100mg Probenmaterial zu 500 $\mu$ l TBS zermahlen und homogenisiert. Die Lösung war mit einem Proteasehemmer-Mix angereichert, um die Amyloidpeptide zu schützen. Für 30 Minuten bei 4°C unter 16000xg wurde das Homogenat zentrifugiert. Durch diese Technik separierte man die TBS-löslichen Gehirnbestandteile von den unlöslichen. Diese obere Phase setzte sich aus parenchymalen und im Zytosol vorliegenden, wasserlöslichen Proteinen zusammen (hauptsächlich A $\beta$ -Monomere) (33). Vorsichtig extrahierte man diesen Überstand und gefror ihn bei -80°Celsius für die spätere Weiterverarbeitung ein (**→TBS-Fraktion**).

Den unlöslichen Pellets substituierte man eine 1% Triton-X 100 haltige TBS-Lösung im Verhältnis (1:5). Notwendig war auch hier, dass das Reagenz mit Proteasehemmern versehen war. Durch die nachfolgende Inkubation der Proben für 5 Minuten in einem 4°C kalten Wasserbad in einem speziellen Ultraschallgerät (Transsonic T780), erhöhte sich die Homogenität der Probenlösung. Im nächsten Schritt wurden die Untersuchungsansätze für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert (16000xg) und auf diesem

Weg der TBS-T-lösliche Überstand (vermehrt A $\beta$ -Oligomere) separiert und bei -80°C konserviert (**→TBS-T-Fraktion**).

Die zurückgebliebenen unlöslichen Fragmente wurden in Relation 1:5 mit eiskaltem Guanidinpuffer (Zusammensetzung siehe Material) versehen. Die erhaltene Lösung wurde für 4 Stunden bei Raumtemperatur mittels Schwenkbank kontinuierlich vermengt. Ein letztes Mal wurden die Proben bei 4°C für 30 Minuten zentrifugiert (16000xg) und der Überstand mit enthaltenen fibrillären A $\beta$ -(Plaque)-Bestandteilen gewonnen (**→Guanidin-Fraktion**).

Durch die beschriebene Vorgehensweise resultierten eine TBS-, eine TBS-T- und eine Guanidin-Fraktion.

### **3.2.3.2 Protokoll ELISA**

In den oben gewonnen Homogenaten sowie im anfangs gewonnenem Plasma der TgCRND8-Alzheimer-Mäuse wurden durch das ELISA die A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42-Peptidkonzentrationen bestimmt. Pro Gehirn wurden demnach 3 Gehirnproben und eine Plasmaprobe auf A $\beta$ 42 und A $\beta$ 40 analysiert.

Eingesetzt wurden die ELISA Kits von Invitrogen für Human A $\beta$ 40 und Human A $\beta$ 42 und die entsprechenden Arbeitsanleitungen der Firma.

#### Binden des Antigens an AK-beschichtete Platten:

Die Wells der ELISA Platten verfügten über eine Beschichtung mit einem spezifischen monoklonalen AK. Dieser sogenannte Fang-Antikörper richtete sich gegen das NH<sub>2</sub>-Ende der A $\beta$ 40- bzw. A $\beta$ 42-Peptide. Systematisch pipettierte man je 50 $\mu$ l Probenlösung sowie Standardlösungen mit synthetisierten A $\beta$ 40- bzw. A $\beta$ 42-Peptiden der Konzentrationen 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,25pg/ml, 15,63pg/ml, 7,81pg/ml und 0pg/ml in die Wells der A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42-Platte. Enthaltene AG banden mit ihrem Epitop an den Antikörper.

Zwecks Nullabgleiches wurde ergänzend 50 $\mu$ l Standard-Verdünnungspuffer in ein separates Well überführt.

#### Primärantikörper:

Jedem Reagenz wurden 50µl einer Antikörperlösung spezifisch für ein weiteres Epitop des selben AG's, dem Carboxylteil (COOH-), substituiert. Die Platten wurden sorgfältig mit Parafilm versiegelt und für 3 Stunden bei Raumtemperatur auf einer Schwenkbank inkubiert.

Nach Ablauf der Zeiteinheit wurden ungebundene Bestandteile in den Wells vorsichtig aspiriert. Gründlich wurden die Proben 4x mit je 400µl Lösung aus (25x) Waschpufferkonzentrat und destilliertem Wasser (1:25) gereinigt.

#### Verbindungskomponente Sekundärantikörper:

Im weiteren Verfahren wurde jedem Ansatz 100µl eines Reagenz aus (100x) Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (Anti-Rabbit IgG HRP) und einer HRP-Verdünnungslösung (im Verhältnis 1:100) verabreicht. Dieser heftete sich gegebenenfalls an den Hasen-Primärantikörper an. Wieder wurden die Platten bedeckt und für 30 Minuten bei Zimmertemperatur gelagert.

Ungebundene Bestandteile wurden nachfolgend abgetragen und die Wells 4x mit der obigen Waschlösung gesäubert.

#### Detektionssystem:

Die Registrierung der Amyloidkonzentration erfolgte durch den enzymatischen Substratumsatz bzw. der damit einhergehenden Farbentwicklung, durch die Sekundärantikörper gebundenen Peroxidase. Als Substrat fungierte das Chromogen Tetramethylbenzidin, von welchem 100µl pro Well verwendet wurde. Unter Ausschluss einer Lichtquelle inkubierten die Proben für 30 Minuten.

Für den Vergleich der Ansätze wurde nach genau dieser Zeitdauer die Enzymreaktion durch die Stopplösung beendet. Eingesetzt wurden 100µl pro Well, dessen Reagenzien sich von blau nach gelb verfärbten.

#### **3.2.3.3 Auswertung ELISA**

Mit dem Mikroplattenlesegerät von Sunrise und dem zugehörigen Excel Plug-in wurde die Absorption des Wells ohne Aβ-Last sowie der Wells mit den bekannten Standardkonzentrationen und der einzelnen unbekanntenen Proben für eine Wellenlänge

von 450nm bestimmt. Die jeweilige Absorption der Referenzwellenlänge von 570nm wurde subtrahiert. Die Differenz des A $\beta$ -freien Wells diente dem Nullabgleich. Durch die so möglich gewordene Skizzierung der Absorptionswerte der Proben gegen ihre bekannten Standardkonzentrationen ermittelte man den A $\beta$ 42- bzw. A $\beta$ 40-Gehalt der unbekannt Proben in pg/ml.

#### **3.2.3.4 Gesamtproteinbestimmung**

Die Amyloidkonzentrationen wurden gegen die Gesamtproteinkonzentration der TBS, TBS-T und Guanidinproben ins Verhältnis gesetzt. Eine Methode, um letztere zu determinieren, war der Einsatz eines Bio-Rad Protein Tests. Dieser basierte auf dem Verfahren nach Bradford und enthielt demnach den Farbstoff Coomassie®Brillant Blue G-250, welcher nach Proteinbindungen sein Absorptionsmaximum von 465nm nach 595nm verlagerte (108).

Nach dem Protokoll für das Protein-Assay der Firma Bio-Rad wurde in je eine Kavität einer 96-Mikrotiterplatte 10 $\mu$ l Probenlösung oder verschiedene Standardlösungen (aus Albumin Fraktion V aus Rinderserum) und 200 $\mu$ l verdünnte Farbstofflösung, bestehend aus 40 $\mu$ l Farbstoffreagenzkonzentrat (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio Rad) und 160 $\mu$ l destilliertem Wasser, gegeben und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gut vermischt.

Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595nm mit einem Mikroplattenlesegerät gemessen. Anhand der Standardkurve ließ sich die Proteinkonzentration eruieren.

#### **3.2.4 Quantitative Echtzeit Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)**

Um die Ausprägung der entzündlichen Reaktion in TgCRND8-Alzheimer-Mäusen mit und ohne Applikation von Amitriptylin zu vergleichen, wurden folgende Transkript-expressionsraten mittels der qRT-PCR gemessen: TNF- $\alpha$ , iNOS, IL1 $\beta$ , CCL-2 und IL-10. Desweiteren determinierte man die cDNS-Konzentrationen der neurotrophen bzw. neuroprotektiven Substanzen IGF-1, BDNF, Arc und NMDA-R1.

### **3.2.4.1 Vorbereitungen für qRT-PCR**

#### **3.2.4.1.1 RNS-Isolation**

Die Gesamt-RNS der 0,5mm dicken Gewebeschnitte des rechten Gehirns wurden nach dem firmeneigenen Protokoll von Invitrogen für Trizol®Reagent (Cat. No. 15596-018) extrahiert. Diese Methode, basierend auf der Technik von Chomczynski und Sacchi (109), beinhaltet die folgenden Schritte:

##### Homogenisierung:

Zu Beginn wurde das Gewebe eines Gehirnes in 1ml Trizol®Reagent gelöst und homogenisiert. Die Zellen wurden dadurch lysiert, die RNS gelöst und RNasen deaktiviert.

##### Phasenseparation:

Um Nukleoproteine abzusondern, inkubierte die jeweilige Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Im Sinne der Phasenseparation wurde der Probe 0,2ml Chloroform zugesetzt, die Lösung 15 Sekunden geschüttelt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Für 15 Minuten wurde die Flüssigkeit unter 4°Celsius bei 12000xg zentrifugiert, wodurch sie sich in drei Phasen separierte. Der farblose Überstand wurde in ein weiteres Gefäß transferiert, er beinhaltet die RNS.

##### RNS-Ausfällung:

In letzteres Gefäß wurde 0,5ml Isopropylalkohol pipettiert und für 10 Minuten bei RT verwahrt. Nach anschließender 10-minütiger Zentrifugation bei 12000xg (4°Celsius) wurde erneut der Überstand entfernt und verworfen. Die RNS hatte sich an der Gefäßwand abgesetzt.

##### Waschen und Resuspendieren:

Die RNS-Präzipitate wurden mit 1ml 75%Ethanol gevortext und für 5 Minuten bei 7500xg zentrifugiert (4°Celsius). Der Ethanol wurde verworfen und die Pellets für die gleiche Zeitdauer angetrocknet.

Letztlich wurde die erhaltene Gesamt-RNS in RNase-freiem Wasser durch mehrmaliges Anziehen mit der Pipette und 10 minütige Inkubation bei 55°Celsius gelöst.

Mittels Absorptionsmessungen wurden die RNS-Konzentration und die Reinheit der Probe bestimmt.

#### **3.2.4.1.2 DNS-Elimination**

Die Gesamt-RNS konnte nach der obigen Extraktion Spuren von Doppel- oder Einzelstrang-DNS enthalten. Da diese die Ergebnisse der PCR beeinflusst hätten, mussten die Reste der DNS mithilfe einer DNase eliminiert werden. Unter dieser Prämisse wurden nach dem Arbeitsprotokoll für RQ1 RNase-Free DNase (Cat.# M6101) in eine PCR-Tube folgende Substanzen/Lösungen gefüllt und für 30 Minuten bei 37°C in der PCR-Maschine verwahrt:

- 8µl RNS-Probe in RNase-freiem Wasser (3µg isolierte RNS bis auf 8µl mit RNase freiem Wasser auffüllen),
- 1µl RQ1 RNase-freie DNase 10x Reaktionspuffer und
- 1µl RNS RQ1 RNase-freie DNase.

Die Zugabe von 1µl RQ1 DNase Stopplösung nach Ablauf der Zeit beendete die Reaktionen. Die Inaktivierung der DNase erfolgte durch die Inkubation für 10 Minuten bei 65°C der obigen Lösung.

#### **3.2.4.2 Protokoll qRT-PCR**

##### Reverse Transkription:

Die gewonnene Gesamt-RNS war erst durch Transformation dieser in einen komplementären DNS-Strang der quantitativen Echtzeit Polymerasekettenreaktion zugänglich. Diese Umwandlung wurde unter Verwendung einer Reversen Transkriptase von Invitrogen (Superscript II Reverse Transcriptase) nach dem firmeneigenen Protokoll realisiert.

Die Ausgangslösung setzte sich aus

- der isolierter RNS-Probe,
- 1µl (250ng) Primern (Random Primers Hexamers, Invitrogen) und
- 1µl Nukleotidenmix (je 10mM) zusammen.

Die Reagenztuben wurden 5 Minuten bei 65°C im PCR-Gerät gelagert und unmittelbar danach für 1 Minute in ein Eisbad gestellt. Die Proben wurden gründlich mit 4µl 5x

Erststrang Puffer sowie 2µl (0,1M) DTT vermischt und für 2 Minuten bei 25°C inkubiert.

Im nächsten Schritt fügte man der Lösung 1µl SuperScript II Reverse Transkriptase hinzu und lagerte die Proben zuerst für 10 Minuten bei 25°C, danach für 50 Minuten bei 42°C in der PCR-Maschine.

Durch eine Erhitzung des Materials für 15 Minuten auf 70°C stoppte man die Reaktion. Unmittelbar nach diesem Arbeitsschritt schloss sich die Analyse der Proben durch die quantitative Echtzeit-PCR an.

#### Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion:

Nach diesen vorbereitenden Maßnahmen erfolgte die eigentliche Semiquantifizierung der RNS- bzw. der cDNS-Template der Gehirnprouben durch die Echtzeit Polymerasekettenreaktion. Im Sinne dieser wurde pro Well nach den Protokollen der verwendeten Substanzen eine Reaktionslösung angesetzt aus:

- 10µl (2x) DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit Master mix (bestehend aus einer TbrDNS-Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphaten sowie Magnesiumchlorid und einer Pufferlösung, welche optimale Reaktionsbedingungen für die Polymerase gewährleisten) gemischt mit
- (50x) ROX Referenzfarbstoff (normalisierende Komponente) und
- 1µl (20x) TaqMan® Gene Expression Assay (spezifischer Primern Mix und spezifische TaqMan Sonden für die entsprechende Mediator- bzw. Parametersequenz).

Diese Reaktionslösung wurde systematisch und möglichst ohne Luftblasen in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die zu analysierenden Proben bestehend aus

- 8µl RNase freiem H<sub>2</sub>O und
- 1µl cDNS des zu untersuchenden Gehirns wurden zugegeben.

Sorgfältig wurde die Platte mit einer optischen Folie versiegelt. Anschließend überführte man die Platte in das PCR-Gerät. Als solches diente das 7500 Fast Real-Time PCR System von Applied Biosystems.

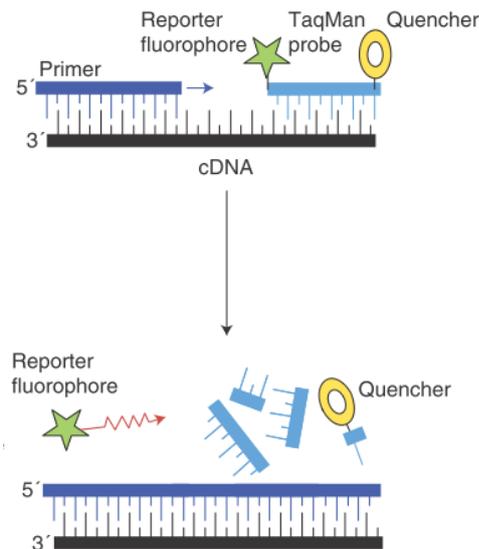
Initial wurden die Proben zwei Minuten unter 50°Celsius gelagert. Im zweiten Schritt bewirkte eine 10 minütige Inkubation bei 95°C die Aktivierung der DNS-Polymerase. Desweiteren wurde durch die Inkubation gewährleistet, dass alle Doppelstränge (z.B.

auch Hybride von Primern) aufgebrochen wurden und eine einheitliche Ausgangssituation vorlag (110).

Es folgten 40 Zyklen der Amplifizierung. Jeder Zyklus der PCR begann mit der erneuten Auftrennung der Doppelstränge der DNS (für den ersten Durchgang eigentlich nicht nötig). Diese Denaturierung erfolgte bei 95°Celsius für 15 Sekunden. Der Thermocycler kühlte die Lösungen für eine Minute auf 60°Celsius ab, sodass sich die Primer sowie die spezifische TaqMan-Sonde an die Einzelstrang-DNS anheften konnten. Durch den Einsatz von spezifischen Primern, welche nur an das jeweilige 5' Ende der gesuchten DNS-Matrize banden, veranlasste man die Vervielfältigung ausschließlich dieser in einem heterogenen Nukleinsäurepool. Auch die TaqMan-Sonden wurden nach dem zu detektierenden komplementären DNS-Abschnitt des mRNA-Transkriptes eines Mediators/Parameters ausgewählt. Diese Sonden waren Oligonukleotidstränge und hybridisierten mit ihrer jeweiligen DNS-Sequenz zwischen den Anlagerungsstellen der beiden Primer. Sie beinhalteten an ihrem 5' Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff sowie einen sogenannten Quencher (Akzeptor) am 3' Ende mit einem Polymerase blockierenden Phosphatrest. Durch diese räumliche Nähe war der Quencher in der Lage, durch Energietransfer die Fluoreszenzemission des Reporters bei einer spezifischen Wellenlänge zu minimieren (110).

Im selben Versuchsschritt (bei 60°Celsius) synthetisierte die DNS-Polymerase mithilfe der Primer als Ausgangspunkte in 3' Richtung mit den Desoxyribonukleosidtriphosphaten einen korrelativen DNS-Strang. Traf sie auf die angelagerte TaqMan-Sonde, spaltete sie diese durch ihre intrinsische 5'→3' Exonukleaseaktivität und vervollständigte den Doppelstrang. Durch die Separation des Reporters von dem Quencher resultierte eine verstärkte Fluoreszenzemission des Reporters nach Reizung. Da nach jedem Replikationszyklus eine höhere Anzahl gespaltener Sonden vorlag, stieg auch die Reporterfluoreszenzemissionrate der Probe an, welche von der Software SDS v1.3.1 registriert wurden (111).

Ein neuer Zyklus schloss sich an, indem die synthetisierte komplementäre Matrize nach Trennung der Doppelstränge ebenfalls als Vorlage zur Verfügung stand.



**Abb. 6 Schematische Demonstration der Wirkungsweise der TaqMan-Sonde**

Die TaqMan Sonde mit dem Reporter Fluoreszenzfarbstoff und dem Quencher (Akzeptor) band spezifisch an ihren DNS-Abschnitt. Erreichte die DNS-Polymerase (hier nicht gezeigt) den Bindungsort der Sonde, spaltete sie diese und sorgte für die Trennung des Reporters vom Quencher. Daraufhin erzeugte der Reporter detektierbare Fluoreszenz. (Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. *Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2005. 5;2:209-219).

### 3.2.4.3 Auswertung qRT-PCR

Die Amplifikationskurve der Nukleinsäure verläuft typischerweise sigmoidal. Nach anfänglichem sehr flachem Verlauf verzeichnet man einen exponentiellen Anstieg. Sobald sich die Versuchsbedingungen verschlechtern, z.B. die Substrate verbraucht sind oder die akkumulierten Reaktionsprodukte vermehrt miteinander interferieren, fällt die Steigung der Kurve bis auf Null (= Plateau-Effekt) (111). Gemessen wurde ein definierter Ct-Wert (= Threshold Cycle Wert) für alle Gene sowie für ein Housekeeping-Gen. Da dieser Punkt im exponentiellen Bereich lag, nahm man eine nahezu 100% Effizienz der Reaktionen an - eine Voraussetzung für den Vergleich der Proben und für die Reliabilität. Das hieß, pro Zyklus verdoppelte sich die Matrizenanzahl, sodass von der Anzahl der Zyklen auf die relative Anzahl der DNS geschlossen werden konnte. Folglich erreichte eine größere Menge Ausgangs-DNS diese Bedingung nach einer niedrigeren Zyklusanzahl als eine geringere Menge. Das schloss jedoch mit ein, dass die kleinsten Mengenunterschiede in der anfänglichen Probe zu massiven Ungleichgewichten führen konnten. Um solche Fehler zu kompensieren, bediente man sich des Housekeeping Genes 18sRNS zur Normierung.

Unter der Annahme, dass jede Zelle eine konstante Expression dieser 18sRNS aufwies, bedeutete dies, dass systematische Fehler bei der Probengewinnung und Verarbeitung in gleichen Umfang den Ct-Wert dieser 18sRNS beeinflussten als auch den der zu analysierenden mRNS-Sequenzen (110), (111). Auch die Amitriptylingabe bewirkte keine signifikante Modifikation des Ct-Wertes von 18sRNS im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Man bediente sich der aufgezeigten Formel:

$$2^{(Ct(18sRNS)-Ct(zu\ analysierende\ mRNS))}$$

Die Ergebnisse wurden für die Amitriptylin- und ihre Kontrollgruppe für jedes Gen gemittelt. Auf diese Weise gelang die Darstellung der Transkriptanzahl eines Genes bezogen auf 18sRNS.

