

Aus dem Bereich der Neurologie
Klinische Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Die Rollen der sauren Sphingomyelinase und des Tenascin C in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes**

2013

vorgelegt von

Kan Xie

geb. am: 22.03.1982, in Zhejiang, VR China

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	5
Teil I: Defizienz der sauren Sphingomyelinase mildert die Aβ-Pathologie in der Alzheimer-Krankheit	8
1 Einleitung.....	9
1.1 Alzheimer-Krankheit.....	9
1.1.1 Geschichte, Epidemiologie und Klinik.....	9
1.1.2 Genetische Risikofaktoren.....	11
1.1.3 Amyloid β : eine Frage der Balance.....	12
1.1.4 Neuroinflammation: ein zweischneidiges Schwert.....	18
1.2 Sphingomyelinasen.....	23
1.2.1 Klassifikation der Sphingolipide.....	23
1.2.2 Klassifikation der Sphingomyelinasen.....	24
1.2.3 Saure Sphingomyelinase.....	25
1.2.4 Rolle der sauren Sphingomyelinase in pathologischen Vorgängen.....	26
1.3 Lipidmetabolismus und Alzheimer-Krankheit.....	28
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	30
2 Material und Methoden.....	32
2.1 Material.....	32
2.1.1 Geräte.....	32
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	34
2.1.3 Chemikalien.....	35
2.1.4 Kits.....	37
2.1.5 Enzyme.....	37
2.1.6 Plasmide.....	37
2.1.7 Oligonukleotide.....	38
2.1.8 Antikörper.....	39
2.1.9 Pufferlösungen.....	40
2.1.10 Bakterielle Kulturmedien und Selektionsantibiotika.....	41
2.1.11 Bakterien.....	42
2.1.12 Zelllinien.....	42
2.1.13 Mäuse.....	42
2.2 Methoden.....	43
2.2.1 Kultivierung von Zelllinien.....	43
2.2.2 Herstellung von Zelllysaten.....	43
2.2.3 Konstruktion von Vektoren.....	44
2.2.4 Etablierung von Zelllinien durch stabile Transfektion.....	49
2.2.5 Isolation von Lysosomen.....	50
2.2.6 Isolation der Membranfraktion.....	52
2.2.7 β - und γ -Sekretasen Aktivität Assays.....	53
2.2.8 Isolation der <i>lipid rafts</i>	54
2.2.9 Bio-Rad Protein Assay.....	56
2.2.10 SDS-Page.....	56
2.2.11 <i>Western blot</i>	57
2.2.12 Analyse des Ceramid-Gehalts.....	59
2.2.13 Analyse des Sphingomyelingehalts.....	59