## 4 Ergebnisse

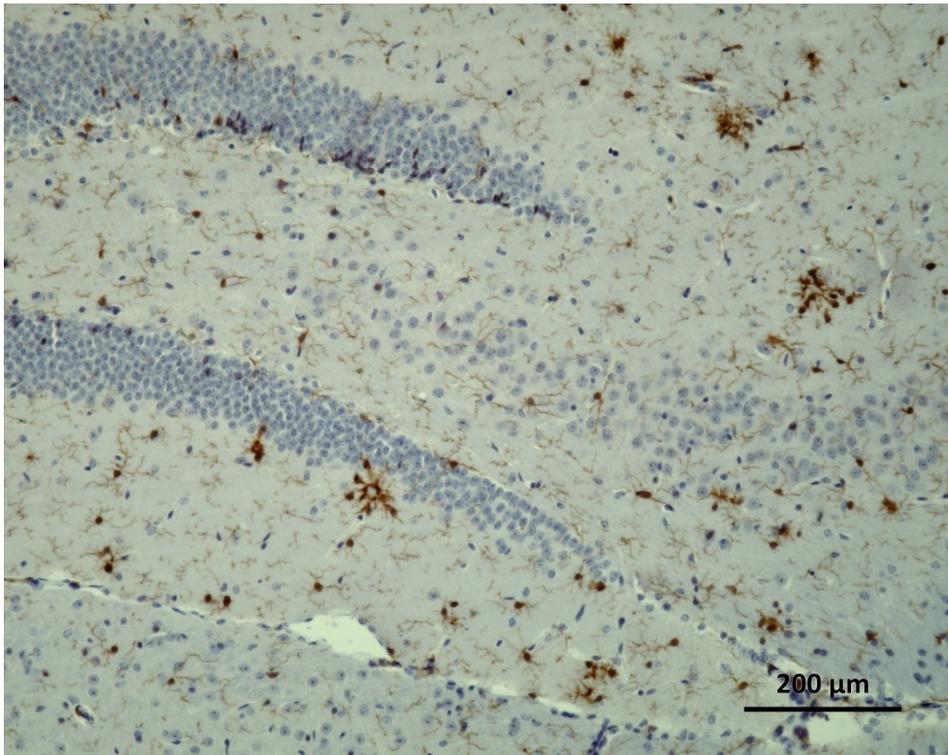
### 4.1 Mikrogliaanzahl

#### 4.1.1 Geringere Anzahl Iba-1 positive Zellen im Hippocampus von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen im Vergleich zu ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen

Mit der Immunhistochemie wurden vier mediale Sagittalschnitte einer linken Gehirnhälfte im Abstand von 70µm mittels des Antikörpers Iba-1 auf ihre Mikrogliaanzahl analysiert. Gezählt wurden nur die Mikrogliazellen in einem definierten Bereich - dem Hippocampus. Es wurden lediglich die Zellen addiert, die einen mit Hämalaun angefärbten Zellkern aufwiesen. Nach diesen Kriterien berechnete man die Mikrogliaanzahl pro Quadratmillimeter. Diese beträgt für die unbehandelten Tiere (n=6)  $146,13 \pm 16,49$  Zellen/mm<sup>2</sup>, hingegen für die ASM-gehemmten Mäuse (n=5)  $123,85 \pm 14,5$  Zellen/mm<sup>2</sup>. Das definierte Signifikanzniveau  $\alpha = 5\%$  ist mit einem p-Wert von 0,043 erfüllt.

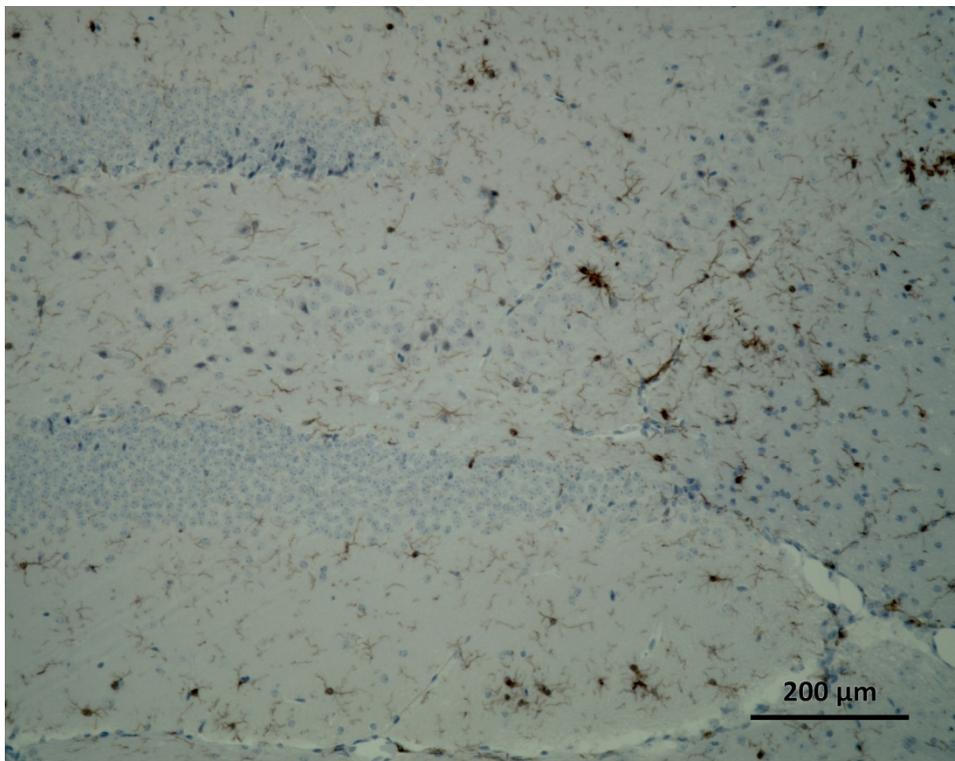
Auffallend oft präsentieren sich Mikrogliazellansammlungen, sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den mit Amitriptylin behandelten Tieren, in dem Kleinhirn zugewandten Hippocampusregionen. Dieser Trend wurde mikroskopisch über alle vier Schnitttiefen festgestellt, jedoch nicht weiter untersucht.

Morphologisch stellen sich die Iba-1 positiven Strukturen, als Zellen mit wenig Zytoplasma und zahlreichen verzweigten Ärmchen dar. Die Morphologie der Mikroglia der zwei Gruppen wurde lichtmikroskopisch verglichen. Auf diese Weise zeigen sich jedoch keine eindeutigen Gestaltdifferenzen.



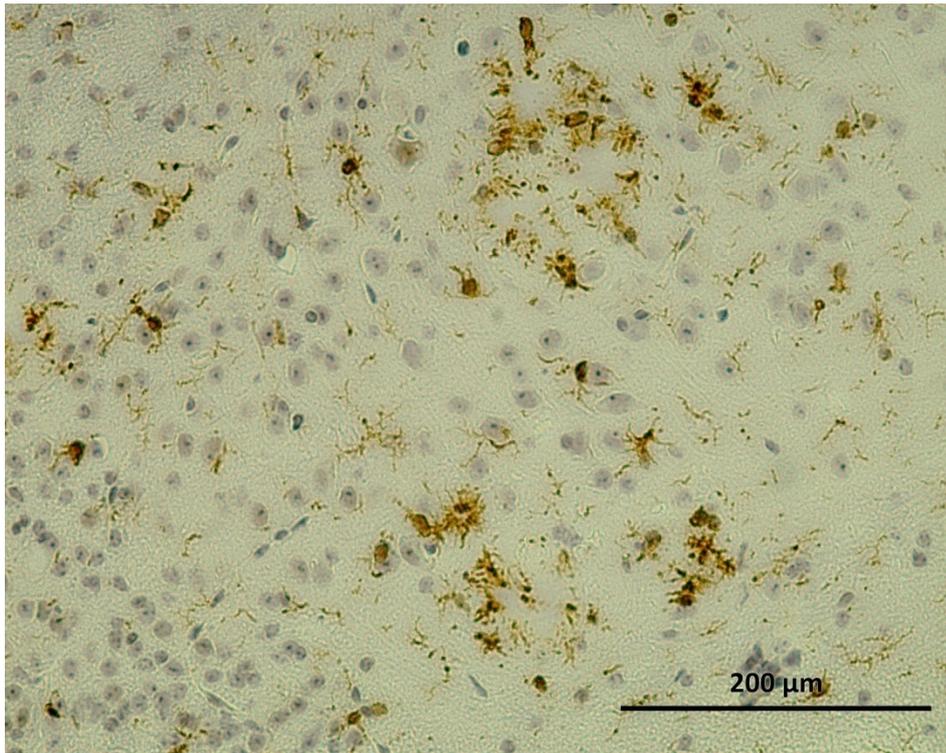
**Abb. 7 Hippocampusregion einer ASM-ungehemmten TgCRND8-Maus (10x)**

Iba-1 positive Zellen (Mikrogliazellen) sind braun dargestellt.



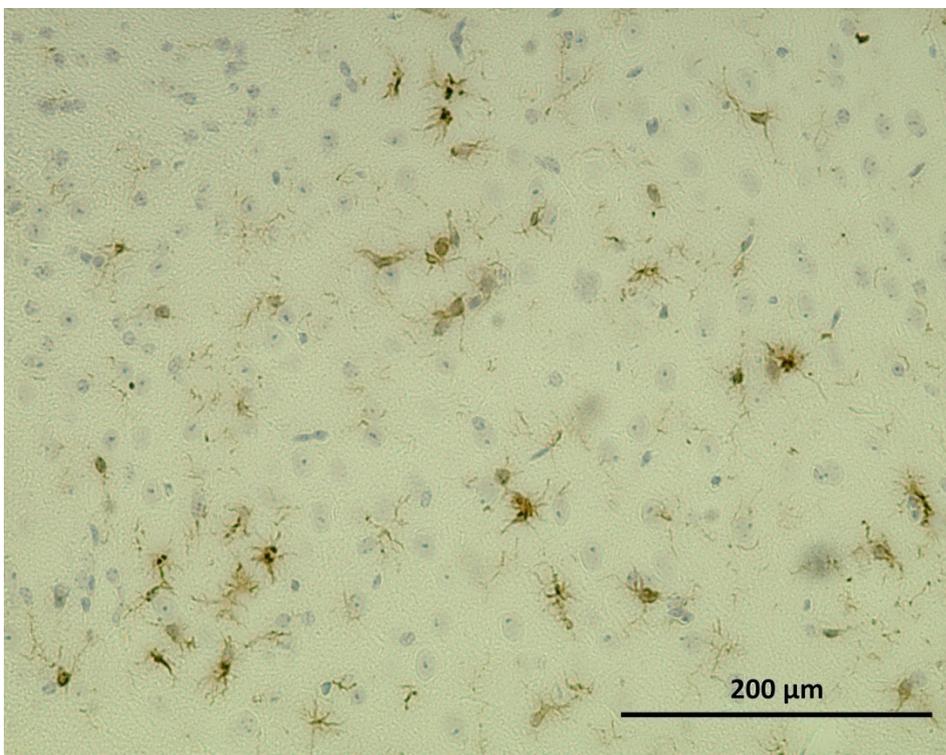
**Abb. 8 Hippocampusregion einer ASM-gehemmten TgCRND8-Maus (10x)**

Iba-1 positive Zellen (Mikrogliazellen) sind braun dargestellt.



**Abb. 9 Hippocampusregion einer ASM-ungehemmten TgCRND8-Maus (20x)**

Iba-1 positive Zellen (Mikrogliazellen) sind braun dargestellt.



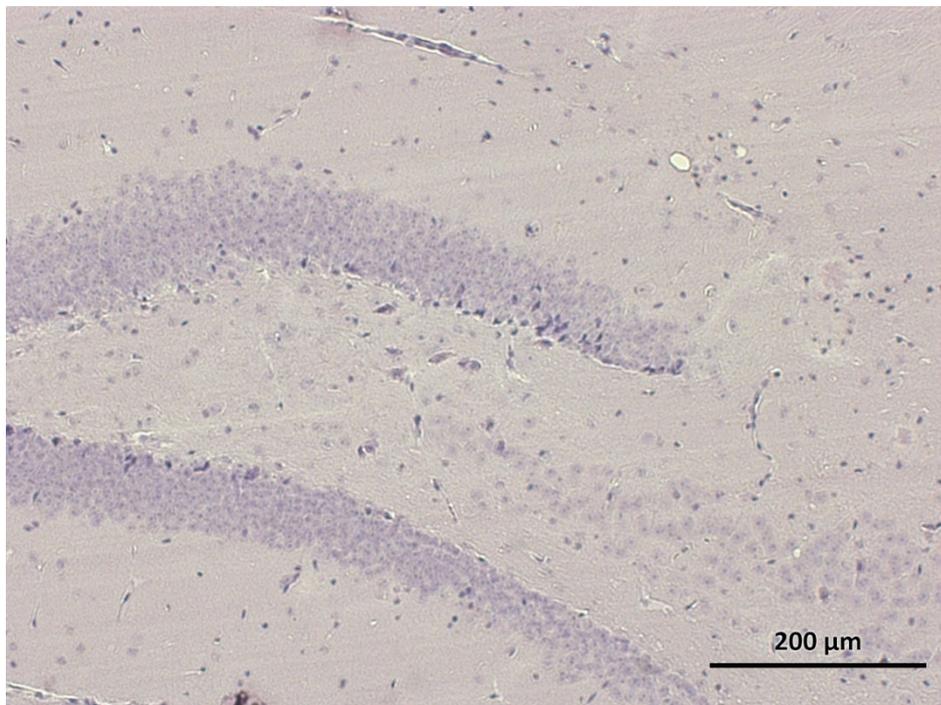
**Abb. 10 Hippocampusregion einer ASM-gehemmten TgCRND8-Maus (20x)**

Iba-1 positive Zellen (Mikrogliazellen) sind braun dargestellt.

Um die Spezifität der Antikörper zu prüfen, wurden über die eigentliche Färbung hinaus Kontrollfärbungen durchgeführt. So konnten durch den Einsatz eines isotypengleichen AK anstelle des Primärantikörpers etwaige unspezifische Bindungen detektiert werden. Es färbten sich nach Inkubation eines solchen Isotyp-AK weder in den Präparaten der ASM-gehemmten noch der ungehemmten Mäuse Gewebestrukturen an. Damit kann von einer sehr geringen bzw. keinerlei Ausprägung von unspezifischen Bindungen des Primärantikörpers mit Strukturen, die nicht seinem eigentlichen Antigen entsprachen, ausgegangen werden (Abb. 11).

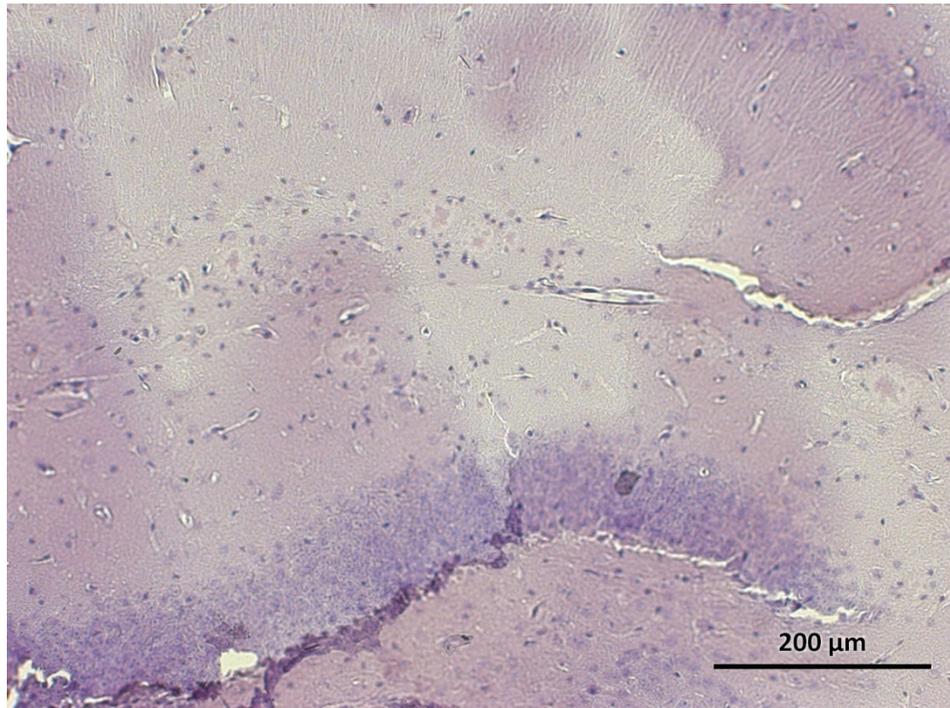
Darüber hinaus ist Anti-Iba1 ein gut definierter AK (siehe firmeneigene Produktinformationen, Tab. 6), der schon in früheren Studien auf unterschiedlichste Weise auf seine Spezifität geprüft wurde (siehe Diskussion 5.2).

Die Spezifität des Sekundärantikörpers wurde durch Negativkontrollen, d.h. Färbungen von Schnitten ohne Verwendung des Primärantikörpers Iba-1, untersucht. Auch hier bestätigte sich eine hohe Spezifität, da sich keinerlei bräunliche Markierungen in den Schnitten zeigten (Abb. 12).



**Abb. 11 Hippocampusregion einer TgCRND8-Maus (10x)**

Isotyp-Kontrollfärbung für Iba-1 AK mit polyclonal Rabbit Anti-Goat IgG

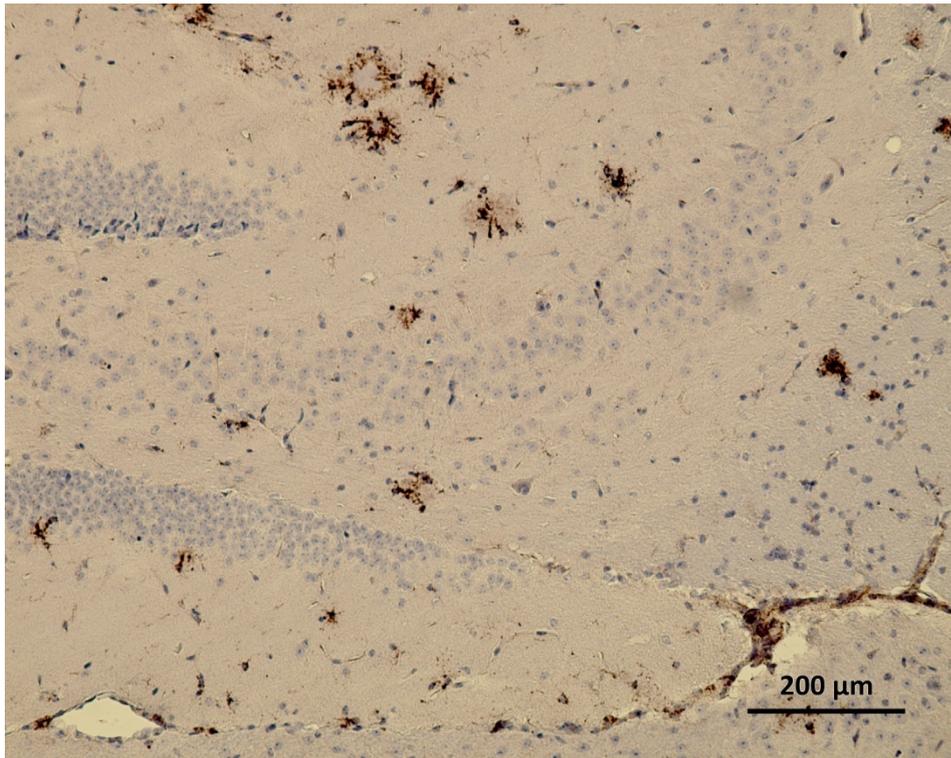


**Abb. 12** Hippocampusregion einer TgCRND8-Maus (10x)

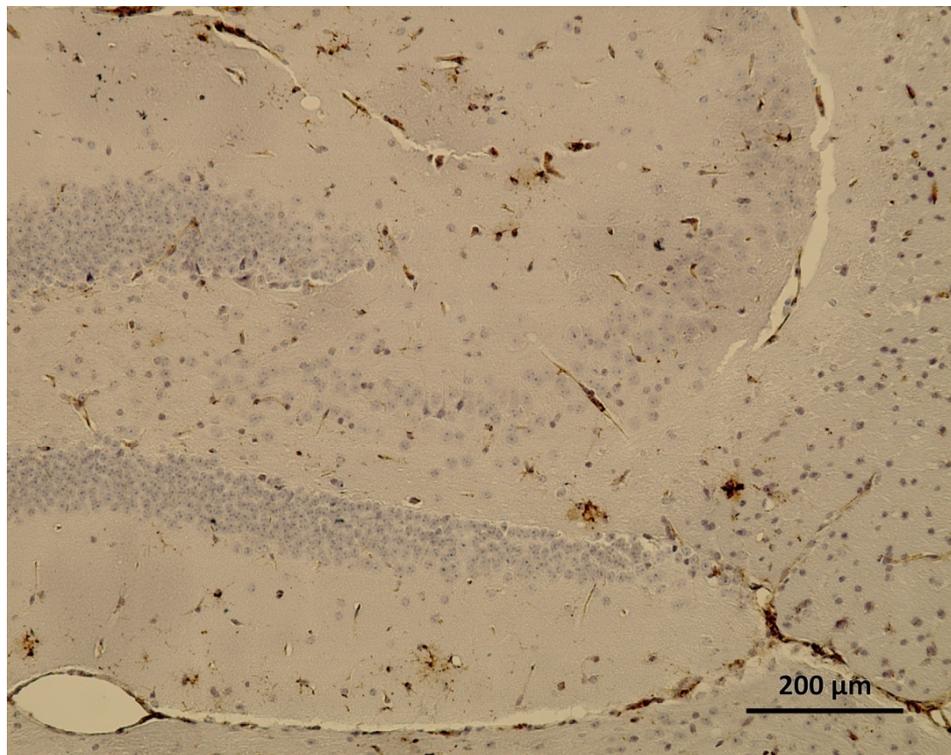
Kontrollfärbung für den Sekundärantikörper (ohne Primärantikörper, d.h. ohne Iba-1 AK)

#### **4.1.2 Nicht signifikant geringere Anzahl Mac-3 positive Zellen im Hippocampus von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen im Vergleich zu ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen**

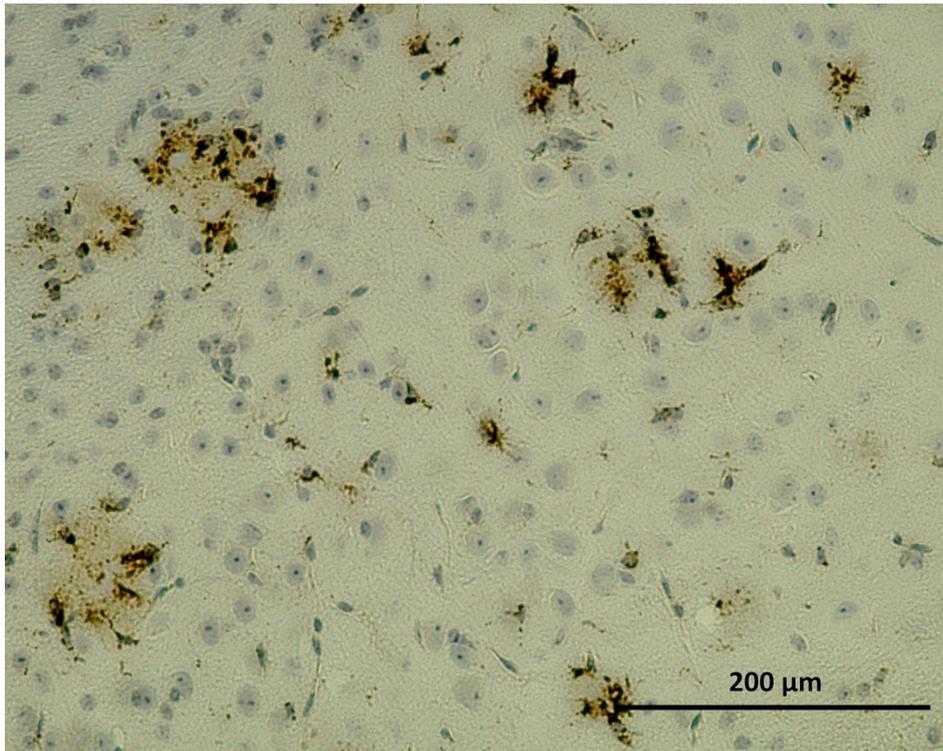
In äquivalenter Arbeitsweise wurden immunhistochemisch in vier Schnitten pro Versuchstier mithilfe des Antikörpers gegen Mac-3 v.a. aktivierte Mikrogliazellen dargestellt. Auch hier zeigt sich eine reduzierte Mikrogliaanzahl in den ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen ( $n=5$ ).  $84,60 \pm 12,11$  Zellen/ $\text{mm}^2$  lassen sich in dieser Gruppe im Mittel detektieren und somit weniger als in den unbehandelten Artgenossen ( $n=6$ ), welche  $101,92 \pm 13,72$  Zellen/ $\text{mm}^2$  aufweisen. Anzumerken ist, dass diese Disparität mit einem p-Wert von 0,056 minimal das Signifikanzniveau von 0,05 verfehlte.



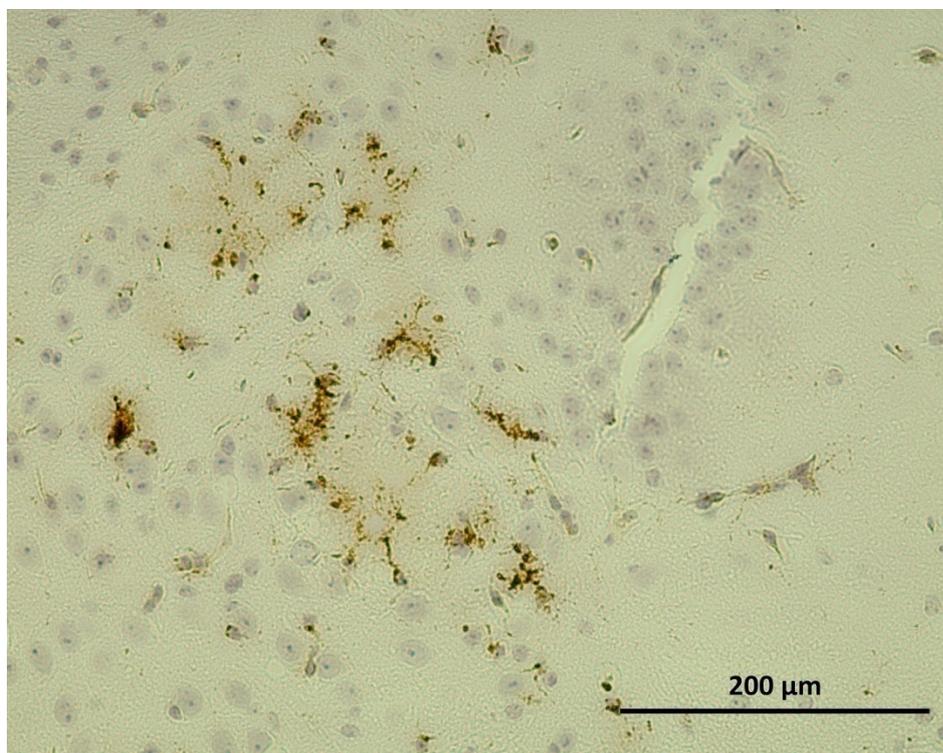
**Abb. 13 Hippocampusregion einer ASM-ungehemmten TgCRND8-Maus (10x)**  
Mac-3 positive Zellen ((aktivierte) Mikrogliazellen) sind braun dargestellt.



**Abb. 14 Hippocampusregion einer ASM-gehemmten TgCRND8-Maus (10x)**  
Mac-3 positive Zellen ((aktivierte) Mikrogliazellen) sind braun dargestellt.



**Abb. 15** Hippocampusregion einer ASM-ungehemmten TgCRND8-Maus (20x)  
Mac-3 positive Zellen ((aktivierte) Mikrogliazellen) sind braun dargestellt.

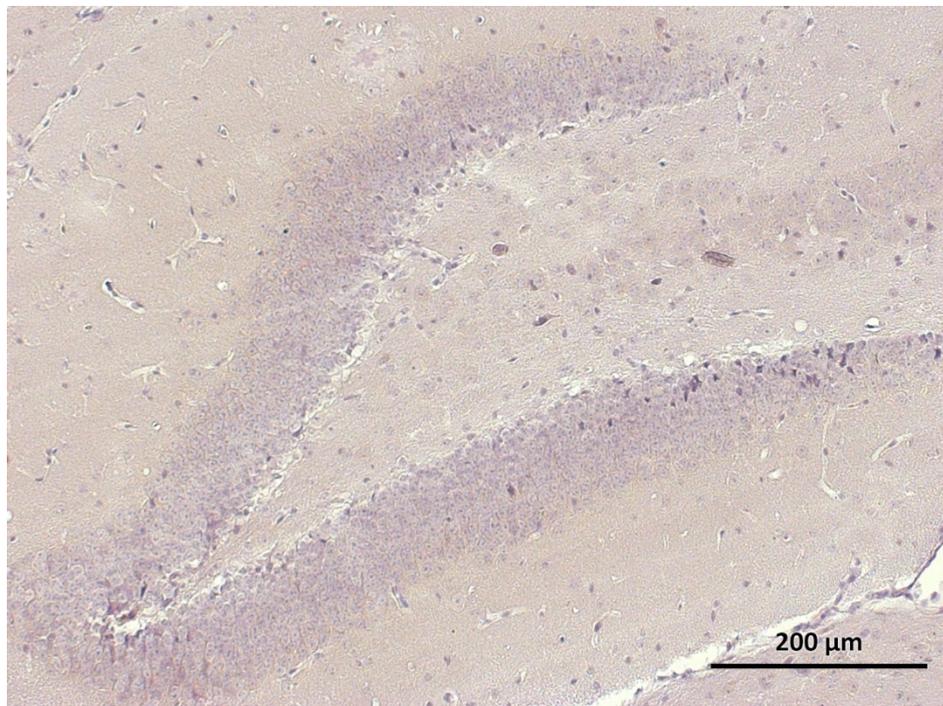


**Abb. 16** Hippocampusregion einer ASM-gehemmten TgCRND8-Maus (20x)  
Mac-3 positive Zellen ((aktivierte) Mikrogliazellen) sind braun dargestellt.

Der eingesetzte Mac-3 Primärantikörper ist ein gut charakterisierter AK (siehe firmeneigene Produktinformationen, Tab. 6, (99), (100)).

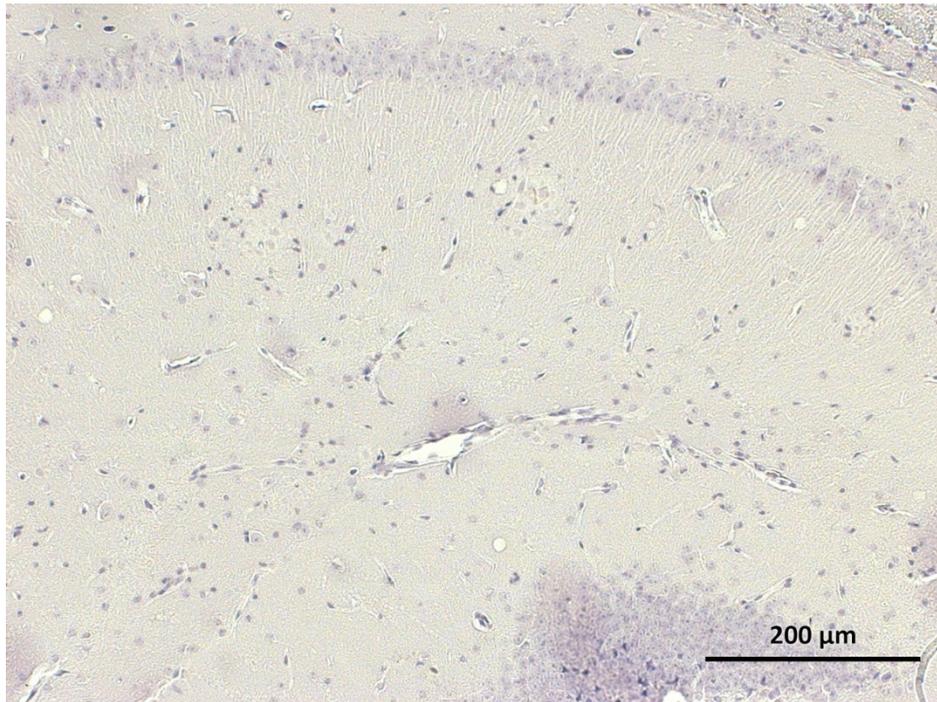
Auch für diesen AK wurden über die eigentlichen Färbungen hinaus Kontrollfärbungen durchgeführt. So konnten unspezifische Bindungen durch den Einsatz von isotypengleichen AK anstelle des Primärantikörpers überprüft werden. Die Inkubation der Schnitte mit diesem Isotypen-AK ergab keine Anfärbungen in den ASM gehemmten und ungehemmten TgCRND-8 Mäusen (Abb. 17).

Die Spezifität des Sekundärantikörpers erwies sich durch das Nichtanfärben von Kontrollschnitten, welche zuvor nicht mit Primärantikörper inkubiert worden waren (Abb. 18).



**Abb. 17 Hippocampusregion einer TgCRND8-Maus (10x)**

Isotyp-Kontrollfärbung für Mac-3 AK mit purified monoclonal Rat IgG



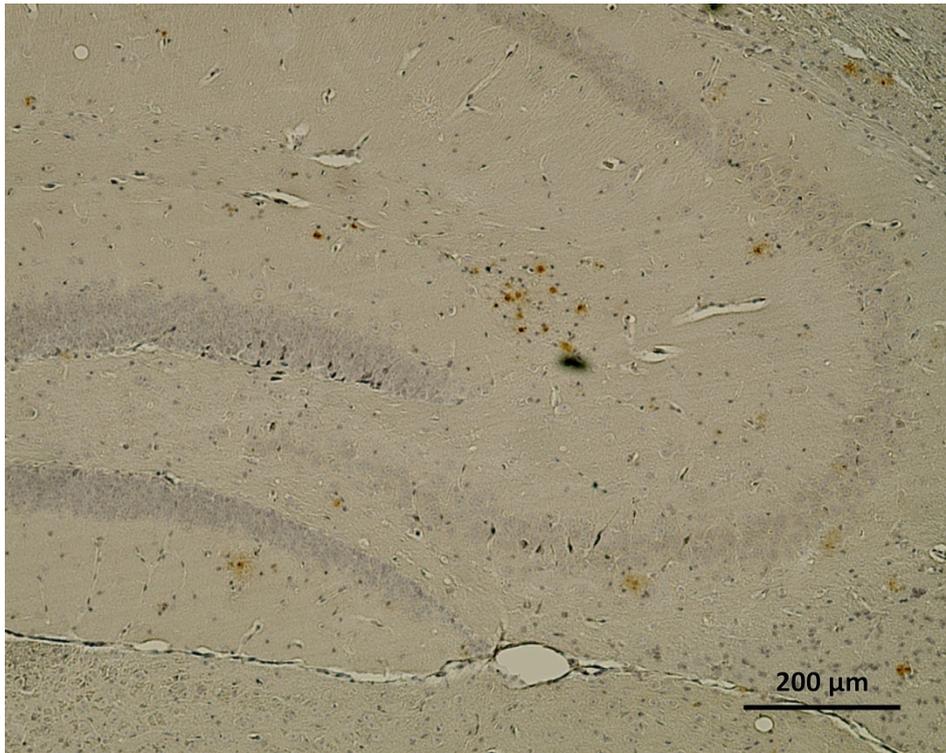
**Abb. 18 Hippocampusregion einer TgCRND8-Maus (10x)**

Kontrollfärbung für den Sekundärantikörper (ohne Primärantikörper, d.h. ohne Mac-3 AK)

## **4.2 A $\beta$ -Last**

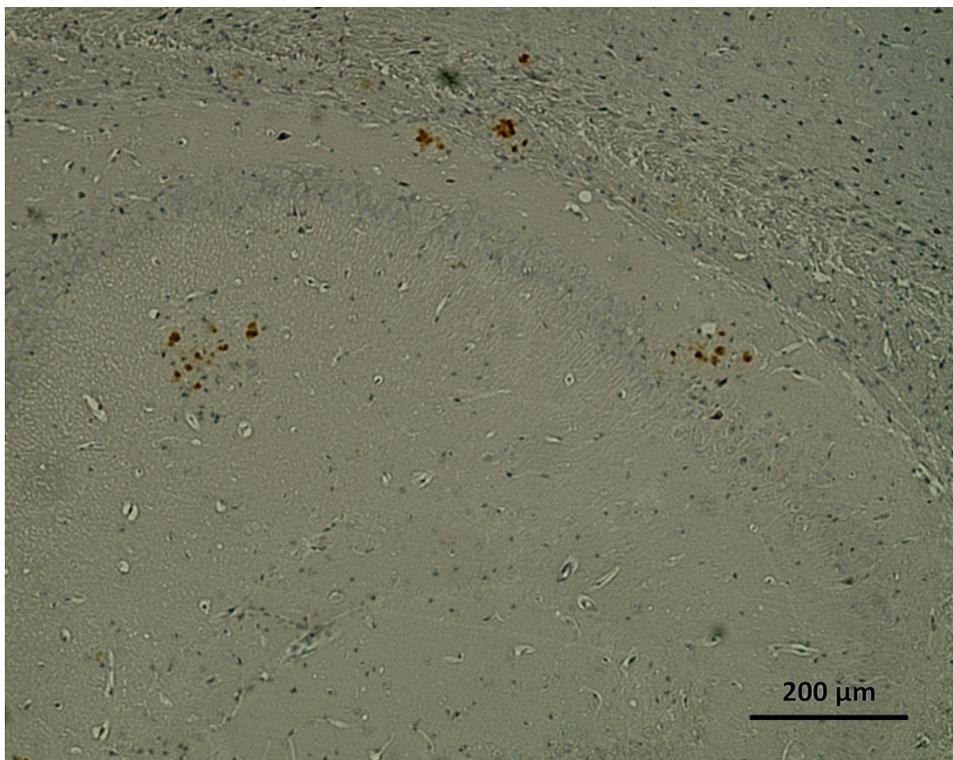
### **4.2.1 Nicht signifikant geringere A $\beta$ -Plaqueexpression in Gehirnschnitten von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen im Vergleich zu ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen**

Die A $\beta$ -Plaqueausprägung in den Versuchstieren wurde durch die Immunhistochemie und das ELISA quantifiziert. Mithilfe der ersteren analysierte man vier Schnitte einer linken Gehirnhälfte im Abstand von 70 $\mu$ m auf ihre Plaquedichte im Hippocampus. Es wurde der Mittelwert für jedes Gehirn aus den vier Quotienten der Schnitte aus Plaqueanteil durch Hippocampusanteil berechnet. Für die erhaltenen Ergebnisse wurde weiterhin innerhalb einer Gruppe der Durchschnittswert kalkuliert. Ein gemittelter prozentualer Plaqueanteil von 0,551% in *einem* Hippocampusanschnitt in den Kontrollmäusen (n=6), steht einem Anteil von 0,287% in den ASM-gehemmten Artgenossen (n=5) gegenüber. Dieser Trend ist jedoch nicht signifikant (p=0,255). Die angefügten exemplarischen Abbildungen zeigen die Plaqueausprägung (morphologisch als braune diffuse Anfärbungen zu sehen) in der Hippocampusregion der Gruppen.



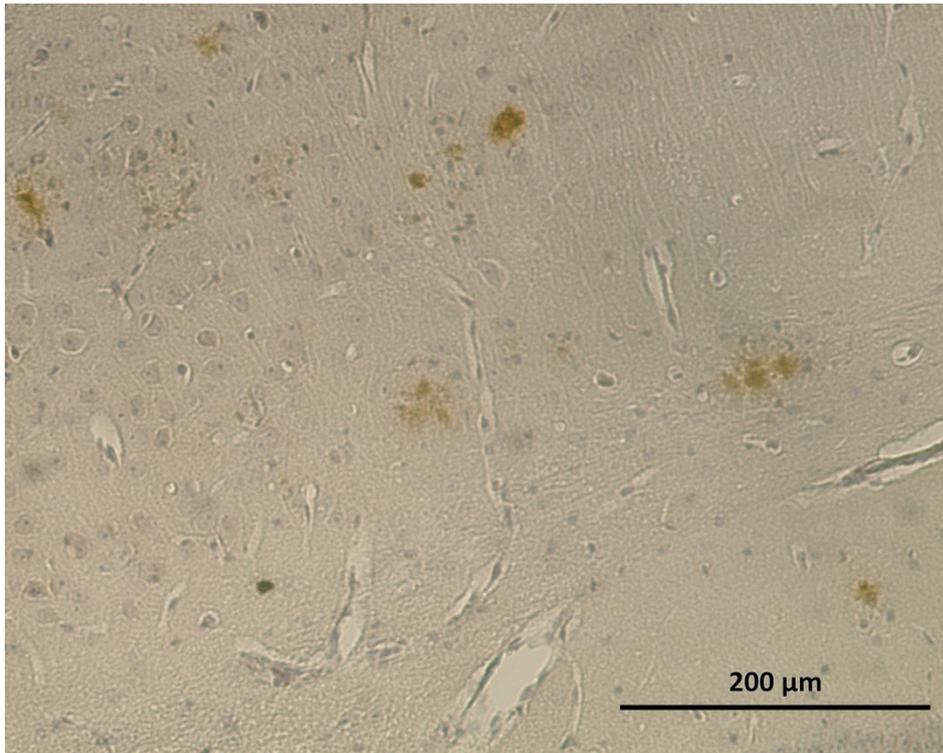
**Abb. 19 Hippocampusregion einer ASM-ungehemmten TgCRND8-Maus (10x)**

Anti-Human Beta Amyloid positive Bestandteile sind braun dargestellt.