2.2.14	Real-Time-quantitative-PCR.....	60
2.2.15	<i>Barnes maze</i> und <i>morris water maze</i>	62
2.2.16	Präparation von Maushirngeweben.....	63
2.2.17	Maushirnhomogenat.....	64
2.2.18	A β -Detektion mit pre-coated ELISA Kits.....	65
2.2.19	Kultivierung muriner BMDMs.....	65
2.2.20	A β -Präparation	66
2.2.21	A β -Stimulation.....	66
2.2.22	Detektion inflammatorischer Mediatoren mit ELISA Kits	67
2.2.23	Untersuchung der MAPK-Aktivierung	68
2.2.24	Analyse der A β -Phagozytose	68
2.2.25	Statistik.....	69
3	Ergebnisse	70
3.1	Die Rolle der ASM bei der Generation von Amyloid β	70
3.1.1	ASM, APP und γ -Sekretase kolokalisieren in Endosomen und Lysosomen....	70
3.1.2	Etablierung von <i>asm knock down</i> und <i>app695 tg/asm knock down</i> SH-SY5Y	71
3.1.3	<i>Knock down</i> von <i>asm</i> verringert die Bildung von A β	72
3.1.4	<i>Asm</i> -Defizienz schwächt die Aktivität der γ -Sekretase.....	74
3.1.5	Analyse der Sekretasekomponenten.....	76
3.1.6	<i>Asm knock down</i> und Proteintransport	76
3.1.7	Aktivität der γ -Sekretase ist unabhängig vom Ceramidgehalt	78
3.1.8	<i>Asm knock down</i> führt zur Akkumulation von Sphingomyelin.....	80
3.1.9	Veränderungen an den <i>lipid rafts</i> in <i>asm</i> -defizienten Mäusen.....	81
3.1.10	<i>Asm</i> -Defizienz erhöht Resistenz der γ -Sekretase gegen Detergens	82
3.2	Die Rolle der ASM bei der Inflammation und Phagozytose.....	84
3.2.1	Etablierung von <i>asm knock down</i> THP-1	84
3.2.2	<i>Asm knock out</i> verstärkt die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine	85
3.2.3	Inflammation und Aktivierung der MAP-Kinase-Wege.....	87
3.2.4	Verschiebung des A β -Rezeptors CD14 innerhalb der <i>lipid rafts</i>	87
3.2.5	<i>Asm</i> -defiziente Makrophagen phagozytieren vermehrt A β	89
3.3	Auswirkungen der <i>asm</i> -Defizienz in Alzheimer-Mausmodellen.....	90
3.3.1	Verpaarungen Alzheimer-Mausmodell und <i>asm ko</i> Mäusen.....	90
3.3.2	<i>Asm</i> -Defizienz reduziert cerebrale A β -Ablagerungen	91
3.3.3	Verhaltensanalyse mit <i>barnes maze</i> und <i>morris water maze</i>	93
3.3.4	Untersuchung der synaptischen Markerproteine.....	95
3.3.5	<i>Asm</i> -Defizienz und Inflammation in Alzheimer-Mausmodellen	96
3.4	Behandlung der Alzheimer-Krankheit mit Amitriptylin.....	98
3.4.1	Behandlung mit Amitriptylin reduziert A β 42-Ablagerungen	98
3.4.2	Amitriptylin unterdrückt die Aktivitäten von β - und γ -Sekretasen.....	98
4	Diskussion	100
4.1	Diskussion von Material und Methoden	100
4.1.1	Auswahl der zellulären Systeme SH-SY5Y und THP1	100
4.1.2	Auswahl der AD-Mausmodelle TgCRND8 und APP/PS1-21	101
4.2	Diskussion der Ergebnisse	102
4.2.1	<i>Asm</i> -Defizienz senkt die A β -Produktion durch Inhibition der γ -Sekretase ...	102
4.2.2	Die Rolle der ASM als Inhibitor der inflammatorischen Aktivierung.....	107
4.2.3	<i>Asm knock out</i> verstärkt die A β -Phagozytose <i>in vitro</i>	109
4.2.4	<i>Asm</i> -Defizienz verringert die A β -Ablagerung in AD-Mausmodellen	110
4.2.5	Verabreichen von Amitriptylin reduziert die Ablagerung von A β 42	112