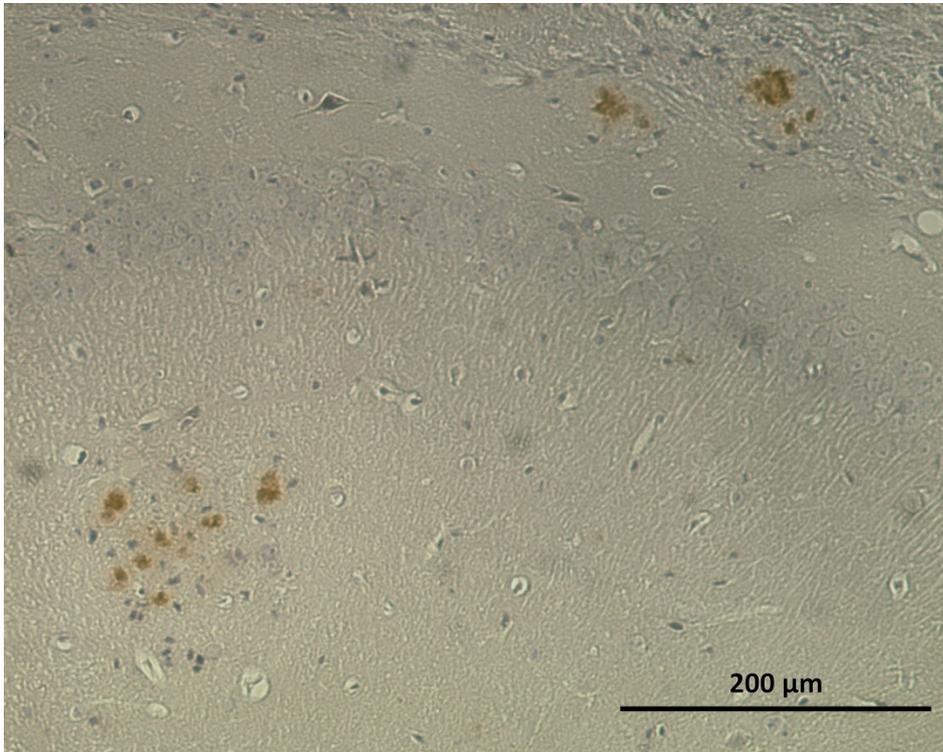


**Abb. 20 Hippocampusregion einer ASM-gehemmten TgCRND8-Maus (10x)**

Anti-Human Beta Amyloid positive Bestandteile sind braun dargestellt.



**Abb. 21 Hippocampusregion einer ASM-ungehemmten TgCRND8-Maus (20x)**  
Anti-Human Beta Amyloid positive Bestandteile sind braun dargestellt

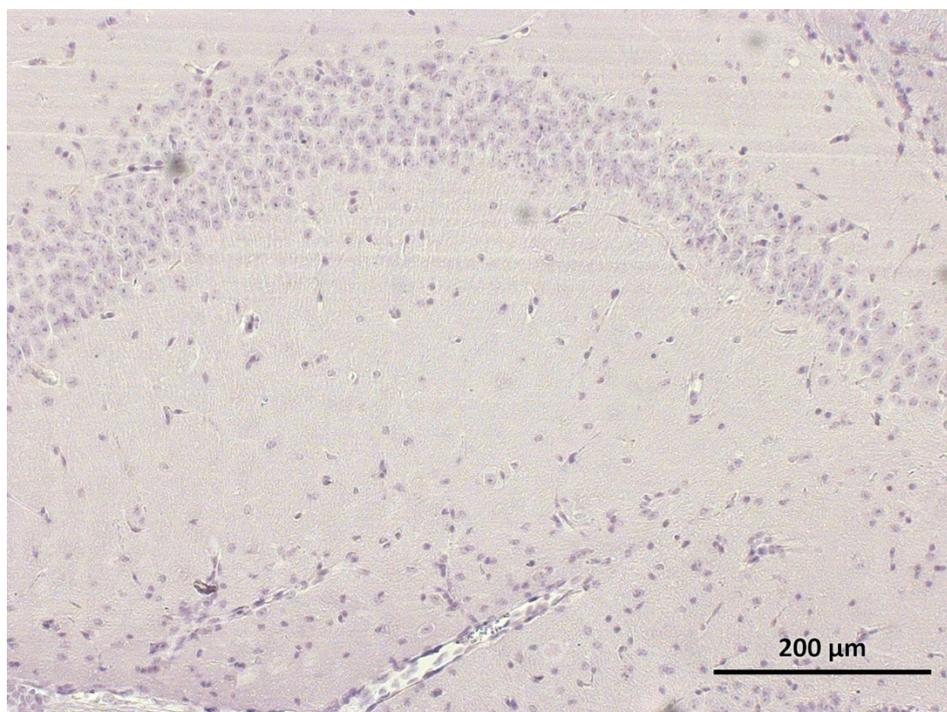


**Abb. 22 Hippocampusregion einer ASM-gehemmten TgCRND8-Maus (20x)**  
Anti-Human Beta Amyloid positive Bestandteile sind braun dargestellt

Ebenfalls für den A $\beta$ -Primärantikörper wurde eine Isotyp-Kontrolle durchgeführt. Wie erwünscht, färbten sich diese Negativkontrollschnitte weder in den mit Amitriptylin behandelten noch in den unbehandelten Mäusen an (Abb. 23).

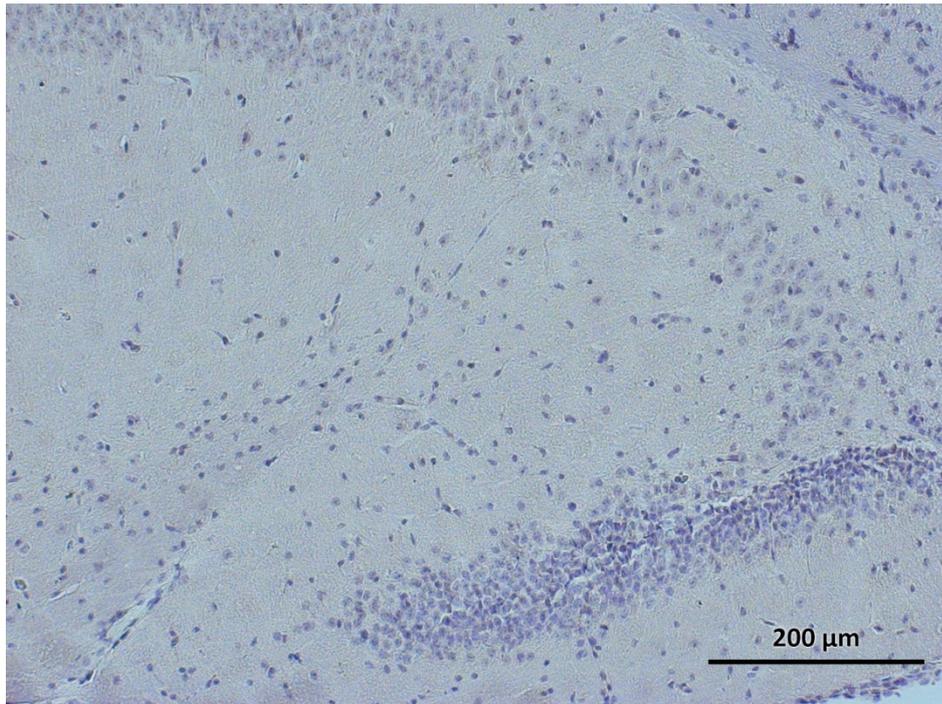
Darüber hinaus konnte durch das Nichtanfärben einer Wildtyp-Maus, also einer Maus ohne APP-Mutationen und somit ohne A $\beta$ -Ausprägung, die Spezifität des Primärantikörpers in höchstem Maße bestätigt werden (Abb. 24).

Auch die Kontrollen für den Sekundärantikörper waren negativ und bewiesen somit eine hohe Spezifität des Sekundärantikörpers gegenüber seinem Primärantikörper (Abb. 25).



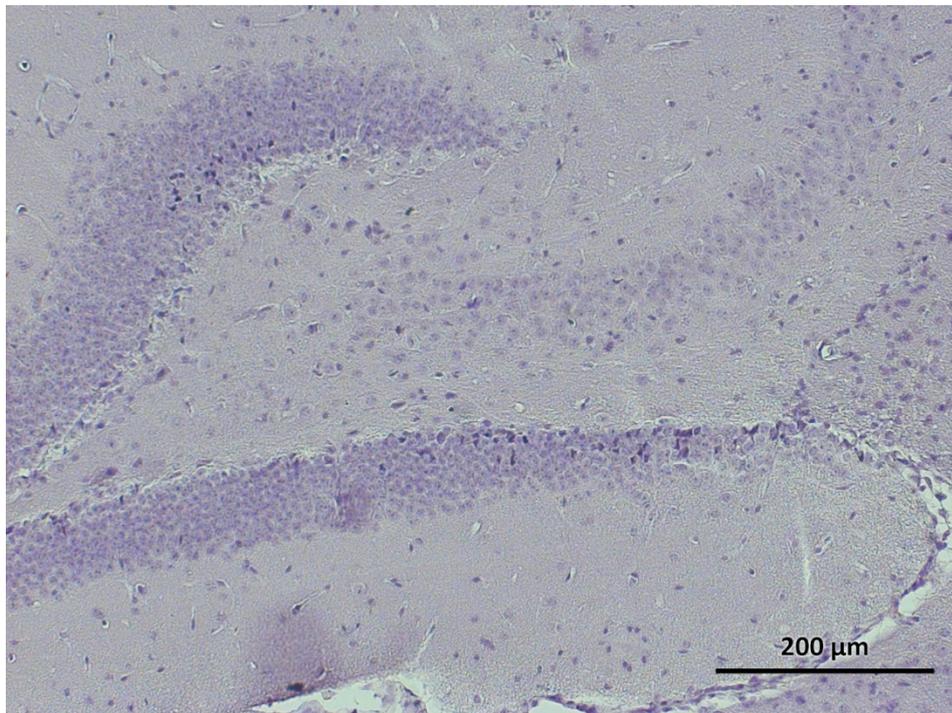
**Abb. 23** Hippocampusregion einer TgCRND8-Maus (10x)

Isotyp-Kontrollfärbung für Anti Human  $\beta$ -Amyloid AK mit PE Mouse IgG



**Abb. 24 Hippocampusregion einer Wildtyp-Maus (10x)**

Kontrollfärbung für Anti Human  $\beta$ -Amyloid AK durch eine Wildtyp-Maus (ohne APP-Mutation)



**Abb. 25 Hippocampusregion einer TgCRND8-Maus (10x)**

Kontrollfärbung für den Sekundäntikörper (ohne Primäntikörper, d.h. ohne A $\beta$  AK)

#### **4.2.2 Geringere A $\beta$ 42- und A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Spiegel in Guanidin-Gehirnhomogenaten von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen im Vergleich zu ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen**

Neben der Immunhistochemie dokumentierte man mit dem ELISA die A $\beta$ -Expression im Gehirngewebe der Mäuse. In den drei angefertigten Gehirnhomogenaten (TBS, TBS-T oder Guanidin) der rechten Hemisphäre wurden für die ASM-ungehemmten Alzheimer-Tiere (n=7) und die ASM-gehemmten Mäuse (n=6) die jeweiligen Konzentrationen von A $\beta$ 42 bzw. A $\beta$ 40 und der dazugehörige Quotient untersucht. Die Ergebnisse wurden für die einzelnen Gruppen gemittelt. In den TBS-Lösungen befanden sich hauptsächlich die A $\beta$ -Monomere, in der TBS-T-Lösung vermehrt die Oligomere. Mittels der Guanidinlösung wurde die Konzentration fibrillärer A $\beta$ - (Plaque)-Bestandteile eruiert.

Wie aus Abb. 26, Abb. 27 und Abb. 28 zu entnehmen, liegt A $\beta$ 40 leicht vermehrt in der TBS- und TBS-T-Fraktion der unbehandelten Tiere vor. Diese Trends erweisen sich als nicht signifikant. Die A $\beta$ 40-Anteile in den jeweiligen Guanidinlösungen nähern sich einander an.

Nahezu betragsgleich präsentieren sich die A $\beta$ 42-Konzentrationen in den TBS-Homogenaten der beiden Gruppen. Die absoluten Zahlen beziffern sich auf 23,68pgA $\beta$ 42/mg Gehirn in der Kontrollfraktion und 23,79pg A $\beta$ 42/mg Gehirn im ASM-gehemmten Kollektiv. Anders verhalten sich diese in der TBS-T- und Guanidinfraktion. Die mittlere A $\beta$ 42-Konzentration in der TBS-T-Lösung ist in der mit Amitriptylin behandelten Gruppe minimiert, allerdings weichen die einzelnen Werte stark voneinander ab. Auch in der Guanidinlösung offerieren sich Werte von beträchtlichem Unterschied, verdeutlicht durch einen zugehörigem p-Wert<0,05.

Die Analysen der Mittelwerte aus den Quotienten von A $\beta$ 42 zu A $\beta$ 40 in der TBS- und TBS-T-Fraktion ergeben nicht signifikante Ungleichheiten. Hingegen imponiert ein vermindertes Verhältnis aus den Peptiden in der Guanidinlösung für die ASM-geblockten Tiere (p<0,05).

Aufzuzeigen ist, dass A $\beta$ 42 in allen Homogenaten deutlich weniger ausgeprägt vorliegt, als A $\beta$ 40 (siehe Verhältnis aus A $\beta$ 42/A $\beta$ 40<0,6). Desweiteren präsentieren sich in den Guanidinfraktionen der Kontroll- und Amitriptylinprobanden höhere Konzentrationen von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 als in den jeweiligen TBS- und TBS-T-Homogenaten.

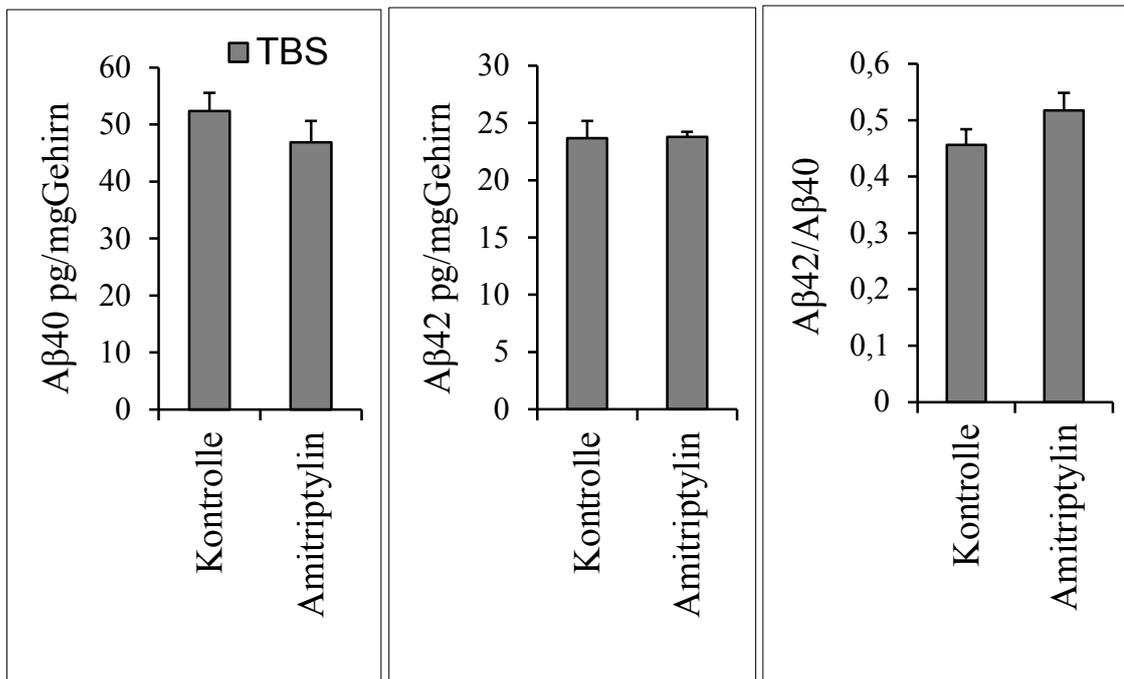


Abb. 26 Vergleich der Spiegel von Aβ40, Aβ42 und dem Aβ42/Aβ40-Verhältnis in TBS-Gehirnhomogenaten von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen u. von ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Tieren

In den TBS-Homogenaten lässt sich kein signifikanter Effekt bzgl. des Aβ40-, Aβ42- oder des Aβ42/Aβ40-Spiegel nach Amitriptylingabe dokumentieren. (Die eingetragenen Striche auf den Balken zeigen den Standardfehler des arithmetischen Mittels an).

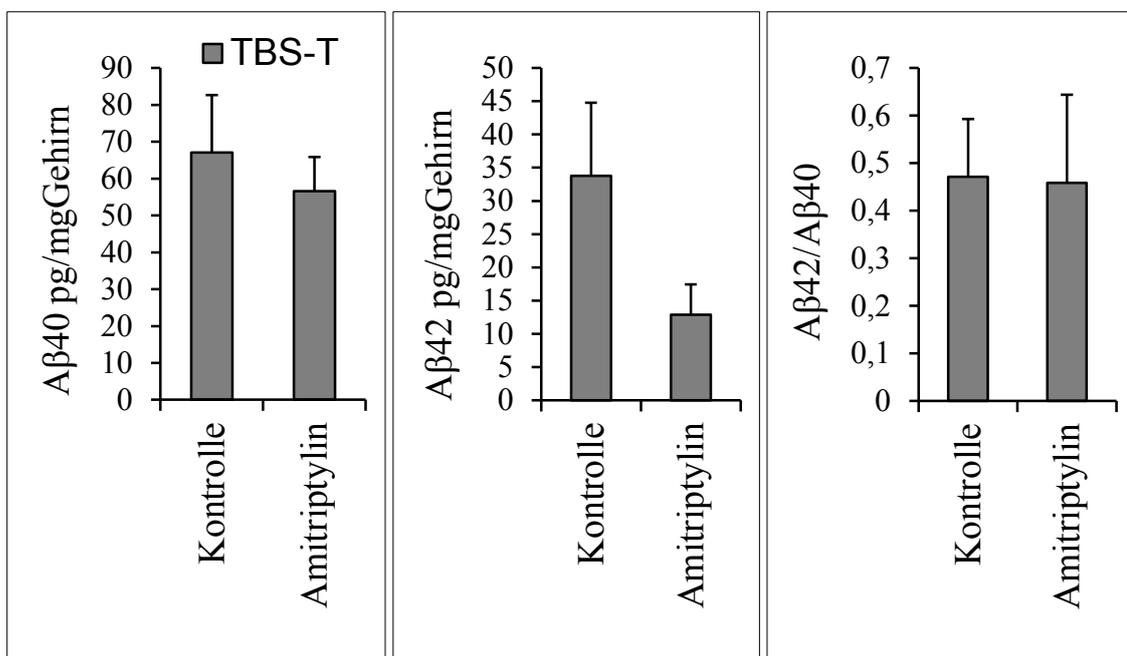


Abb. 27 Vergleich der Spiegel von Aβ40, Aβ42 und dem Aβ42/Aβ40-Verhältnis in TBS-T-Gehirnhomogenaten von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen und von ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Tieren

In der mit Amitriptylin behandelten Alzheimergruppe lässt sich kein signifikanter Konzentrationsunterschied von Aβ40 bzw. Aβ42 sowie des zugehörigen Quotienten in der TBS-T-Fraktion im Vergleich zur unbehandelten Gruppe ermitteln. (Die eingetragenen Striche auf den Balken zeigen den Standardfehler des arithmetischen Mittels an).

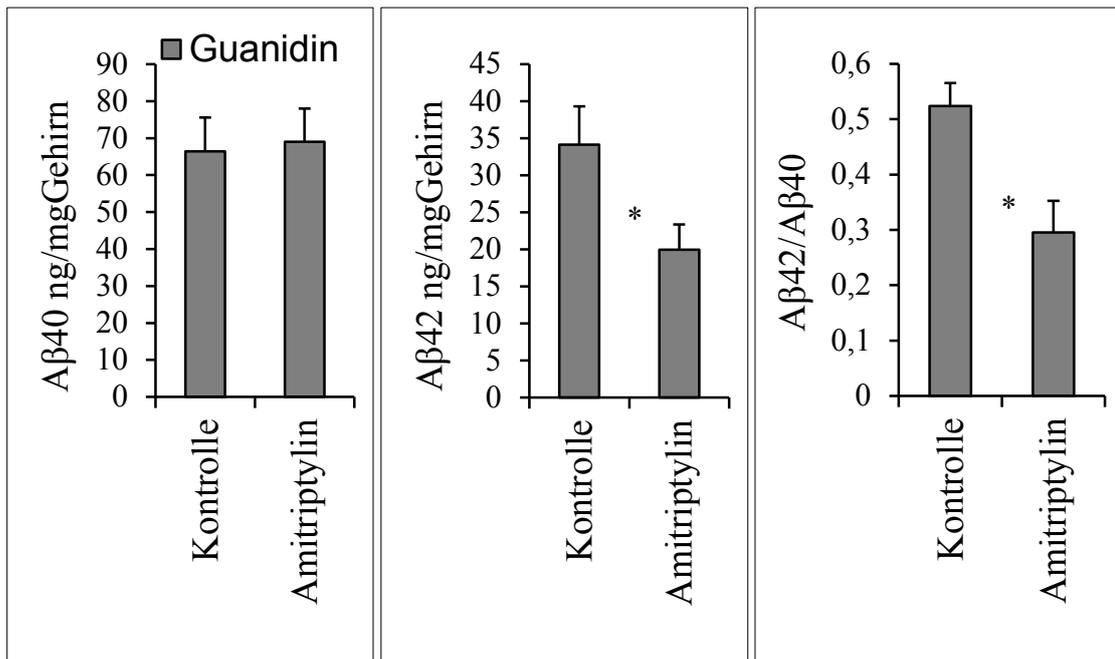


Abb. 28 Vergleich der Spiegel von Aβ40, Aβ42 und dem Aβ42/Aβ40-Verhältnis in Guanidin-Gehirnhomogenaten von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen und von ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Tieren

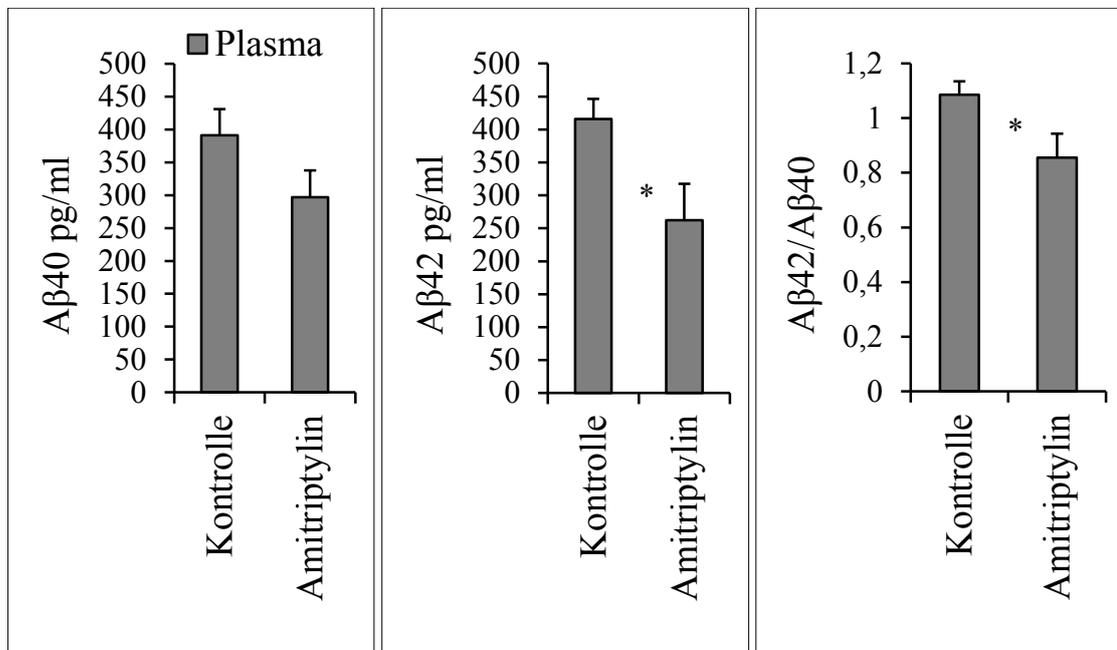
Der Aβ42-Gehalt sowie der Quotient aus Aβ42 zu Aβ40 der Amitriptylingruppe ist in der Guanidinfraction signifikant (\*) gefallen. (Die eingetragenen Striche auf den Balken zeigen den Standardfehler des arithmetischen Mittels an).

#### 4.2.3 Geringere Aβ42- und Aβ42/Aβ40-Spiegel im Blutplasma von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen im Vergleich zu ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen

Über die Demonstration der veränderten Aβ-Last im Gehirngewebe der Tiere hinaus, lässt sich eine modifizierte Ausprägung im Blutplasma der Mäuse nachweisen. Durch das ELISA determinierte man die Konzentration von Aβ42 und Aβ40 im Blutplasma sowie ihr Verhältnis zueinander. Die Werte wurden jeweils für die Amitriptylin- und Kontrollgruppe gemittelt.

Der Spiegel von Aβ40 erreicht in der Kontrollgruppe einen Durchschnittswert von ca. 391pg/ml, das ASM-gehemmte Kollektiv dagegen verzeichnet 297pg/ml. Darüber hinaus ist der Aβ42-Gehalt in letzterem um 37% niedriger als in der Kontrollgruppe. Der unterschiedliche Aβ42-Gehalt erfüllt das Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Gleichmaßen ergibt sich für den Quotient von Aβ42 zu Aβ40 im Plasma ein signifikanter Unterschied.

Zusätzlich kann man feststellen, dass die A $\beta$ 42- und A $\beta$ 40-Konzentration in der Amitriptylin- und Kontrollgruppe weniger stark differieren (A $\beta$ 42/A $\beta$ 40>0.8) als in den Gehirnhomogenaten der jeweiligen Gruppe (Abb. 26, Abb. 27, Abb. 28 A $\beta$ 42/A $\beta$ 40<0,6).



**Abb. 29 Vergleich der Spiegel von A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 und dem A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Verhältnis im Blutplasma von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen und von ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Tieren**

Die A $\beta$ 42- und A $\beta$ 40-Konzentrationen sowie ihr Verhältnis zueinander sind im Plasma in der ASM-gehemmten Einheit (teils) deutlich gefallen. (Ein mit \* versehenes Balkenpaar symbolisiert einen signifikanten Werteunterschied (mit  $p < 0,05$ ) der Kontrollgruppe gegenüber der ASM-gehemmten Gruppe. Die eingetragenen Striche auf den Balken zeigen den Standardfehler des arithmetischen Mittels an).

### 4.3 Entzündungsparameter

#### 4.3.1 Höhere TNF- $\alpha$ -, IL-1 $\beta$ -, CCL-2-mRNS-Expression und geringere IL-10-mRNS-Expression in ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen im Vergleich zu ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen

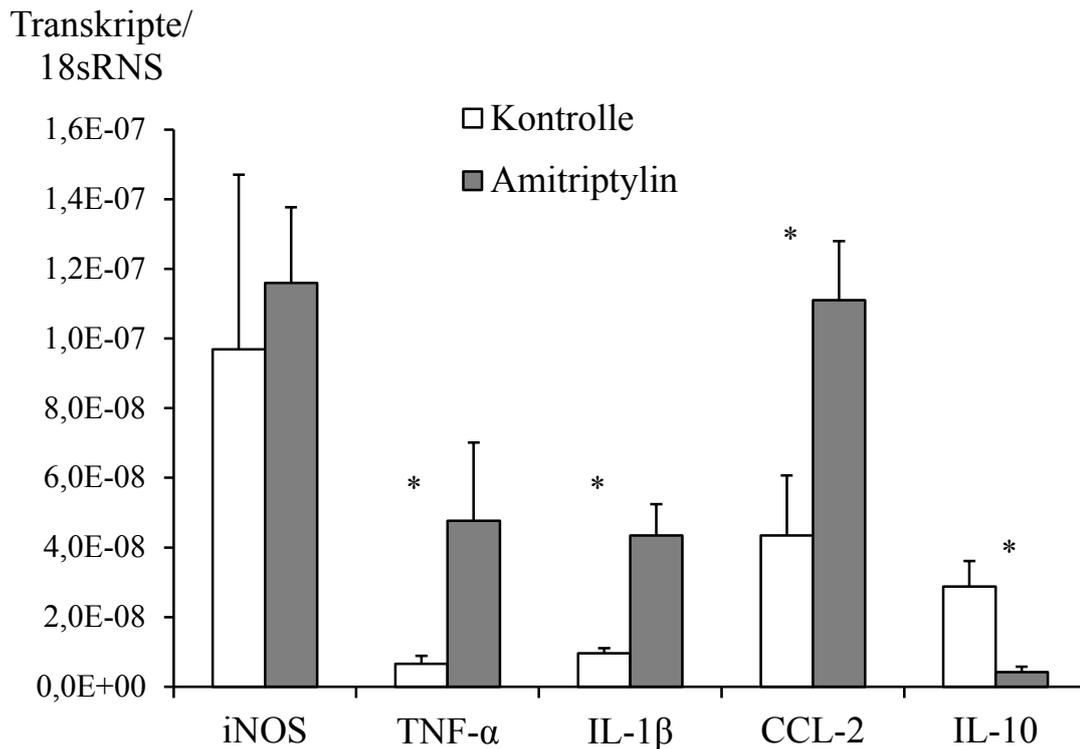
Mit dem Verfahren der quantitativen Echtzeit Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion gelang der Vergleich des mRNS-Gehaltes (über eine komplementäre DNS) von iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL-2 und IL-10 in Gehirnproben der mit Amitriptylin behandelten Mäuse (n=6) und der unbehandelten Tiere (n=7). Die jeweiligen genormten Mittelwerte mit ihren Standardfehlern des arithmetischen Mittels bzgl. einer Gruppe und Parameters ergeben die skizzierten Werte in

Abb. 30. Die Graphik spiegelt die Expression der Transkripte im Alter von 6 Monate alten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen wieder.

Die Mittelwerte der Einheiten unterscheiden sich für iNOS mit einem p-Wert von 0,749 nicht bedeutsam von einander. Eine signifikante Ungleichheit (mit  $p < 0,05$ ) offeriert sich für die Mittelwerte von TNF- $\alpha$  (Kontrollgruppe:  $6,634E-09/18sRNS$ , ASM-gehemmte Fraktion:  $4,770E-08/18sRNS$ ). Die Gegenüberstellung des gemittelten Gehaltes des Chemokins CCL-2 zeigt gleichermaßen einen bedeutsam höheren Spiegel in den Amitriptylin-Mäusen als in dem konkurrierenden Kollektiv. Es lässt sich ein p-Wert von 0,018 ableiten. Die durchschnittliche Expression von IL-1 $\beta$  in der ASM-gehemmten Einheit beläuft sich auf  $4,349E-08/18sRNS$ , in der Kontrollgruppe auf  $9,578E-09/18sRNS$ , sodass auch hier ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) auszumachen ist.

Im Vergleich zu den erhöhten Werten der obigen Parameter zeichnet sich die Ausprägung von IL-10 durch einen gegenläufigen Charakter aus. Auch hier ergibt sich ein  $p$ -Wert  $< 0,05$ .

Folglich ist festzuhalten, dass lediglich für iNOS kein signifikantes Ungleichgewicht in der Transkriptionsrate der zwei Kollektive zu beobachten ist.



**Abb. 30** Vergleich der Transkriptexpression von iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL-2 und IL-10 in Gehirnproben von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen und von ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Tieren

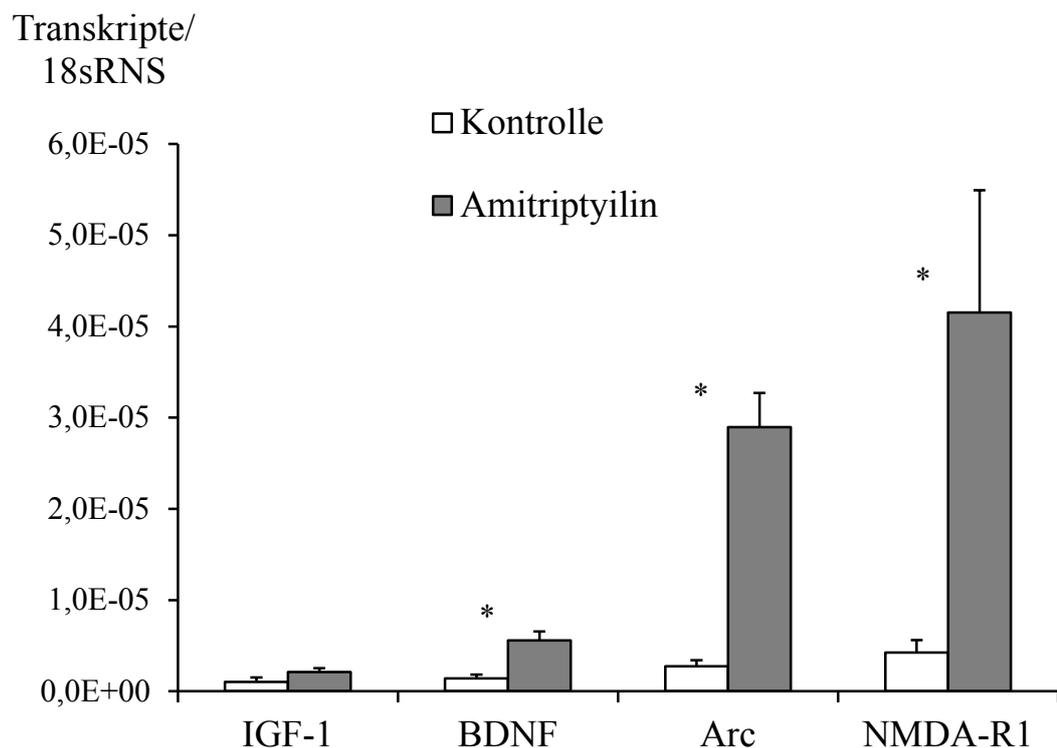
Mittels der qRT-PCR sind signifikant erhöhte Transkriptionswerte für TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und CCL-2 in der ASM-gehemmten Gruppe sowie signifikant erniedrigte Werte für IL-10 gemessen worden. Lediglich für iNOS ist kein signifikanter Unterschied ermittelt worden. (Ein mit \* versehenes Balkenpaar symbolisiert einen signifikanten Werteunterschied mit  $p < 0,05$  für den jeweiligen Parameter der Kontrollgruppe gegenüber der ASM-gehemmten Gruppe. Die eingetragenen Striche auf den Balken zeigen den Standardfehler des arithmetischen Mittels an).

#### 4.4 Neurotrophe und neuroprotektive Parameter

##### 4.4.1 Höhere BDNF-, Arc- und NMDA-R1-mRNS-Expression in ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen im Vergleich zu ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen

Mit der qRT-PCR wurde in gleicher Weise die Transkriptionsrate von IGF-1, BDNF, Arc und NMDA-R1 in den TgCRND8-Alzheimer-Mäusen mit und ohne Applikation von Amitriptylin studiert. Abermals wurden die zugehörigen Mittelwerte der 6 Monate alten Mäuse der Kontrollgruppe ( $n=7$ ) und der ASM-gehemmten Fraktion ( $n=6$ ) bestimmt.

Es lassen sich anhand dieser Methode erhöhte Werte für IGF-1 nachweisen. Allerdings erfüllen diese mit einem p-Wert von 0,13 nicht die Kriterien der Signifikanz. Alle anderen aufgeführten Marker erreichen einen p-Wert deutlich unter 0,05. So hat sich die durchschnittliche Expression von Arc in der ASM-geblockten Gruppe verzehnfacht und imponiert mit einem p-Wert von 0,000012. Auch BDNF und NMDA-R1 sind in diesen Mäusen verglichen mit den unbehandelten Tieren in außerordentlich großen Mengen transkribiert.



**Abb. 31** Vergleich der Transkriptexpression von IGF-1, BDNF, Arc und NMDA-R1 in Gehirnproben von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen und von ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Tieren

Mittels der qRT-PCR sind signifikant erhöhte Transkriptionswerte für BDNF, Arc und NMDA-R1 in der ASM-gehemmten Gruppe gemessen worden. IGF-1 erfüllt die Signifikanzkriterien mit einem p-Wert von 0,13 nicht. (Ein mit \* versehenes Balkenpaar symbolisiert einen signifikanten Werteunterschied mit  $p < 0,05$  für den jeweiligen Parameter der Kontrollgruppe gegenüber der ASM-gehemmten Gruppe. Die eingetragenen Striche auf den Balken zeigen den Standardfehler des arithmetischen Mittels an).

## 5 Diskussion

Der Morbus Alzheimer ist eine progressive Neurodegenerationserkrankung, deren charakteristische Merkmale die Ausbildung von  $\beta$ -Amyloid und neurofibrillären Bündel darstellen (28). U. a. fungiert das A $\beta$  als Stimulus für zahlreiche PRR's auf Mikrogliazellen und aktiviert somit das Immunsystem, welches sich in der Folge wiederum selbst anregt (26), (31). Das Immunsystem nimmt in der Alzheimer-Pathologie eine ambivalente Rolle ein. Auf der einen Seite operiert es im Sinne seiner physiologischen Abwehrfunktion, indem es durch Phagozytose A $\beta$ -Plaques eliminiert und neuroprotektiv wirken kann. Andererseits ist eine permanente Aufrechterhaltung eines inflammatorischen Milieus zytotoxisch und fördert neuronale Dysfunktionen und wahrscheinlich das Voranschreiten der Krankheit (31), (44), (45). Diese These wird durch Studien unterstützt, in denen eine Langzeitapplikation von entzündungshemmenden Medikamenten, wie z.B. den NSAID's, den Beginn und die Progression der Alzheimer-Erkrankung verzögern konnte (16).

Eine fundamentale Rolle im Entzündungsprozess übernimmt wohl die ASM. Durch ihre Synthese von Ceramid modifiziert sie die Membran und auf diese Weise deren biophysikalischen Eigenschaften. So werden Rezeptorendichte, Vesikelformation und letztendlich Signaltransduktionen als auch zelluläre Prozesse beeinflusst. Daher triggert und kontrolliert die ASM (teilweise zusammen mit der neutralen Sphingomyelinase und der Ceramid-Neusynthese) z.B. die Apoptose und inflammatorische Prozesse (75), (86). Ein weiterer Grund für die vielseitige Einflussnahme der ASM könnte der Umsatz von Ceramid in diverse bioaktive Stoffe sein, welche teils kontrovers agieren können (76), (86). Dementsprechend sollte sich auch eine Hemmung des Enzyms auf unterschiedlichen Ebenen auswirken.

In Alzheimer-Patienten sind eine gesteigerte Aktivität der ASM und ein erhöhter Ceramidlevel aufgezeigt worden. Nachgewiesen ist, dass A $\beta$ -Oligomere in neuronalen Zellkulturen das Enzym aktivieren (70), (76).

Wie erkennbar wird, sind jedoch die genauen Tätigkeitsbereiche der ASM sehr komplex und nur mangelhaft geklärt. Dies gilt auch für ihre Funktion im Pathomechanismus der Alzheimer-Erkrankung.

In dieser Dissertation korrelierte eine pharmakologische Intervention mit dem ASM-Hemmstoff Amitriptylin von TgCRND8-Alzheimer-Mäusen, im Vergleich zu unbehandelten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen, mit:

- einem signifikanten Rückgang der durchschnittlichen Iba-1 positiven Mikrogliazellanzahl,
- einem signifikanten Rückgang der durchschnittlichen A $\beta$ 42-Konzentration in den Guanidingehirnhomogenaten sowie in den Plasmaproben,
- einem signifikanten Rückgang der durchschnittlichen A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Relation in den Guanidingehirnhomogenaten sowie in den Plasmaproben,
- einem signifikanten Anstieg der durchschnittlichen Transkriptionsrate von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL-2,
- einem signifikanten Rückgang der durchschnittlichen Transkriptionsrate von IL-10,
- einem signifikanten Anstieg der durchschnittlichen Transkriptionsrate von BDNF, Arc, NMDA-R1.

## 5.1 Versuchsgruppen

Grundlage aller durchgeführten Experimente boten 13 transgene Mäuse vom Typ TgCRND8 im Alter von 6 Monaten. 6 der Versuchstiere wurden mit dem ASM-Hemmstoff Amitriptylin behandelt. Die 7 unbehandelten Mäuse dienten der Kontrolle. Alle Mäuse wiesen ein doppelt mutiertes APP-Gen auf und bildeten frühzeitig A $\beta$  aus (101). Daher dienten die Tiere als Modell der Alzheimer-Erkrankung bzw. der Amyloidogenese. Dadurch ließen sich die Auswirkungen der pharmakologischen Intervention der ASM durch Amitriptylin auf die Alzheimer-Pathologie bzw. auf die Amyloidogenese überhaupt erst analysieren. Zumal konnte die Intervention in einem Organismus überprüft werden. Allerdings imitierten die transgenen Mäuse den Morbus Alzheimer nicht auf allen Ebenen. So bildeten die TgCRND8-Mäuse keine neurofibrillären Bündel aus (101). Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass Ergebnisse auch speziesabhängig sein können, sodass diese nur unter Vorbehalt von einem Maus-Modell auf den Menschen übertragen werden können. Darüber hinaus wären größere Versuchsgruppen aussagekräftiger und daher wünschenswert gewesen.

Eingesetzt wurde der, u.a. von Kornhuber und Mitarbeitern zertifizierte, ASM-Inhibitor Amitriptylin (80). Das trizyklische Antidepressivum bewährte sich schon in anderen Alzheimer-Studien als Hemmstoff der ASM. Als Beispiel ist die Forschungsarbeit von Xuan und Kollegen zu nennen, in dessen Studie sich nach Stimulation mit A $\beta$ 42-Peptiden ein verminderter Ceramidlevel in zuvor mit Amitriptylin behandelten dendritischen Zellen der Maus im Vergleich zur unbehandelten Zellgruppe präsentierte (78). Allerdings kann Amitriptylin als indirekter funktionaler Hemmstoff neben der ASM auch weitere lysosomale Enzyme wie die kontrovers agierende saure Ceramidase hemmen. Reduzierte Ceramidlevel unter Amitriptylinbehandlung implizieren jedoch eine mögliche Präferenz des trizyklischen Antidepressivums bzgl. der ASM (68). Die Determinierung des Ceramidspiegels wäre dennoch in dieser Dissertation nützlich gewesen.

Weiterhin muss in Erwägung gezogen werden, dass die Auswirkungen der Amitriptylingabe in vivo auch von unbekanntem, nicht-lysosomal gelegenen Zielfaktoren abhängen könnten.

## **5.2 Fragestellung 1: Wie wirkt sich die Gabe von Amitriptylin als Hemmstoff der ASM auf die Mikrogliaanzahl im Gehirn von TgCRND8-Alzheimer-Mäusen aus (IHC) ?**

Die Mikrogliazelle reagiert als eine der ersten Defensivzellen im ZNS auf Pathogene. In diesem Sinne identifiziert sie auch A $\beta$  über PRR als Pathogen und triggert daraufhin eine Entzündungsreaktion (26). Demgemäß belegen Studien die Aktivierung und Ansammlung der Zellen schon in frühen Stadien der Alzheimer-Erkrankung (55), (58). Der Mikrogliazelle wird eine Schlüsselrolle in der neurodegenerativen Erkrankung zugeschrieben. Zum einen eliminiert sie als Phagozyt A $\beta$ -Depots und produziert neurotrophe Substanzen wie BDNF und IGF-1. Zum anderen unterstützt sie durch eine Unterhaltung von zytotoxischen Entzündungsprozessen die Progression der Alzheimer-Pathogenese. So ist sie neben Astrozyten und Neuronen eine wichtige Quelle von entzündungsfördernden Mediatoren und produziert selbst auch A $\beta$  (16), (26), (45).