Teil II: Defizienz von Tenascin C mildert Alzheimer-ähnliche Pathologien in einem Mausmodell.....	113
1 Einleitung	114
1.1 Nomenklatur der Tenascins.....	114
1.2 Struktur der Tenascins.....	114
1.3 Tenascin-C	116
1.4 Tenascin-R, -W (bzw. -N) und -X.....	118
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	119
2 Material und Methoden	121
2.1 Material	121
2.1.1 Geräte	121
2.1.2 Verbrauchsmaterial	121
2.1.3 Chemikalien	121
2.1.4 Oligonukleotide.....	122
2.1.5 Antikörper	122
2.1.6 Kits	123
2.1.7 Mäuse	123
2.2 Methoden.....	123
2.2.1 Kultivierung muriner Mikroglia.....	123
2.2.2 Stimulation muriner Mikroglia mit A β	124
2.2.3 Durchführung der Real-Time-quantitative-PCR mit TaqMan [®] Probe.....	124
2.2.4 Immunhistochemie	125
3 Ergebnisse	128
3.1 Das Alzheimer-Mausmodell TgCRND8 und Inflammation	128
3.2 Expression der Tenascin-Genfamilie in Wildtyp und TgCRND8 Mäuse.....	129
3.3 Aggregiertes A β 242 verstärkt <i>tnc</i> -Expression in Mikroglia	129
3.4 Keine <i>tnc</i> -Überexpression in human <i>app695</i> transfizierten SH-SY5Y	130
3.5 <i>Tnc</i> -Defizienz verschiebt die Inflammation vom M1- zum M2-Profil	131
3.6 Expression der Toll-like Rezeptoren.....	133
3.7 <i>Tnc</i> -Defizienz verstärkt mikrogliale Rekrutierung zum Hippocampus	134
3.8 Reduktion der A β -Ablagerungen im Mausgehirn nach <i>tnc knock out</i>	135
3.9 Analyse der β - und γ -Sekretasenkomponenten	137
3.10 <i>Tnc</i> -Defizienz führt zur Hemmung der β - und γ -Sekretasen	139
3.11 TNC hat keinen Einfluss auf A β -Phagozytose, -Abbau oder -Transport	140
3.12 <i>Tnc knock out</i> verringert den Verlust synaptischer Markerproteine im Alzheimer-Mausmodell.....	142
4 Diskussion	143
4.1 Die Rolle des TNC in der Neuroinflammation	143
4.2 Auswirkung der <i>tnc</i> -Defizienz auf A β -Ablagerungen im Gehirn.....	145
4.3 <i>Tnc knock out</i> und Neuroprotektion	147
Teil III: LPS reguliert neuronale Ca²⁺-Reaktion über den TLR4/TRIF-Signalweg	150
1 Einleitung	151
1.1 Toll-like Rezeptoren.....	151
1.2 Signalkaskaden der Toll-like Rezeptoren	152
1.2.1 Der MyD88-abhängige Signalweg.....	153
1.2.2 Der MyD88-unabhängige Signalweg.....	154
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	155
2 Material und Methoden	157
2.1 Material	157
2.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterial.....	157

2.1.2	Chemikalien	157
2.1.3	Antikörper	157
2.1.4	Mäuse	157
2.2	Methoden.....	158
2.2.1	Kultivierung muriner DRG-Neuronen	158
2.2.2	Calcium-Imaging.....	159
2.2.3	Spezifische Bereinigung der Mikroglia/Makrophagen	160
3	Ergebnisse	162
3.1	LPS inhibiert Ca ²⁺ -Signale in DRG-Neuronen (M. Letiembre).....	162
3.2	LPS-induzierte Ca ²⁺ -Inhibition ist TLR4 und TRIF abhängig (M. Letiembre).....	165
3.3	DRG-Neuronen mit defektem TLR4 in Cokultur mit Wildtyp-Zellen	167
3.4	Mikroglia/Makrophagen steuern neuronale Ca ²⁺ -Signalübertragung	169
3.4.1	Spezifische Bereinigung der Mikroglia/Makrophagen in DRG-Kulturen	169
3.4.2	Mikroglia/Makrophagen regulieren LPS-induzierte Ca ²⁺ -Inhibition in DRG-Neuronen	170
4	Diskussion	172
	Literaturverzeichnis.....	174
	Abkürzungsverzeichnis.....	197
	Abbildungsverzeichnis und Kooperationsverzeichnis	202
	Danksagung.....	205
	Curriculum vitae	207

Zusammenfassung

Die Alzheimer-Krankheit (*Alzheimer's disease*, AD) ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, die vor allem durch extrazelluläre Ablagerungen bestehend aus Amyloid β ($A\beta$) Peptiden, intrazelluläre neurofibrilläre Bündeln, Verlust von Neuronen und chronische Inflammation charakterisiert wird. In der gegenwärtig weitestgehend akzeptierte Amyloid-Hypothese, welche 1992 von John Hardy und Gerald Higgins erstmals formuliert wurde, gilt die Akkumulation von $A\beta$ und dessen Aggregaten aufgrund folgender Ursachen als molekulare Basis dieser Erkrankung: (1) $A\beta$ ist im Gehirn von AD-Patienten stark angereichert, (2) $A\beta$ -Plaques sind zumeist in Hirnregionen verteilt, die mit Erinnerung, Kalkulation und Lernen im Zusammenhang stehen, (3) Mutationen des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) führt zu familiär vererbaren Varianten von AD und (4) $A\beta$ ist ein potenter Aktivator der Neuroinflammation im Gehirn. $A\beta$ -Peptide, deren Länge von 36-43 Aminosäuren reichen, entstehen durch sequentielle Spaltungen des Vorläuferproteins APP in Abhängigkeit der β - und γ -Sekretasen. Dadurch stellt die Modulation der Aktivität dieser beiden Enzymen eine intensiv untersuchte Strategie zur Etablierung neuer therapeutischer Ansätze dar, um die AD-Pathogenese zu verlangsamen oder vorzubeugen.