Daher sollten die Auswirkungen der ASM-Hemmung auf die A $\beta$ -Last, die Expression von entzündlichen sowie von neurotrophen Mediatoren/Parametern mit dem Effekt auf die Mikrogliazellanzahl verglichen werden (siehe auch 5.3, 5.4, 5.5.).

Die Anzahl der Mikrogliazellen wurde mittels der Immunhistochemie erforscht, eine bewährte Methode zur Beurteilung der Morphologie von Gewebeproben und dem Nachweis bestimmter Strukturen (102). Das größte Problem dieser Methode ist jedoch die mögliche mangelnde Spezifität der verwendeten AK für ihr AG, d.h. dass die AK Strukturen anfärben könnten, die nicht ihren eigentlichen AGen entsprechen und so zu falsch positiven Ergebnissen führen könnten. Daher wurden nur AK ausgewählt, deren Herkunft und deren immunisierendes AG bekannt waren (siehe jeweilige firmeneigene Produktinformationen, Tab. 6).

Außerdem wurden für alle verwendeten Primärantikörper entsprechende Isotyp-Kontrollen, die etwaige unspezifische Bindungen detektieren würden, durchgeführt. Die Spezifität der Sekundärantikörper wurde überprüft, indem man bei den Färbungen den Primärantikörper ausließ. Alle Isotyp-Kontrollen und die Kontrollen der Sekundärantikörper waren wie verlangt negativ (Abb. 11, Abb. 12, Abb. 17, Abb. 18).

Darüber hinaus belegten verschiedene Studien die Spezifität der AK. So wurde für Anti-Iba-1 mehrfach gezeigt, dass der AK eine für Iba-1 typische Bande bei 17kDa speziell in Mikrogliazellproben, nicht jedoch in Proben von Neuronen oder Astrozyten im Western Blot markierte (94), (95). Immunzytochemische Untersuchungen belegten ein kongruentes Färbemuster nach Doppelstaining mit Iba-1-AK und einem etablierten Mikrogliazell-AK (anti-ED-1 AK), nicht jedoch bei gleicher Markierung mit Neuronen-, Astrozyten-, oder Oligodendroglia-spezifischen Markern (95). Auch in der Immunhistochemie zeigten sich ähnliche Morphologien (Zellen mit wenig Zytoplasma und dünnen Zellärmchen) und Verteilungsmuster nach Färbung mit Iba-1-AK im Vergleich zu einem bekannten Mikroglia-spezifischen AK (OX-42) und auch im Vergleich zu früheren Publikationen (95), (112). Diese Morphologie ist ebenso in der vorliegenden Doktorarbeit nachzuweisen (Abb. 7, Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10). So kann aus oben genannten Gründen von einer hohen Spezifität des Anti-Iba-1-AK für Mikrogliazellen bzw. Iba-1 ausgegangen werden.

Der AK gegen AG Mac-3 auf der Oberfläche von Zellen des mononukleären-phagozytären Systems (hier den Mikrogliazellen) ist ebenfalls gut charakterisiert (siehe firmeneigene Produktinformationen, Tab. 6, (99), (100)). Dieser AK des Clones M3/84

färbt im Durchschnitt eine Bande bei 110 kDa (die Variabilität der Bande hängt wohl mit der Prozessierung des Mac-3-AG zusammen) (99), (100). Desweiteren sind Hintergrundfärbung aufgrund der negativen Isotyp-Kontrollen unwahrscheinlich (Abb. 17).

Zwar sind jegliche Isotyp- und Sekundärantikörperkontrollen wie erwünscht negativ, nichts desto trotz lassen sich falsch positive Markierungen durch die Primär- und Sekundär-AK nicht gänzlich ausschließen. Ihre Spezifität ist jedoch durch die bedachte Auswahl und Kontrollen der AK weitestgehend überprüft worden.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle der IHC liegt in dem Arbeitsschritt der Demaskierung der Gewebeproben, sodass auch hier „falsche“ Bindungsstellen entstehen oder eigentliche Epitope nicht ausreichend freigelegt oder zerstört werden könnten. Die Demaskierung durch Hitzebehandlung und Citratpuffer ist eine zuverlässige und in unserem Labor für die verwendeten AK und Gewebeproben bewährte und standardisierte Methode (107). Das Anfärben von etwaigen falschen Bindungsstellen wurde durch die Spezifitätskontrollen der Antikörper überprüft und nahezu ausgeschlossen (siehe oben). Auch zeigt der Vergleich der Morphologie der angefärbten Strukturen z.B. mit der Studie von Ito und Kollegen, dass es sich bei den nachgewiesenen Strukturen um Mikrogliazellen handelt (95). Weiterhin ist nur der direkte Vergleich der Mikrogliaanzahl zwischen den ASM gehemmten und ungehemmten Tieren und nicht die absolute Mikrogliaanzahl entscheidend. Daher werden bei standardisiertem Versuchsaufbau und somit gleicher Behandlung der Tiere restliche falsch negative oder falsch positive Anfärbungen relativiert. Allerdings lassen sich auch Artefakte durch die Demaskierung nicht vollständig ausschließen.

Durch die Immunhistochemie markierte Mikrogliazellen wurden in Unkenntnis der Gruppenzugehörigkeit der Mäuse bestimmt. Im immunhistochemischen Experiment wurde eine signifikant reduzierte Mikrogliazellanzahl im Hippocampus der ASM-defizitären Mäuse dokumentiert. Die orale Amitriptylingabe der TgCRND8-Alzheimer-Mäuse induzierte somit eine deutliche Verminderung der Mikrogliaanzahl in diesem Areal der linken Gehirnhemisphäre. Dieser Befund ist bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Die kontroverse Einflussnahme der Mikrogliazelle in der Alzheimer-Pathogenese, sprich die Elimination von A $\beta$  durch Phagozytose einerseits und die Förderung der schädlichen Entzündungsreaktionen andererseits, erfordert weitergehende Forschung

(31). Ansatzpunkt wäre, die Existenz von zwei Mikrogliazellpools - den gewebeigenen und den eingewanderten Zellen - tiefgründiger zu durchleuchten. Die Pools grenzen sich durch unterschiedliche Eigenschaften voneinander ab. Vermutet wird, dass die vom Knochenmark migrierten Zellen eine effizientere A $\beta$ -Elimination durch Phagozytose betreiben als die gewebeigenen (49), (56). Verkompliziert wird die Betrachtung der Mikrogliazelle durch die Präsenz von verschiedenen Phänotypen der Gliazelle in Gehirnen von Alzheimer-Patienten. Postuliert wird, dass ein M1-Aktivierungstypus der Mikrogliazellen die Degeneration durch neurotoxische Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  fördert (61). Jedoch dürfen ausgeschüttete proinflammatorische Botenstoffe nicht pauschal als neurotoxisch deklariert werden, da sie durchaus protektive Charakteristika aufweisen können (siehe 5.4) (52), (84), (113). Allerdings wird v.a. dem M2-Phänotypus unterstellt, schützend und regenerativ zu wirken, indem er u.a. die Sekretion von Stoffen wie BDNF, IGF-1 und IL-10 fördert. Darüber hinaus wird spekuliert, dass diese Polarisierung die Phagozytoseleistung steigert (61). Mit dem Alter von Alzheimer-Mäusen bzw. dem Progress der Alzheimer-Erkrankung ließ sich ein zunehmender Wechsel vom M2- in den M1-Phänotyp diagnostizieren (114).

In den durchgeführten Experimenten dieser Dissertation zeigte sich eine erhöhte Expression von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und CCL-2 in den mit Amitriptylin behandelten Mäusen - charakteristische Mediatoren für einen M1 aktivierten Phänotyp (61), (62). Die vermehrte Transkription von neurotrophen Substanzen wie BDNF (und die verminderte A $\beta$ -Last) in den ASM-defizitären Mäusen lassen jedoch auch auf das Vorliegen von M2 aktivierten Mikrogliazellen schließen. Dahingegen untypisch ist allerdings die verminderte Konzentration von IL-10 in diesen Mäusen, ebenfalls ein M2-Mediator (61). Unklar ist, warum neben erhöhten Spiegeln M1 und M2 typischer Mediatoren, eine reduzierte Mikrogliaanzahl identifiziert werden konnte. Allerdings müssen andere Zelltypen wie die Astrozyten oder Neurone, als eine zusätzliche Quelle von Mediatoren in Betracht gezogen werden (16), (46), (60).

Die reduzierte Mikrogliazellanzahl sollte daher auf ihre Herkunft, auf den Phänotypus der Zellen, sowie ihre Funktion in den verschiedenen Stadien der Alzheimer-Erkrankung weiter untersucht werden.

### **5.3 Fragestellung 2: Wie wirkt sich die Gabe von Amitriptylin als Hemmstoff der ASM auf die $\beta$ -Amyloid-Last im Gehirn und im Plasma von TgCRND8-Alzheimer-Mäusen aus (IHC, ELISA)?**

Ein wesentliches Kennzeichen der Alzheimer-Erkrankung ist das  $\beta$ -Amyloid. Charakteristisch sind mikroskopisch sichtbare neuritische Plaques aus fibrillärem A $\beta$ 42 und A $\beta$ 40, welche mit aktivierten Mikrogliazellen interagieren (18), (30). Vermutet wird, dass Plaques als Reservoir der löslichen A $\beta$ -Oligomere fungieren, wobei die Konzentration letzterer präziser als der Spiegel der Plaques mit dem Auftreten und dem Schweregrad der Alzheimer-Demenz korreliert (19), (33), (34). So war es von Interesse, die Konsequenzen der ASM-Hemmung auf die unterschiedlichen A $\beta$ -Pools zu ermitteln.

Mit zwei unabhängigen Methoden, der Immunhistochemie und dem ELISA, wurde die Ausprägung des  $\beta$ -Amyloids eruiert. Mit ersterer gelang durch den Einsatz von monoklonalem Maus Anti-Mensch Beta Amyloid, ein AK der gegen den N-terminalen Rest des A $\beta$  gerichtet ist, hauptsächlich die Darstellung von senilen extrazellulären A $\beta$ -Plaques (siehe Produktbeschreibung von Monoclonal Mouse Anti-Human Beta-Amyloid, Clone 6F/3D, M 0872, Dako), (96), (97), (98).

Der AK wurde in einer Studie von Matsunaga und Kollegen durch einen ELISA auf seine Markierung gegenüber synthetisierten Peptidabschnitte von A $\beta$  untersucht, wodurch sich seine Spezifität gegenüber einem N-terminalen Anteil von A $\beta$  bestätigte (98). Darüber hinaus sind die diffusen, fleckförmig aussehenden Anfärbungen durch A $\beta$ -AK in der hiesigen Arbeit mit der Morphologie von in der Literatur aufgezeigten A $\beta$ -Ablagerungen vergleichbar (Abb. 19, Abb. 20, (96), (115)).

Auch die für A $\beta$  durchgeführten Isotyp-Kontrollen und Kontrollen des Sekundär-AK waren negativ (Abb. 23, Abb. 25). Desweiteren konnte durch das Nichtanfärben einer Wildtyp-Maus, also einer Maus ohne APP-Mutationen und somit ohne A $\beta$ -Ausprägung, die Spezifität des Primärantikörpers in höchstem Maße bestätigt werden (Abb. 24). So kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass der AK nur sein vorgegebenes AG, nämlich A $\beta$  anfärbt.

Falsch negative Färbungen lassen sich durch die Kontrollen dagegen nicht ausschließen. Es wurde gezeigt, dass manche intrazelluläre granuläre A $\beta$ -Depots z.B. in

Mikrogliazellen nicht bis sehr gering angefärbt werden, da sie den N-terminalen Anteil wohl nicht (mehr) enthalten (96), (97).

Mögliche Artefakte der Antigen-Demaskierung wurden auch hier durch die Spezifitätskontrollen der Antikörper und durch den Vergleich der Morphologie der Plaques mit früheren Veröffentlichungen nahezu ausgeschlossen und etwaige verbleibende unspezifischen Anfärbungen durch die Standardisierung des Versuchsaufbaus relativiert (96), (115).

Allerdings konnte mit der IHC kein signifikanter Unterschied der A $\beta$ -Last im Hippocampus der zwei Versuchsgruppen diagnostiziert werden ( $p=0,255$ ).

Die Differenzierung der A $\beta$ -Last auf ihren A $\beta$ 40- sowie A $\beta$ 42-Gehalt erfolgte mit dem ELISA. Dieser wies die Peptidkonzentrationen in TBS-, TBS-T- und Guanidingehirnhomogenaten und den Plasmaproben nach. Die Herstellung von TBS-, TBS-T- und Guanidinhomogenaten diente der Selektion von verschiedenen löslichen A $\beta$ 42- bzw. A $\beta$ 40-Fraktionen. Allerdings könnte die dazu notwendige Behandlung der Gehirnproben (z.B. Homogenisierung, Zentrifugation) einen Einfluss auf die Löslichkeit einzelner A $\beta$ -Bestandteile gehabt haben. Eine partielle Umverteilung der A $\beta$ -Bestandteile innerhalb der drei Homogenate konnte somit nicht ausgeschlossen werden (33). So wurden definitionsgemäß in der TBS-Lösung nachgewiesene A $\beta$ -Elemente als wasserlöslich angesehen. Diese verkörperten parenchymale und im Zytosol vorliegende Einheiten (hauptsächlich A $\beta$ -Monomere). Die verbliebenen Pellets, bestehend aus den wasserunlöslichen und membranständigen Proteinen, wurden mit TBS-T behandelt und die im Detergenz TritonX löslichen Bestandteile (vermehrt Oligomere) extrahiert. Das übrige Sediment wurde mit einer Guanidin-HCL-Lösung behandelt, wodurch auch fibrilläre A $\beta$ -(Plaque)-Bestandteile in Lösung gebracht werden konnten (33), (107).

In den Guanidinfraktionen der Kontroll- und Amitriptylinprobanden wurden höhere Konzentrationen von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 als in den jeweiligen TBS- und TBS-T-Homogenaten gemessen. Die Studie von McDonald und Kollegen teilt diese Entdeckungen, wobei in deren Arbeit Methansäure anstelle Guanidin verwendet wurde (33). Eine Amitriptylingabe veränderte die A $\beta$ 40-Konzentration in allen drei Homogenatlösungen sowie den A $\beta$ 42-Gehalt in der TBS- und TBS-T-Lösung nicht signifikant. Allerdings war eine Korrelation zwischen Amitriptylinapplikation und einer verminderten Konzentration von A $\beta$ 42 in der Guanidinlösung nachweisbar. Auch ließ

sich hier ein minimierter Quotient aus A $\beta$ 42 und A $\beta$ 40 eruieren. Die Gabe von Amitriptylin verursachte somit eine signifikante Reduktion von Guanidin-löslichen A $\beta$ 42-Bestandteilen sowie die Verminderung des zugehörigen A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Quotienten in TgCRND8-Alzheimer-Mäusen. Bedeutsam ist somit, dass eine Amitriptylingabe die A $\beta$ 42-Last der Tiere minimiert. In diesem Sinne wäre eine Amitriptylinapplikation von erheblichem therapeutischem Nutzen.

Darüber hinaus verzeichnete man in den Plasmaproben einen signifikanten Rückgang der A $\beta$ 42-Konzentration sowie einen verminderten A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Quotienten in den ASM-geblockten Alzheimer-Tieren. Das heißt die Amitriptylingabe bewirkte eine Reduktion der A $\beta$ 42-Last im Plasma der Alzheimer-Tiere. Somit profitierten die TgCRND8-Alzheimer-Mäuse auch auf dieser Ebene von einer Amitriptylingabe.

Wodurch die obigen Effekte nach Gabe eines FIASMA zu Stande kamen ist Spekulation. Die ASM modifiziert durch die Synthese von Ceramid die Eigenschaften von Lipid Rafts (72). Denkbar wäre, dass durch die geblockte Enzymaktivität und der resultierenden verringerten Ceramidproduktion weniger funktionsfähige Lipid Rafts (bzw. Ceramidplattformen) generiert werden. Eine Konsequenz könnte der mangelnde Zusammenschluss der für die A $\beta$ -Formation notwendigen Produktionsbestandteile wie die BACE1 und die  $\gamma$ -Sekretase sein. Daher könnte die primär wahrscheinlich in Lipid Rafts lokalisierte A $\beta$ -Synthese stagnieren und die A $\beta$ -Last senken (25), (69). Allerdings existieren auch Veröffentlichungen, welche behaupten, dass ein Ausschluss von BACE1 oder  $\gamma$ -Sekretase aus Lipid Rafts die A $\beta$ -Produktion nicht beeinflusst (69).

Ursächlich für die verringerte A $\beta$ 42-Konzentration könnte neben der verminderten Produktion eine vermehrte Elimination sein. Studien rechtfertigen die Annahme, dass Knochenmark-stämmige Zellen unter bestimmten Bedingungen ins ZNS einwandern und sich zu funktionsfähigen Mikrogliazellen entwickeln (50), (56). Passend dazu präsentierte sich ein erhöhter Spiegel von CCL-2 (=MCP-1) in dieser Dissertation (Abb. 30) - ein Mediator, welcher die Rekrutierung von peripheren Monozyten ermöglicht (50). Eventuell eliminieren Zellen solcher Abstammung Amyloid-Plaques erfolgreicher als ortsansässige Konkurrenten (56). Die Reduktion der absoluten Mikrogliaanzahl muss daher nicht zwangsläufig eine verminderte Phagozytoseleistung bedeuten. Im Gegenteil könnte diese angestiegen sein und zu einer reduzierten A $\beta$ -Last geführt haben. Allerdings sollte diese Hypothese durch die differenzierte Darstellung der Mikrogliazellen und die Überprüfung der Phagozytoseleistung verifiziert werden,

zumal sie nicht die unveränderte A $\beta$ 40-Last im Gehirn und Plasma, sowie die Reduktion von A $\beta$ 42 im Plasma erklärt.

#### **5.4 Fragestellung 3: Wie wirkt sich die Gabe von Amitriptylin als Hemmstoff der ASM auf die Aktivität des Immunsystems aus, gemessen anhand der Analyse der mRNS-Transkriptionsrate von iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL-2 und IL-10 in Gehirnproben von TgCRND8-Alzheimer-Mäusen (qRT-PCR)?**

Mit der Aktivierung von Gliazellen in der Alzheimer-Erkrankung korreliert die Sekretion von multiplen inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Komplementfaktoren und reaktiven Radikalen. Vermutet wird eine starke Interferenz von inflammatorischen Mediatoren sowie der einhergehenden Entzündungsreaktionen mit der Alzheimer-Pathogenese - ob im positiven oder negativen Sinne ist nicht abschließend geklärt (31), (45). Anzunehmen ist, dass die ASM eine wesentliche Rolle in der Regulation von Entzündungsreaktionen spielt. Die Hemmung des Enzyms mit Amitriptylin sollte daher die Expression entzündlicher Komponenten modifizieren. Um diese Überlegung zu überprüfen, bediente man sich der quantitativen Echtzeit Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion. Diese stellt eine hoch sensible Methode zur Detektion und Quantifizierung von Nukleinsäuren in vitro dar, welche die Analyse der Transkriprate von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL-2, iNOS und IL-10 in TgCRND8-Alzheimer-Mäusen, mit und ohne Amitriptylinapplikation, gewährte. Gemessen wurde der Ct-Wert für obige Parameter sowie für das Housekeeping-Gen 18sRNS. Der Einsatz eines Housekeeping Genes zur Normierung ist ein etabliertes Mittel. Einen optimalen Ausgleich von Fehlern bei der Probengewinnung und Verarbeitung konnte es aber nicht bieten (111).

Bzgl. TNF- $\alpha$  konnte ein signifikanter Anstieg der mRNS- bzw. der cDNS-Rate in den hiesigen ASM-inhibierten Nagetieren dokumentiert werden. Józefowski und Kollegen registrierten nach Hemmung der ASM mit Imipramin (ebenfalls ein FIASMA (79)), unter 100ng/ml LPS-Exposition (nicht aber unter 1ng/ml LPS), einen deutlichen Produktionsanstieg von TNF- $\alpha$  in Makrophagen-ähnlichen Zellen. Die mRNS-Rate wurde allerdings nicht bestimmt. Eine Substitution von bakterieller SMase oder C8-Ceramid verringerte die TNF- $\alpha$ -Synthese nach 1ng/ml LPS- (nicht aber nach 100ng/ml

LPS-) Stimulation (86). Eine erhöhte Sekretion von TNF- $\alpha$  in ASM-defizitären Makrophagen nach LPS-Reizung schilderten auch Rozenova et al. Jedoch ließ sich keine signifikant gesteigerte mRNA-Expression registrieren. Angenommen wurde, dass die negative Regulation der TNF- $\alpha$ -Sekretion durch die ASM auf posttranslationaler Ebene stattfindet (71).

Demgegenüber demonstrierten Obuchowicz und Kollegen nach LPS-Reizung eine Verminderung der Sekretion von TNF- $\alpha$  in einer heterogenen Rattengliazellkultur unter Amitriptylinbehandlung. Dennoch verblieb die mRNA-Rate auf einem konstant hohen Level (116). Hutchinson und Mitarbeiter berichteten von einem Rückgang der TNF- $\alpha$ -mRNA-Konzentration in einer mit LPS stimulierten Rattenmikrogliazellkultur nach 100 $\mu$ M Amitriptylingabe. Dieser Rückgang war jedoch stark von der applizierten Medikamentenkonzentration abhängig (117).

Somit verlaufen die TNF- $\alpha$ -mRNA-Rate und die zugehörige Sekretion nicht zwangsläufig parallel. Die erhöhte TNF- $\alpha$ -mRNA-Konzentration unter Amitriptylinbehandlung muss daher nicht unbedingt eine erhöhte Sekretionsrate zur Folge haben. Unter dieser Prämisse wäre es für die Interpretation der Ergebnisse der hiesigen Dissertation hilfreich gewesen, die TNF- $\alpha$ -Sekretionsrate in der Amitriptylin- und der unbehandelten Gruppe zu studieren.

Ob eine verstärkte TNF- $\alpha$ -Exposition Vorteile oder Nachteile mit sich bringt, ist nicht ausreichend geklärt. Diverse Studien zeigten einen schädigenden Effekt von TNF- $\alpha$  auf menschliche Neurone aus dem Cortex. Kontrovers verhielt sich der Mediator gegenüber hippocampalen Neuronen von Ratten (45). Die Publikation von Barger und Kollegen belegte TNF- $\alpha$  neuroprotektive Eigenschaften gegenüber A $\beta$ , indem es beispielsweise der A $\beta$ -induzierten Ansammlung von reaktiven Sauerstoffradikalen entgegen wirkt (51). Ebenso kann der Mediator über p55/TNFR1 Neurone vor einer Exzitotoxizität durch übererregte NMDA-Rezeptoren schützen (52). Über TNFR1 auf Mikrogliazellen stimuliert TNF- $\alpha$  aber auch den NF $\kappa$ B Signalweg, woraufhin die Genexpression von (pro)inflammatorischen Faktoren weiter angetrieben wird. Demgegenüber verantwortet TNF- $\alpha$  über den TNFR2 auf Vorläuferzellen von Oligodendrozyten deren Differenzierung und somit die Remyelinisierung sowie regenerative Prozesse (82). Zudem werden gegensätzliche Wirkungen von TNF- $\alpha$  nach einem zentralnervösen Trauma in der akuten (eher schädigender Effekt) und der chronischen Krankheitsphase (eher regenerativer Effekt) aufgezeigt (113).

Es lässt sich festhalten, dass die paradoxe Wirkungsweise von TNF- $\alpha$  von zahlreichen Faktoren wie den untersuchten Zell- bzw. Organismusspezies oder situativen und zeitlichen Bedingungen abhängt und nur im Kontext gesehen werden kann (45), (113).

Ein weiteres potenziell kontrovers agierendes Zytokin ist das **IL-1 $\beta$**  (31). Das Ergebnis der qRT-PCR in dieser Dissertation ergab einen signifikant höheren Spiegel von IL-1 $\beta$ -mRNS (bzw. cDNS) in den ASM-defizitären Tieren als in den Kontrollmäusen. Dieser Trend lässt sich mit der Publikation von Grassmé et al. vereinbaren. ASM-defizitäre Mäuse und Epithelzellkulturen verzeichneten nach einer *Pseudomonas aeruginosa* Infektion eine signifikante Zunahme der IL-1 $\beta$ -Sekretion und eine äquivalente mRNS-Rate. Weiterhin wurde eine mangelnde Fähigkeit zur Apoptose und Bakterieninternalisierung dokumentiert. Als Ursache wurde die verminderte Bildung von ceramidreichen Plattformen durch die ASM aufgezeigt (118). Andererseits schilderte Obuchowicz neben einer verminderten TNF- $\alpha$ -Sekretion (siehe oben) eine reduzierte IL-1 $\beta$ -Freisetzung unter Amitriptylinbehandlung einer LPS stimulierten Gliazellkultur. Die IL-1 $\beta$ -mRNS-Rate blieb in der mit Amitriptylin behandelten und unbehandelten Gruppe konstant hoch (116).

Die erhöhte IL-1 $\beta$ -mRNS-Expression in der vorliegenden Dissertation ist schwierig zu bewerten. Primär werden dem Zytokin proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Diese tragen dazu bei, die entzündliche Komponente in der Alzheimer-Pathogenese zu unterhalten (26), (31). Jedoch kann IL-1 $\beta$  auch neuroprotektiv gegenüber einer Exzitotoxizität agieren (52). Darüber hinaus vermittelt es über den IL-1R1 die Synthese von neurotrophischen Stoffen wie NGF und CNTF (82). Eine Überexpression des Mediators vermag laut Shaftel und Kollegen die A $\beta$ -Last in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> Mäusen zu reduzieren. Einzuwenden ist, dass die Studie in einer frühen Phase der Plaqueausbildung durchgeführt wurde und unbekannt ist, ob dieser positive Effekt in einem weiter fortgeschrittenen Stadium der Alzheimer-Erkrankung ebenso besteht. Als Ursache der A $\beta$ -Reduktion wird spekuliert, dass IL-1 $\beta$  die mikrogliale Phagozytoseleistung steigert. V.a. durch MCP-1 angelockte Knochenmarks-abgeleitete Mikrogliazellen könnten für die A $\beta$ -Phagozytose verantwortlich sein. Im Einklang dazu identifizierten sie neben einer angestiegenen MCP-1-mRNS-Rate eine erhöhte Anzahl Iba-1 positiver Zellen pro Plaque in IL-1 $\beta$ -stimulierten Alzheimer-Mäusen (84). Die hippocampale Iba-1 positive *Gesamtzellanzahl* war in der hiesigen

Dissertation jedoch reduziert. Das Ausmaß der Assoziation mit Plaques wurde allerdings nicht bestimmt.

Das besagte **MCP-1 (auch CCL-2)** fungiert als Chemokin und steuert wahrscheinlich die Infiltration von peripheren Monozyten ins ZNS sowie die Akkumulation von Mikrogliazellen um reife A $\beta$ -Plaques. Dementsprechend lassen sich CCL-2 Ansammlungen um solche A $\beta$ -Plaques beobachten (31), (50), (60). Die Determinierung des passenden Transkripts von CCL-2 offenbarte einen signifikanten Konzentrationsanstieg in den ASM-geblockten Nagetieren im Vergleich zu den nichtbehandelten Mäusen. Dieser könnte die genannte Rekrutierung von peripheren Monozyten erlauben. Eine differenzielle Darstellung der präsenten Mikrogliazellen im ZNS und ihre Phagozytoseleistung wäre aufschlussreich.

Auffallend ist, dass der **iNOS-cDNS** im Gegensatz zu den anderen Entzündungsparametern kein signifikanter Expressionsgewinn in den mit Amitriptylin behandelten Nagern zuzuschreiben ist. Konform mit dieser Beobachtung demonstrierte auch Józefowski eine fehlende Einflussnahme einer ASM-Hemmung auf den NO-Spiegel nach LPS-Substitution (86). Ursächlich könnten verschiedene Signalwege sein, welche die Produktion von iNOS und den oben genannten Botenstoffen regulieren. So wird über den TLR4 und den MyD88-abhängigen Weg TNF- $\alpha$  gebildet, über den MyD88-unabhängigen Signalweg etwa die iNOS induziert. Postuliert wird, dass Ceramid nur im ersten Weg negativ interferiert (86).

Den „proinflammatorischen“ Botenstoffen stehen antiinflammatorische Mediatoren wie das **IL-10** gegenüber (31). Diese Dissertation zeigte, dass die Expression von IL-10 in den ASM-inhibierten Versuchstieren im Vergleich zum Kontrollkollektiv signifikant herabgesetzt war. Die Amitriptylingabe korrelierte somit neben einem Expressionsanstieg potenziell proinflammatorischer Faktoren mit der Reduktion des entzündungshemmenden Mediators IL-10. Dies lässt auf eine verstärkte Aktivität des Immunsystems unter Amitriptylinbehandlung schließen. Unklar ist, inwiefern bzw. von welchen Faktoren abhängig (Progress der Krankheit? Menge der A $\beta$ -Last?) dieses positiv oder negativ bzgl. des weiteren Krankheitsverlaufs agiert.

#### 5.5 Fragestellung 4: Wie wirkt sich die Gabe von Amitriptylin als Hemmstoff der ASM auf die Expression von neurotrophen/neuroprotektiven Stoffen aus, gemessen anhand der Analyse der mRNS-Transkriptionsrate von IGF-1, BDNF, Arc, NMDA-R1 in Gehirnproben von TgCRND8-Alzheimer-Mäusen (qRT-PCR)?

Kognitive Defizite in der Alzheimer-Erkrankung korrelieren mit synaptischen Funktionsverlusten bzw. Modifikationen. Entsprechend konnten in Alzheimer-Studien Dysregulationen von Stoffen verzeichnet werden, die eine synaptische Plastizität gewähren und/oder für neuronales Überleben zuständig sind. Beispielsweise registrierte man eine verstärkte Endozytose von NMDA-R unter A $\beta$ -Exposition oder eine reduzierte Arc-Expression in transgenen Mäusen (28), (92). Unter diesem Aspekt war es von Interesse, den Effekt des ASM-Defizits in Alzheimer-Mäusen auf die Expression von neurotrophen Substanzen hin zu messen.

Äquivalent der qRT-PCR obiger anti/inflammatorischen Parameter wurden die Transkriptionsraten der neurotrophisch wirksamen Stoffe IGF-1, BDNF, Arc und NMDA-R1 analysiert.

In der ASM-defizitären Alzheimer-Gruppe zeigte sich ein signifikanter Zuwachs der **BDNF**-mRNS-Expressionsrate. Die Studie von Hellweg et al. bekräftigt diesen Trend. Die Arbeitsgruppe berichtet von einem 13%igen Anstieg der BDNF-Serumkonzentration von depressiven Patienten nach einer 36 Tage langen Substitution von 150mg Amitriptylin (119). BDNF fördert das Überleben von Zellen und übernimmt eine wichtige Rolle in der Ausprägung von LTP und somit von kognitiven Leistungen. Reduzierte Spiegel lassen sich in frühen Stadien der Alzheimer-Erkrankung demonstrieren und stehen im Verdacht, neuronale Defizite zu bedingen. Hingegen führte eine BDNF-Substitution zu verbesserten Gedächtnisfähigkeiten (28), (37), (120). Ein erhöhter Spiegel in der hiesigen Doktorarbeit in den mit Amitriptylin behandelten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen sollte sich somit günstig auswirken.

Weiterhin sind der **NMDA-Rezeptor** und **Arc** bedeutsame Komponenten für Gedächtnis- und Lernprozesse. Eine Überaktivität des NMDA-Rezeptors kann jedoch auch zytotoxisch wirken (91), (92). Mittels der qRT-PCR ließ sich jeweils ein signifikanter Anstieg der mRNS-Transkriptionsrate der NMDA-R1-Untereinheit und Arc in den ASM-geblockten Tieren ermitteln. Auch für die durchschnittliche

Expressionsrate von **IGF-1** wurde in der ASM-gehemmten Gruppe ein Zuwachs registriert. Dieser erfüllte jedoch nicht die Signifikanzkriterien.

Demzufolge führte eine Amitriptylinbehandlung zu einem signifikanten Konzentrationsanstieg der neurotrophen Stoffe BDNF, NMDA-R1 und Arc. In dieser Hinsicht könnte die Applikation von Inhibitoren der ASM die Symptomatik der Alzheimer-Erkrankung positiv beeinflussen und somit eine solche Therapie vielversprechend sein. Weitere Studien diesbezüglich sind jedoch notwendig, nicht zuletzt um negative Effekte einer Überaktivität von NMDA-Rezeptoren auszuschließen.

## **5.6 Schlussfolgerung**

Der komplexe Prozess der Inflammation mit all seinen Mediatoren, Zellen, den interferierenden Umweltfaktoren und Gegenspielern machen eine eindeutige funktionelle Einordnung von einzelnen inflammatorischen Komponenten nahezu unmöglich. Immer müssen der Kontext und die Interaktionen aller Faktoren berücksichtigt werden. Daher ist die Registrierung der Entzündungskomponenten nur eine situative Momentaufnahme, welche eine globale Interpretation von veränderten Faktoren in den 6 Monate alten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen schwierig gestaltet. Fakt ist, dass in den ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen neben den erhöhten Entzündungsparametern ebenfalls ein teils signifikanter Rückgang der A $\beta$ -Last gemessen wurde sowie erhöhte Konzentrationen von neurotrophen/-protektiven Komponenten. Dies rechtfertigt die Annahme einer potenziell positiven Einflussnahme einer ASM-Hemmung durch Amitriptylin auf die Alzheimer-Pathologie. Unklar ist jedoch, inwiefern die erhöhten Entzündungsfaktoren und auch die verminderte Mikrogliaanzahl unter ASM-Hemmung den Krankheitsprogress vorantreiben bzw. verzögern. Aufschlussreich dürften Messungen dieser Faktoren einerseits, sowie der A $\beta$ -Last und der Transkriptionsrate der neurotrophen Stoffe andererseits in weiter fortgeschrittenen Krankheitsphasen von ASM-defizitären Alzheimer-Tieren im Vergleich zum Kontrollkollektiv sein. Somit sollten die Erkenntnisse der hiesigen Doktorarbeit in ergänzenden Forschungsarbeiten weiter untersucht werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Maurer K, Volk S, Gerbaldo H.** Auguste D and Alzheimer`s disease. *Department of medical history, The Lancet.* 1997, 349;1546-49.
2. **Alzheimer A.** Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin.* 1907, 64.
3. **Alzheimer A.** Über eigenartige Krankheitsfälle des späten Alters. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie.* 1911, 4;1;356-385,.
4. **Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung, Sütterlin S, Hoßmann I, Klingholz R.** Demenz-Report, Wie sich die Regionen in Deutschland, Österreich und der Schweiz auf die Alterung der Gesellschaft vorbereiten können. 2011, 1. Auflage;ISBN: 978-3-9812473-4-3.
5. **United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division.** World Mortality 2011 Wall Chart. *United Nations publication.* 2011, Sales No. E.11XIII.9.
6. **Statistisches Bundesamt.** Statistisches Jahrbuch. 2011, Artnr: 1010110-11700-4;ISBN:978-3-8246-0913-0.
7. **Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V., Bickel H.** Das Wichtigste 1, Die Epidemiologie der Demenz. 2008.
8. **Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information.** ICD-10-GM, F00-F03. 2012.
9. **Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin (DEGAM).** Demenz, DEGAM-Leitlinie Nr. 12. 2008, AWMF-Registernummer:053/021;ISBN-10: 3-936572-16-X;ISBN-13: 978-3-936572-16-2.
10. **Eschweiler GW, Leyhe T, Klöppel S, Hüll M.** New Developments in the Diagnosis of Dementia. *Dtsch Ärztebl Int.* 2010, 107;39;677-83.

11. **Braak H, Braak E.** Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging*. 1995, 16;3;271-284.
12. **Bancher C, Braak H, Fischer P, Jellinger KA.** Neuropathological staging of Alzheimer lesions and intellectual status in Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Neuroscience Letters*. 1993, 162;1-2;179-182.
13. **Twamley EW, Legendre Ropacki SA, Bondi MW.** Neuropsychological and neuroimaging changes in preclinical Alzheimer's disease. *J Int Neuropsychol Soc*. 2006, 12;5;707-735.
14. **Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR, Jr., Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV, Phelps CH.** Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia, The Alzheimer's Association*. 2011, Bd. 7, 280-292.
15. **McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Jr., Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH.** The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia, The Alzheimer's Association*. 2011, 7;263-269.
16. **Lee Y-J, Han SB, Nam S-Y, Oh K-W, Hong JT.** Inflammation and Alzheimer's Disease. *Arch Pharm Res*. 2010, 33;10;1539-1556.
17. **Alzheimer's Association.** 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*. 2012, 8;131-168.
18. **Selkoe DJ.** Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *American Physiological Society, Physiol Rev*. 2001, 81;2;741-766.

19. **Haass C, Selkoe DJ.** Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007, 8;101-112.
20. **Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, St. George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, Hulette C, Crain B, Goldgaber D, Roses AD.** Association of apolipoprotein E allele  $\epsilon$ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. 1993, 43;1467-1472.
21. **Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT.** Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: Allelic variation and receptor interactions. *Neuron*. 1993, 11;4;575-580.
22. **Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD.** Apolipoprotein E: High-avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993, 90;5;1977-1981.
23. **Launer LJ, Andersen K, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Amaducci LA, Brayne C, Copeland JRM, Dartigues J-F, Kragh-Sorensen P, Lobo A, Martinez-Lage JM, Stijnen T, Hofman A, EURODEM Incidence Research Group and Work Groups.** Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: Results from EURODEM pooled analyses. *Neurology*. 1999, aktualisiert 2007, 52;78-84.
24. **Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA.** Diabetes Mellitus and Risk of Alzheimer Disease and Decline in Cognitive Function. *Arch Neurol*. 2004, 61;661-666.
25. **Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K.** Amyloidogenic processing of the Alzheimer  $\beta$ -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *The Journal of Cell Biology*. 2003, 160:1;113-123.
26. **Saijo K, Glass CK.** Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2011, 11;775-787.

27. **Sisodia SS, St George-Hyslop PH.** gamma-Secretase, notch, A $\beta$  and alzheimer`s disease: Where do the presenilins fit in? *Nature Reviews Neuroscience*. 2002, 3;281-290.
28. **Querfurth HW, LaFerla FM.** Mechanisms of Disease, Alzheimer`s Disease. *N Engl J Med*. 2010, 362;329-344.
29. **Hardy J, Selkoe DJ.** The Amyloid Hypothesis of Alzheimer`s Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science`s Compass*. 2002, 297;353.
30. **Müller-Hill B, Beyreuther K.** Molecular Biology of Alzheimer`s Disease. *Annu Rev Biochem*. 1989, 58;287-307.
31. **Heneka MT, O`Banion MK, Terwel D, Kummer MP.** Neuroinflammatory processes in Alzheimer`s disease. *J Neural Transm*. 2010, 117;919-947.
32. **Walsh DM, Selkoe DJ.** A $\beta$  Oligomers- a decade of discovery. *J. Neurochem*. 2007, 101;1172-1184.
33. **Mc Donald JM, Savva GM, Brayne C, Welzel AT, Forster G, Shankar GM, Selkoe DJ, Ince PG, Walsh DM on behalf of the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study.** The presence of sodium dodecyl sulphate-stable A $\beta$  dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. *Brain*. 2010, 133;1328-1341.
34. **Mc Lean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL.** Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer`s disease. *Ann Neurol*. 1999, 46;6;860-6.
35. **Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, Selkoe DJ.** Amyloid  $\beta$ -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*. 1992, 359;322-325.
36. **Wang HY, Lee DHS, D`Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB.**  $\beta$ -Amyloid1-42 Binds to alpha7 Nicotinic Acetylcholine Rezeptor with High Affinity,

- Implications for Alzheimer's Disease Pathology. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000, 275;8;5626-5632.
37. **Garzon DJ, Fahnstock M.** Oligomeric Amyloid Decreases Basal Levels of Brain-Derived Neurotrophic factor (BDNF) mRNA via Specific Downregulation of BDNF Transcripts IV and V in Differentiated Human Neuroblastoma Cells. *The Journal of Neuroscience*. 2007, 27;10;2628-2635.
38. **Braak E, Braak H, Mandelkow EM.** A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol*. 1994, 87: 554-567.
39. **Braak H, Braak E.** Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991, 82;4;239-59.
40. **Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ.** Soluble amyloid  $\beta$ -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011, 108;14;5819-24.
41. **Götz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM.** Formation of Neurofibrillary Tangles in P301L Tau Transgenic Mice Induced by A $\beta$ 42 Fibrils. *Science*. 2001, 293;5534;1491-1495.
42. **Lee M-S, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsal L-H.** Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*. 2000, 405;360-364.
43. **Shipton OA, Leitz JR, Dworzak J, Acton CEJ, Tunbridge EM, Denk F, Dawson HN, Vitek MP, Wade-Martins R, Paulsen O, Vargas-Caballero M.** Tau Protein Is Required for Amyloid  $\beta$ -induced Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation. *The Journal of Neuroscience*. 2011, 31;5;1688-1692.
44. **Wyss-Coray T.** Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nature Medicine*. 2006, 12;9;1005-1015.
45. **Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WST,**

- Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L-F, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T.** Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 2000, 21;383-421.
46. **McGeer PL, McGeer EG.** Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. *Journal of NeuroVirology*. 2002, 8;529-538.
47. **McGeer PL, Akiyama H, Itagaki S, McGeer EG.** Immune system response in Alzheimer's disease. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*. 1989, 16;4;516-527.
48. **Hickman SE, Allison EK, El Khoury J.** Microglial Dysfunction and Defective  $\beta$ -Amyloid Clearance Pathways in Aging Alzheimer's Disease Mice. *The Journal of Neuroscience*. 2008, 28;33;8354-8360.
49. **Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien J-P, Rivest S.** Bone Marrow-Derived Microglia Play a Critical Role in Restricting Senile Plaque Formation in Alzheimer's Disease. *Neuron*. 2006, 49;4;489-502.
50. **Simard AR, Rivest S.** Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *The FASEB Journal*. 2004, 18;998-1000.
51. **Barger SW, Hörster D, Furukawa K, Goodman Y, Kriegstein J, Mattson MP.** Tumor necrosis factors  $\alpha$  and  $\beta$  protect neurons against amyloid  $\beta$ -peptide toxicity: Evidence for involvement of a  $\kappa$ B-binding factor and attenuation of peroxide and  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995, 92;9328-9332.
52. **Carlson NG, Wieggl WA, Chen J, Bacchi A, Rogers SW, Gahring LC.** Inflammatory Cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  Impart Neuroprotection to an Excitotoxin Through Distinct Pathways. *J Immunol*. 1999, 163;3963-3968.
53. **Blasko I, Marx F, Steiner E, Hartmann T, Grubeck-Loebenstien B.** TNF $\alpha$  plus TNF $\gamma$  induce the production of Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptides and decrease the secretion of APPs. *The FASEB Journal*. 1999, 13;63-68.