Die saure Sphingomyelinase (*acid sphingomyelinase*, ASM), ein gut charakterisiertes Enzym des endo-/lysosomalen Systems, hydrolysiert Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin. Die Aktivität von ASM ist in AD-Patienten erheblich erhöht und korreliert mit der $A\beta$ -Ablagerung (Cutler et al., 2004; He et al., 2010). Das primäre Ziel des ersten Projektes dieser Arbeit bestand darin, zu prüfen, ob eine Deletion der ASM die $A\beta$ -Generation beeinflusst. Ferner sollen die zugrundeliegenden Mechanismen aufgeklärt werden. In einem zellulären Modellsystem wurde zunächst bestätigt, dass ASM in den gleichen zellulären Kompartimenten wie APP und γ -Sekretase lokalisiert ist. ASM-Defizienz verminderte die Produktion der prädominanten $A\beta$ -Spezies, $A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$, indem die Aktivität der γ -Sekretase supprimiert wurde. Die Expression der γ -Sekretasekomponenten blieb unverändert. Ferner war die Inhibition der γ -Sekretase weder durch alternativen Proteintransport noch durch Verringerung des zellulären Ceramidgehalts begründet. Stattdessen wurden die biophysikalischen Charakteristika der *lipid rafts* durch Akkumulation des Sphingomyelins dahin gehend moduliert, dass möglicherweise dadurch der partielle Aktivitätsverlust der γ -Sekretase entsteht. Denn die ASM-Defizienz führt zu einer

Verminderung der Dichte in den *lipid rafts*, welche mit einer ähnlichen Verlagerung der γ -Sekretasekomponenten Presenilin 1 und Nicastrin assoziiert war. Begleitend dazu resultierte die ASM-Defizienz in eine erhöhte Resistenz gegenüber Solubilisierung durch Detergens. Dieses Ergebnis liefert einen wichtigen Hinweis darauf, dass die Membranfluidität durch Akkumulation des Sphingomyelins verändert wurde.

Dadurch dass ASM als Inhibitor der LPS-induzierten TNF- α Sekretion charakterisiert wurde (Rozenova et al., 2010), bestand das sekundäre Ziel darin, herauszufinden, inwiefern eine ASM-Defizienz sich auf die Generation weiterer Zytokine auswirkt. In *asm*^{-/-} Makrophagen war die Sekretion von TNF- α und CCL-2 signifikant verstärkt, wodurch ausgeschlossen werden konnte, dass ASM die Produktion des TNF- α spezifisch reguliert. Dieses Phänomen kann möglicherweise durch die modifizierte Aktivierung in den MAPK-Signalwegen erklärt werden. Denn nach LPS-Stimulation wurden p38 und JNK in *asm*^{-/-} Makrophagen merklich stärker phosphoryliert. In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass *asm*-defiziente Makrophagen mehr A β 42 phagozytierten, ohne Degradationsdefekte aufzuweisen. Diese Beobachtung war wahrscheinlich durch die veränderte Membranstruktur begründet, weil der *raft*-assoziierte A β -Rezeptor CD14 sich innerhalb der *lipid rafts* verschob.

Die Effekte der ASM-Defizienz bezüglich der AD-Pathologie *in vivo* wurden in zwei AD-Mausmodellen, TgCRND8 und APP/PS1-21, evaluiert. In beiden Mausmodellen wurde die Ablagerung von A β 40 und A β 42 bereits nach Deletion eines *asm*-Allels signifikant verringert. Eine Verbesserung der kognitiven Defizite in TgCRND8 *app tg/asm*^{+/-} Mäusen wurde im *barnes maze* Test festgestellt. Die Neuroinflammation blieb in *app tg/asm*^{+/-} Mäusen unverändert. Dieses gesamte Erscheinungsbild wäre für künftige therapeutische Interventionen von Vorteil, da eine totale Unterdrückung der ASM-Aktivität möglicherweise Niemann-Pick-Krankheit-ähnliche Symptome im menschlichen Organismus hervorrufen würde.

Tenascin C (TNC) ist ein Protein der extrazellulären Matrix, das als ein endogener Ligand des Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) identifiziert wurde (Midwood et al., 2009). Die Expression von TNC kann sowohl durch pro- als auch antiinflammatorische Zytokine induziert werden (Chevalier et al., 1996; Chiquet-Ehrismann und Chiquet, 2003). Aufgrund dessen, dass AD durch chronische Inflammation begleitet wird, ist die Bestimmung der exakten Rolle des TNC in der AD-Pathogenese das Hauptanliegen des zweiten Projektes. Zunächst wurde gezeigt, dass die TNC-Expression im Hirngewebe von *app tg* Mäusen verstärkt vorlag. Interessanterweise wurde in primären Mikroglia festgestellt, dass die TNC-Transkription in

Abhängigkeit der Zeit durch A β eingeleitet werden konnte, ohne die transkriptionelle Aktivität der anderen Tenascingene zu beeinträchtigen. In der SH-SY5Y Neuroblastoma Zelllinie hingegen wurde kein vergleichbarer Effekt nach Überexpression des humanen APP695-Proteins beobachtet, sodass die A β -induzierte TNC-Expression in Mikroglia zelltypspezifisch erschien. Im nächsten Schritt wurde die Rolle des TNC im AD-Mausmodell untersucht, indem *tnc*^{-/-} und TgCRND8 Mäuse miteinander gekreuzt wurden. TNC *knock out* verschob das inflammatorische Profil von pro- zur antiinflammatorisch, obwohl die Anzahl der Mikroglia im Hippocampus leicht zunahm. Zusätzlich wurde die cerebrale A β -Ablagerung in TNC-defizienten Tieren signifikant vermindert, indem die Aktivitäten der β - und γ -Sekretasen inhibiert wurde. Darüber hinaus wurde der Verlust der synaptischen Markerproteine wie PSD95 und Synaptophysin in *app tg/tnc*^{-/-} Mäusen eingeschränkt.

Zusammenfassend demonstrierte diese Studie, dass eine TNC-Defizienz die cerebrale A β -Ablagerung reduziert, die proinflammatorische Aktivierung im Gehirn senkt und den Verlust der synaptischen Markerproteine verlangsamt. Diese Resultate kennzeichnen TNC als ein potentiell neues therapeutisches Ziel für die Behandlung von AD.

Inflammatorische Effektorzellen wie Mikroglia oder Makrophagen exprimieren TLRs, um eindringende Mikroorganismen zu detektieren. Sich mehrende Hinweise deuten darauf hin, dass Neuronen in den Spinalganglien ebenfalls TLRs tragen (Ochoa-Cortes et al., 2010; Qi et al., 2011). Das LPS, eine Komponente der äußeren Membran aus gram-negativen Bakterien, ist der primäre Ligand des Rezeptors der angeborenen Immunität TLR4 (Poltorak et al., 1998). In vorherigen Arbeiten wurde LPS als Modulator von Ionenkanälen, beispielsweise Calcium- oder Kaliumkanäle, suggeriert. Die genauen Mechanismen sind jedoch unklar. Im Rahmen des dritten Projektes soll der akute Effekt einer LPS-Applikation auf die neuronale Ca²⁺-Signalübertragung mittels Neuronen aus Mausspinalganglien (*dorsal root ganglions*, DRG) als Modellsystem analysiert werden. LPS führte zu einer schnellen Inhibition der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, welche spezifisch in depolarisierten Neuronen auftrat. Die Intensität der Inhibition, jedoch nicht die Kinetik, korrelierte mit der verwendeten LPS-Konzentration. Es konnte aufgeklärt werden, dass die LPS-induzierte Ca²⁺-Inhibition unabhängig von CD14 und dem intrazellulären Adapterprotein MyD88 ablief. Stattdessen wurde ausschließlich der TLR4-abhängige MyD88-unabhängige/TRIF-abhängige Signalweg verwendet.