54. **Sastre M, Dewachter I, Landreth GE, Willson TM, Klockgether T, Van Leuven F, Heneka MT.** Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Agonists Modulate Immunostimulated Processing of Amyloid Precursor Protein through Regulation of  $\beta$ - Secretase. *J. Neurosci.* 2003, 23;30;9796-9804.
55. **Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, Van Leuven F.** Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP (V7171) transgenic mice. *Journal of Neuroinflammation.* 2005, 2;22;1-12.
56. **Davoust N, Vuillat C, Androdias G, Nataf S.** From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol.* 2008, 29;5;227-234.
57. **Cameron B, Landreth GE.** Inflammation, microglia, and alzheimer`s disease. *Neurobiology of Disease.* 2010, 37,503-509.
58. **Eikelenboom P, van Exel E, Hoozemans JJM, Veerhuis R, Rozemuller AJM, van Gool WA.** Neuroinflammation - An Early Event in Both the History and Pathogenesis of Alzheimer`s Disease. *Neurodegenerative Dis.* 2010, 7;38-41.
59. **Walter S, Letiembre M, Liu Y, Heine H, Penke B, Hao W, Bode B, Manietta N, Walter J, Schulz-Schäffer W, Faßbender K.** Role of the Toll-Like Receptor 4 in Neuroinflammation in Alzheimer`s Disease. *Cell Physiol Biochem.* 2007, 20;947-956.
60. **Wyss-Coray T, Rogers J.** Inflammation in Alzheimer Disease-A Brief Review of the Basic Science and Clinical Literature. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2011, 1-23.
61. **Liu S, Liu Y, Hao W, Wolf L, Kiliaan AJ, Penke B, Rube CE, Walter J, Heneka MT, Hartmann T, Menger MD, Fassbender K.** TLR2 is a Primary Receptor for Alzheimer`s Amyloid  $\beta$  Peptide To Trigger Neuroinflammatory Activation. *J Immunol.* 2012, 188;3;1098-1107.
62. **Colton CA.** Heterogeneity of Microglial Activation in the Innate Immune Response in the Brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009, 4;399-418.

63. **Salminen A, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T.** Inflammation in Alzheimer's disease: Amyloid- $\beta$  oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors. *Progress in Neurobiology*. 2009, 87;3;181-194.
64. **Triantafilou M, Morath S, Mackie A, Hartung T, Triantafilou K.** Lateral diffusion of Toll-like receptors reveals that they are transiently confined within lipid rafts on the plasma membrane. *Journal of Cell Science*. 2004, 117;17;4007-4014.
65. **Pike LJ.** Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research*. 2006, 47;1597-1598.
66. **Jin S, Yi F, Zhang F, Poklis JL, Li P-L.** Lysosomal Targeting and Trafficking of Acid Sphingomyelinase to Lipid Raft Platforms in Coronary Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008, 28;11;2056-2062.
67. **Riddell DR, Christie G, Hussain I, Dingwall C.** Compartmentalization of  $\beta$ -secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Current Biology*. 2001, 11;16;1288-1293.
68. **Kornhuber J, Tripal P, Reichel M, Mühle C, Rhein C, Muehlbacher M, Groemer TW, Gulbins E.** Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMA): A Novel Pharmacological Group of Drugs with Broad Clinical Applications. *Cell Physiol Biochem*. 2010, 26;09-20.
69. **Haughey NJ, Bandaru VVR, Bae M, Mattson MP.** Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010, 1801;878-886.
70. **He X, Huang Y, Li B, Gong C-X, Schuchman EH.** Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 2010, 31;398-408.
71. **Rozenova KA, Deevska GM, Karakashian AA, Nikolova-Karakashian MN.** Studies on the Role of Acid Sphingomyelinase and Ceramide in the Regulation of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-converting Enzyme Activity and TNF $\alpha$  Secretion in Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010, 285;27;21103-21113.

72. **Bollinger CR, Teichgräber V, Gulbins E.** Ceramide-enriched membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005, 1746;3; 284-294.
73. **Kornhuber J, Muehlbacher M, Trapp S, Pechmann S, Friedl A, Reichel M, Mühle C, Terfloth L, Groemer TW, Spitzer GM, Liedl KR, Gulbins E, Tripal P.** Identification of Novel Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase. *PLoS ONE*. 2011, 6;8;e23852.
74. **Gulbins E, Li PL.** Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006, 290;R11-R26.
75. **van Blitterswijk WJ, van der Luit AH, Veldman RJ, Verheij M, Borst J.** Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem J*. 2003, 369;199-211.
76. **Arboleda G, Morales LC, Benítez B, Arboleda H.** Regulation of ceramide-induced neuronal death: Cell metabolism meets neurodegeneration. *Brain Research Reviews*. 2009, 59;333-346.
77. **Malaplate-Armand C, Florent-Bécharde S, Youssef I, Koziel V, Sponne I, Kriem B, Leininger-Muller B, Olivier J-L, Oster T, Pillot T.** Soluble oligomers of amyloid- $\beta$  peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. *Neurobiology of Disease*. 2006, 23;1;178-189.
78. **Xuan NT, Shumilina E, Kempe DS, Gulbins E, Lang F.** Sphingomyelinase dependent apoptosis of dendritic cells following treatment with amyloid peptides. *Journal of Neuroimmunology*. 2010, 219;81-89.
79. **Kornhuber J, Tripal P, Reichel M, Terfloth L, Bleich S, Wiltfang J, Gulbins E.** Identification of New Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase Using a Structure-Property-Activity Relation Model. *J. Med. Chem.* 2008, 51;2;219-237.
80. **Kornhuber J, Medlin A, Bleich S, Jendrossek V, Henkel AW, Wiltfang J, Gulbins E.** High activity of acid sphingomyelinase in major depression. *J Neural Transm*. 2005, 112;1583-1590.

81. **Benkert O, Hippus H, Fehr C, Gründer G, Heiser P, Hiemke C, Himmerich H, Lange-Asschenfeldt C, Müller MJ, Paulzen M, Regen F, Steiger A.** Kompendium der Psychiatrischen Pharmakotherapie. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York*. 2011, 8;ISBN-13 978-3-642-13043-4.
82. **Nguyen MD, Julien J-P, Rivest S.** Innate Immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci*. 2002, 3;216-227.
83. **Lucas S-M, Rothwell NJ, Gibson RM.** The role of inflammation in CNS injury and disease. *British Journal of Pharmacology*. 2006, 147;1;232-240.
84. **Shaftel SS, Kyrkanides S, Olschowka JA, Miller JH, Johnson RE, O'Banion MK.** Sustained hippocampal IL-1 $\beta$  overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007, 117;6;1595-1604.
85. **Yu ZF, Nikolova-Karakashian M, Zhou D, Cheng G, Schuchman EH, Mattson MP.** Pivotal Role for Acidic Sphingomyelinase in Cerebral Ischemia-Induced Ceramide and Cytokine Production, and Neuronal Apoptosis. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2000, 15;85-97.
86. **Józefowski S, Czerkies M, Lukasik A, Bielawska A, Bielawski J, Kwiatkowska K, Sobota A.** Ceramide and Ceramide 1-Phosphate Are Negative Regulators of TNF- $\alpha$  Production Induced by Lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2010, 185;6960-6973.
87. **Wang Q, Rowan MJ, Anwyl R.**  $\beta$ -Amyloid-Mediated Inhibition of NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation Induction Involves Activation of Microglia and Stimulation of Inducible Nitric Oxide Synthase and Superoxide. *The Journal of Neuroscience*. 2004, 24;27;6049-6056.
88. **Grütz G.** New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *Journal of Leukocyte Biology*. 2005, 77;3-15.
89. **Szczepanik AM, Funes S, Petko W, Ringheim GE.** IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A $\beta$ (1-42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. *Journal of Neuroimmunology*. 2001, 113;49-62.

90. **Gasparini L, Xu H.** Potential roles of insulin and IGF-1 in Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*. 2003, 26;8;404-406.
91. **Hardingham GE, Bading H.** The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *TRENDS in Neurosciences*. 2003, 26;2;81-89.
92. **Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, Panja D, Schubert M, Soule J, Tiron A, Wibrand K.** The Arc of synaptic memory. *Exp Brain Res*. 2010, 200;2;125-140.
93. **Arenz C.** Small Molecule Inhibitors of Acid Sphingomyelinase. *Cell Physiol Biochem*. 2010, 26;01-08.
94. **Imai Y, Iyata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S.** A Novel Gene *iba1* in the Major Histocompatibility Complex Class III Region Encoding an EF Hand Protein Expressed in a Monocytic Lineage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996, 224;3;855-862.
95. **Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S.** Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, *Iba1*. *Molecular Brain Research*. 1998, 57, 1-9.
96. **Akiyama H, Mori H, Saido T, Kondo H, Ikeda K, McGeer PL.** Occurrence of the Diffuse Amyloid  $\beta$ -Protein ( $A\beta$ ) Deposits With Numerous  $A\beta$ -Containing Glial Cells in the Cerebral Cortex of Patients With Alzheimer's Disease. *Glia*. 1999, 25;324-331.
97. **Akiyama H, Schwab C, Kondo H, Mori H, Kametani F, Ikeda K, McGeer PL.** Granules in glial cells of patients with Alzheimer's disease are immunopositive for C-terminal sequences of  $\beta$ -amyloid protein. *Neuroscience Letters*. 1996, 206;169-172.
98. **Matsunaga Y, Saito N, Fujii A, Yokotani J, Takakura T, Nishimura T, Esaki H, Yamada T.** A pH-dependent conformational transition of  $A\beta$  peptide and physicochemical properties of the conformers in the glial cell. *Biochem. J.* 2002, 361;547-556.
99. **TA, Springer.** Monoclonal Antibody Analysis of Complex Biological Systems. *The Journal of Biological Chemistry*. 1981, 256;8;3833-3839.

100. **Ho M-K, Springer TA.** Tissue Distribution, Structural Characterization, and Biosynthesis of Mac-3, a Macrophage Surface Glycoprotein Exhibiting Molecular Weight Heterogeneity. *The Journal of Biological Chemistry.* 1983, 258;1;636-642.
101. **Chishti MA, Yang D-S, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, Strome R, Zuker N, Loukides J, French J, Turner S, Lozza G, Grilli M, Kunicki S, Morissette C, Paquette J, Gervais F, Bergeron C, Fraser PE, Carlson GA, St. George-Hyslop P, Westaway D.** Early-onset Amyloid Deposition and Cognitive Deficits in Transgenic Mice Expressing a Double Mutant Form of Amyloid Precursor Protein 695. *The Journal of Biological Chemistry.* 2001, 276;24;21562-21570.
102. **Lang G.** Histotechnik, Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. *SpringerWienNewYork.* 2006, ISBN-13:978-3-211-33141-5.
103. **Kumar GL, Rudbeck L, Boenisch T, Taylor CR, Farmilo AJ, Stead RH, Happel JF, Saxena R, Badve S, Key M, Robinson JP, Sturgis J, Winther H, Jensen SS, Müller S, Matthiesen SH, Nielsen KV, Hendriksen U, Schönau A, Christensen NK, Wendelboe HG, Feldballe Rasmussen O, Winther L, Osborn D, Zucker RM, Bisgaard K, Pace GE, Schmid J, Verardo M, Spaulding DC, Atwood KN.** Education Guide, Immunohistochemical Staining Methods. *Dako North America.* 2009, 5;08002.
104. **Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR.** Antigen Retrieval Techniques: Current Perspectives. *J Histochem Cytochem.* 2001, 49;8;931-937.
105. **Aescht E, Büchl-Zimmermann S, Burmester A, Dänhardt-Pfeiffer S, Desel C, Hamers C, Jach G, Kässens M, Makovitzky J, Mulisch M, Nixdorf-Bergweiler B, Pütz D, Riedelsheimer B, van den Boom F, Wegerhoff R, Welsch U.** Romeis Mikroskopische Technik. *Spektrum Akademischer Verlag.* 2010, 18;ISBN 978-3-8274-1676-6.
106. **Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH, Key M, Welcher R, Harvey R, Atwood KN.** Handbook Immunochemical Staining Methods. *DAKO Corporation.* 2001, 3;1-68.
107. **Liu S.** Toll-Like Receptor 2 and Partner Receptors in Alzheimer`s Disease. *Universität des Saarlandes.* 2011, Naturwissenschaftliche Doktorarbeit.

108. **Bradford MM.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry.* 1976, 72;248-254.
109. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 1987, 162;156-159.
110. **Applied Biosystems GmbH, Schild TA .** 7700 SDS Workshop, Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie. 2.1.
111. **Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH.** Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2005, 5;2;209-219.
112. **Perry VH, Gordon S.** Macrophages and microglia in the nervous system. *TINS.* 1988, 11;6;273-277.
113. **Scherbel U, Raghupathi R, Nakamura M, Saatman KE, Trojanowski JQ, Neugebauer E, Marino MW, McIntosh TK.** Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999, 96;8721-8726.
114. **Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J.** Inflammatory Response in the Hippocampus of PS1M146L/APP751SL Mouse Model of Alzheimer` Disease: Age-Dependent Switch in the Microglia Phenotype from Alternative to Classic. *The Journal of Neuroscience.* 2008, 28;45;11650-11661.
115. **Papaioannou N, Tooten PCJ, Van Ederen AM, Bohl JRE, Rofina J, Tsangaris T, Gruys E.** Immunohistochemical investigation of the brain of aged dogs. I. Detection of neurofibrillary tangles and of 4-hydroxynonenal protein, an oxidative damage product, in senile plaques. *Amyloid: J. Protein Folding Disord.* 2001, 8;11-21.
116. **Obuchowicz E, Kowalski J, Labuzek K, Krysiak R, Pendzich J, Herman ZS.** Amitriptyline and nortriptyline inhibit interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  release by rat mixed glial and microglial cell cultures. *International Journal of Neuropsychopharmacology.* 2006, 9;27-35.

117. **Hutchinson MR, Loram LC, Zhang Y, Shridhar M, Rezvani N, Berkelhammer D, Phipps S, Foster PS, Landgraf K, Falke JJ, Rice KC, Maier SF, Yin H, Watkins LR.** Evidence that tricyclic small molecules may possess toll-like receptor and myeloid differentiation protein 2 activity. *Neuroscience*. 2010, 168;551-563.
118. **Grassmé H, Jendrossek V, Riehle A, von Kürthy G, Berger J, Schwarz H, Weller M, Kolesnick R, Gulbins E.** Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nature Medicine*. 2003, 9;3;322-330.
119. **Hellweg R, Ziegenhorn A, Heuser I, Deuschle M.** Serum concentrations of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in depressed patients before and after antidepressant treatment. *Pharmacopsychiatry*. 2008, 41;2;66-71.
120. **Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH.** Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2009, 15;3;331-337.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Der typische Verlauf der Alzheimer-Erkrankung.....	16
Abb. 2 Nachweis von A $\beta$ -Ansammlungen (braun) in einem immunhistochemisch präparierten Gehirnschnitt einer TgCRND8-Alzheimer-Maus .....	18
Abb. 3 Sekretase-abhängige Prozessierung des APP .....	19
Abb. 4 Schematische Darstellung der Wirkungsweise von funktionellen Hemmstoffen der ASM.....	27
Abb. 5 Ceramid/Sphingosin-1-Phosphat-Verhältnis .....	28
Abb. 6 Schematische Demonstration der Wirkungsweise der TaqMan-Sonde.....	56
Abb. 7 Hippocampusregion einer ASM-ungehemmten TgCRND8-Maus (10x).....	59
Abb. 8 Hippocampusregion einer ASM-gehemmten TgCRND8-Maus (10x).....	59
Abb. 9 Hippocampusregion einer ASM-ungehemmten TgCRND8-Maus (20x).....	60
Abb. 10 Hippocampusregion einer ASM-gehemmten TgCRND8-Maus (20x).....	60
Abb. 11 Hippocampusregion einer TgCRND8-Maus (10x).....	61
Abb. 12 Hippocampusregion einer TgCRND8-Maus (10x).....	62
Abb. 13 Hippocampusregion einer ASM-ungehemmten TgCRND8-Maus (10x).....	63
Abb. 14 Hippocampusregion einer ASM-gehemmten TgCRND8-Maus (10x).....	63
Abb. 15 Hippocampusregion einer ASM-ungehemmten TgCRND8-Maus (20x).....	64
Abb. 16 Hippocampusregion einer ASM-gehemmten TgCRND8-Maus (20x).....	64
Abb. 17 Hippocampusregion einer TgCRND8-Maus (10x).....	65
Abb. 18 Hippocampusregion einer TgCRND8-Maus (10x).....	66
Abb. 19 Hippocampusregion einer ASM-ungehemmten TgCRND8-Maus (10x).....	67
Abb. 20 Hippocampusregion einer ASM-gehemmten TgCRND8-Maus (10x).....	67
Abb. 21 Hippocampusregion einer ASM-ungehemmten TgCRND8-Maus (20x).....	68
Abb. 22 Hippocampusregion einer ASM-gehemmten TgCRND8-Maus (20x).....	68
Abb. 23 Hippocampusregion einer TgCRND8-Maus (10x).....	69
Abb. 24 Hippocampusregion einer Wildtyp-Maus (10x).....	70
Abb. 25 Hippocampusregion einer TgCRND8-Maus (10x).....	70
Abb. 26 Vergleich der Spiegel von A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 und dem A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Verhältnis in TBS-Gehirnhomogenaten von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen u. von ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Tieren .....	72

---

Abb. 27 Vergleich der Spiegel von A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 und dem A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Verhältnis in TBS-T-Gehirnhomogenaten von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen und von ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Tieren .....	72
Abb. 28 Vergleich der Spiegel von A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 und dem A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Verhältnis in Guanidin-Gehirnhomogenaten von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen und von ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Tieren .....	73
Abb. 29 Vergleich der Spiegel von A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 und dem A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Verhältnis im Blutplasma von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen und von ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Tieren .....	74
Abb. 30 Vergleich der Transkriptexpression von iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL-2 und IL-10 in Gehirnproben von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen und von ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Tieren .....	76
Abb. 31 Vergleich der Transkriptexpression von IGF-1, BDNF, Arc und NMDA-R1 in Gehirnproben von ASM-gehemmten TgCRND8-Alzheimer-Mäusen und von ASM-ungehemmten TgCRND8-Alzheimer-Tieren .....	77

## 8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Geräte .....	33
Tab. 2: Hilfsmittel.....	33
Tab. 3: Substanzen.....	35
Tab. 4: Lösungen .....	37
Tab. 5: Kits .....	38
Tab. 6: Antikörper.....	38

## 9 Danksagung

Vielmals bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Faßbender für die interessante Aufgabenstellung und die Möglichkeit diese Forschungsarbeit überhaupt zu realisieren.

Herrn Dr. Yang Liu möchte ich besonders für seine kompetente wissenschaftliche Beratung und Unterstützung danken.

Herzlich danke ich Frau Dr. Wenlin Hao für ihre jahrelange Betreuung, ihre fachkundigen Ratschläge und Hilfestellungen sowie für die kollegiale Zusammenarbeit.

Ein Dank richtet sich auch an die gesamte neurologische Arbeitsgruppe (AG Faßbender), insbesondere an Laura Schnöder.

Im Besonderen danke ich meinem Freund Wolfgang Weich für die konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen und sein außerordentliches Verständnis.

Herrn Reiner Portscheller und Frau Ute Fissabre danke ich für die ausgezeichneten Korrekturvorschläge bzgl. der Manuskriptgestaltung.

Herzlich bedanke ich mich auch bei meinen Eltern für ihre ununterbrochene Unterstützung in allen Lebenslagen und für die Möglichkeit überhaupt erst zu Studieren.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Eva Portscheller  
Anschrift: Buchenweg 15  
66265 Holz  
Telefon: 015123270109  
E-Mail: eva.portscheller@web.de  
Geburtsdatum: 23.September 1987  
Geburtsort: Paderborn  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schulbildung:

1994-1998: Erich-Kästner Grundschule in Holz  
1998-2007: Illtal-Gymnasium-Illingen  
Juni 2007: Allgemeine Hochschulreife

### Beruflicher Werdegang:

Seit 2007: Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes in Homburg  
07.09.2009: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
27.08.2012-28.07.2013: Praktisches Jahr im Caritas Klinikum Saarbrücken St.Theresia  
12.11.2013: Erfolgreicher Abschluss des Medizinstudiums