Um die zugrundeliegenden Mechanismen genauer zu durchleuchten, wurden TLR4-defiziente Neuronen mit TLR4-Wildtyp DRG-Neuronen gemeinsam kultiviert. Überraschenderweise

konnte in dieser Konstellation die LPS-induzierte Ca^{2+} -Reaktion in TLR4-defizienten Neuronen teilweise wiederhergestellt werden. Somit stand fest, dass die neuronale Ca^{2+} -Inhibition durch andere Zelltypen reguliert wurde. In weiteren Experimenten wurde die Präsenz von Mikroglia/Makrophagen in DRG-Kulturen nachgewiesen. Mäuse, die den Diphtherietoxinrezeptor (DTR) unter der Kontrolle des CD11b-Promotors exprimieren, ermöglichten eine spezifische Bereinigung der Mikroglia/Makrophagen in DRG-Kulturen. Nach Behandlung mit Diphtherietoxin wurde die Anzahl der Mikroglia/Makrophagen auf ein Minimum reduziert, ohne die Neuronen zu beeinträchtigen. Depletion der Mikroglia/Makrophagen resultierte in eine signifikante Schwächung der LPS-induzierten Ca^{2+} -Inhibition. Somit wird der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel über die Aktivierung des mikroglialen TLR4/TRIF-Signalweges reguliert, wodurch ein kooperativer Verteidigungsmechanismus gegen eindringende Pathogene beschrieben wird.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease mainly characterized by extracellular plaques comprised of Amyloid β ($A\beta$) peptides, intracellular neurofibrillary tangles, neuronal loss and chronic inflammation. Currently in the widely accepted amyloid hypothesis, firstly proposed by John Hardy and Gerald Higgins in 1992, accumulation of $A\beta$ and its aggregates are considered to be the primary molecular origin causing AD due to various reasons: (1) $A\beta$ strongly accumulates in the brain of AD patients, (2) $A\beta$ plaques are mostly distributed in brain regions relating to memory, calculation and learning, (3) mutations of amyloid precursor protein (APP) leads to familial inherited variants of AD and (4) $A\beta$ is a potent stimulator of neuroinflammation in the brain. $A\beta$ peptides, 36-43 amino acids in length, are generated by sequential enzymatic cleavage from its precursor APP by β - and γ -secretases. Thus, modulation of β - and γ -secretase activities becomes one popular strategy to develop new therapeutic approaches in order to delay and to prevent AD pathogenesis.

Acid sphingomyelinase (ASM), a well characterized enzyme located in endosomes and lysosomes, hydrolyses sphingomyelin to ceramide and phosphorylcholine. In AD patients, ASM activity is remarkably elevated and correlates with $A\beta$ deposition (Cutler et al., 2004; He et al., 2010). The primary aim of the first project was to clarify if deletion of ASM affects $A\beta$ generation and to investigate the underlying mechanisms. In a cellular model, ASM has been confirmed to be intracellularly distributed in the same compartments as APP and γ -secretase. Deficiency of ASM significantly decreased production of the predominant $A\beta$ species, $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$, through inhibiting γ -secretase activity without altering expression of its components. Reduction of γ -secretase activity was neither linked to protein transport nor to cellular ceramide content. Instead, accumulation of sphingomyelin modulated the biophysical characteristics of lipid rafts leading to a partial shift of the γ -secretase components presenilin 1 and nicastrin. Concomitantly, ASM deficiency increased membrane resistance against detergent solubilisation indicating changes in membrane fluidity.

Since ASM has been characterized as an inhibitor of LPS induced TNF- α secretion (Rozenova et al., 2010), the secondary aim of this particular project was to elucidate whether ASM deficiency interferes with the production of additional cytokines and to illuminate the underlying mechanisms. In *asm*^{-/-} macrophages, secretion of TNF- α as well as CCL-2 was notably enhanced excluding that ASM specifically affects TNF- α generation. This phenomenon might be explained by the altered activation of MAPK signalling pathways,

because phosphorylation of p38 and JNK was considerably up-regulated in *asm*^{-/-} macrophages after LPS stimulation. In further experiments, *asm*-deficient macrophages have been shown to phagocytose more A β 42 without exhibiting degradation defects. This observation may be due to modified membrane structure since the raft associated A β receptor CD14 is shifted within the lipid rafts.

The *in vivo* effects of ASM deficiency on AD pathology have been evaluated in two AD mouse models, namely TgCRND8 and APP/PS1-21. In both models, removal of one *asm* allele sufficiently reduced deposition of A β 40 and A β 42 in the brain. Improvement of cognitive decline was detected in TgCRND8 *app tg/asm*^{+/-} mice as tested in barnes maze. Neuroinflammation remained unchanged in *app tg/asm*^{+/-} mice. This overall phenotype is preferable for future therapeutic invention, because complete inhibition of ASM would probably provoke Niemann-Pick disease like symptoms in human.

Tenascin C (TNC) is an extracellular matrix protein which has been identified to be an endogenous ligand of toll-like receptor 4 (TLR4) (Midwood et al., 2009). The expression of TNC can be induced by both pro- and anti-inflammatory cytokines (Chevalier et al., 1996; Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003). Since AD is associated with chronic inflammation, determining the detailed role of TNC in AD pathogenesis became the main goal of the second project of this thesis. First of all, TNC expression is specifically elevated in brain tissue of *app tg* mice. Interestingly, A β challenge induced TNC transcription in a time dependent manner without altering other tenascin genes in primary mouse microglia. In contrast, over-expression of human APP695 in SH-SY5Y neuroblastoma cell line didn't influence TNC transcription indicating that the A β induced effect in microglia could be cell type specific. Next, the role of TNC was analyzed in AD mouse model by cross-breeding *tnc*^{-/-} and TgCRND8 mice. TNC *knock out* shifted the brain inflammation profile from pro- to anti-inflammatory though number of microglia in the hippocampus was slightly increased. Concomitantly, TNC deficiency significantly minimized cerebral A β load through inhibition of both β - and γ -secretase activities. Furthermore, loss of synaptic marker proteins such as PSD95 and synaptophysin was attenuated in *app tg/tnc*^{-/-} mice.

In summary, this study demonstrated that deficiency of TNC reduced cerebral A β load, decreased pro-inflammatory activation in the brain and slowed loss of synaptic marker proteins. Hence, these results characterized TNC as a potentially new therapeutic target for AD treatment.

In order to sense invading microorganisms, inflammatory effector cells such as microglia or macrophages express TLRs. Recently, increased evidence suggested that dorsal root ganglion neurons carry TLRs, too (Ochoa-Cortes et al., 2010; Qi et al., 2011). LPS, membrane component of gram-negative bacteria, is the primary ligand of the innate immune receptor TLR4 (Poltorak et al., 1998). Previously, LPS has been considered as a modulator of ion channels such as calcium or potassium channels, but the exact mechanisms remained obscure. Using neurons derived from mouse dorsal root ganglions (DRG), the acute effect of LPS application on neuronal Ca^{2+} signalling has been evaluated in the third project of this thesis. LPS induced a rapid inhibition of intracellular Ca^{2+} level specifically in depolarised neurons. The intensity of inhibition but not the kinetic correlated with LPS concentration. It has been clarified that LPS induced inhibition of neuronal Ca^{2+} occurred independent of CD14 and the intracellular adapter protein MyD88. Instead, the TLR4-dependent MyD88-independent/TRIF-dependent pathway was used exclusively.

To investigate the underlying mechanisms, TLR4-deficient neurons were co-cultured with TLR4-wild-type DRG neurons. Surprisingly, the abolished response of TLR4-deficient neurons upon LPS could be partially recovered indicating that the neuronal Ca^{2+} response was regulated by other cell types. In further studies, the presence of microglia/macrophage in DRG cultures has been confirmed. Mice over-expressing diphtheria toxin receptor (DTR) under the control of CD11b promoter allowed specific ablation of microglia/macrophage in DRG cultures. After diphtheria toxin treatment, numbers of microglia/macrophage were radically reduced to a minimum without altering the neurons. Depletion of microglia/macrophage led to a significant decrease of LPS induced Ca^{2+} inhibition. Therefore, activation of microglial TLR4/TRIF pathway regulates the intracellular Ca^{2+} in the neighbouring DRG neurons describing a co-operative defensive mechanism against invading pathogens.

**Teil I: Defizienz der sauren Sphingomyelinase
mildert die A β -Pathologie in der Alzheimer-
Krankheit**

1 Einleitung

1.1 Alzheimer-Krankheit

1.1.1 Geschichte, Epidemiologie und Klinik

Am 4. November 1906 hielt der deutsche Psychiater und Neuropathologe Alois Alzheimer (1864-1915) seinen Vortrag über „Eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ auf der 37. Konferenz der süddeutschen Psychiater (damals „Irrenärzte“) in Tübingen, der einen Meilenstein in der Forschung von Demenzkrankheiten darstellte. Dr. Alzheimer berichtete über einen neuartigen Krankheitsfall am Beispiel der Patientin Auguste Deter, die an zunehmender Gedächtnisschwäche, eingeschränkter Kognition und Halluzinationen litt (Alzheimer, 1907). Viereinhalb Jahre nach Eintreten dieser Symptome erlag die Patientin im Alter von 55 Jahren an den Folgen dieses Leidens. In den *post mortem* Untersuchungen konnte Alzheimer neben der gleichmäßigen Atrophie des Gehirns anhand von Bielschowskyschen Silberfärbung auch Einlagerungen Plaque-artiger Gebilden, Ansammlungen neuronaler Fibrillen und weitreichender Verlust an Neuronen feststellen (Alzheimer, 1907; Alzheimer, 1911). Diese Befunde sind auch heute tragende Säulen der histopathologischen Diagnostik dieser Erkrankung, die Emil Kraepelin 1910 erstmals als „Alzheimer-Krankheit“ (*Alzheimer's disease*, AD) definierte (Kraepelin, 1910).

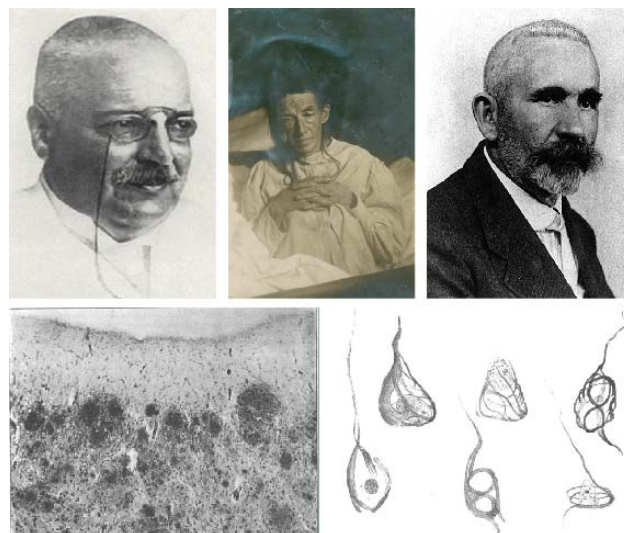


Abbildung 1: Historie der Alzheimer-Krankheit

Oben von links nach rechts: Portrait von Alois Alzheimer, Auguste Deter und Emil Kraepelin. (Die Abbildungen stammen von *Alzheimer Disease International*, *International Kraepelin Society* und der *Frankfurter Allgemeine Zeitung*). Unten: Abbildungen aus der Originalschrift „Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters“ von Alois Alzheimer, 1911.

In der gegenwärtigen Gesellschaft ist AD die häufigste Form der Demenz (50-56%) und führt zwischen 3 bis 9 Jahren nach der sicheren Diagnose zum Tod, wobei die mediane Überlebenszeit von männlichen und weiblichen Patienten sich kaum unterscheiden (Xie et al., 2008; Querfurth und LaFerla, 2010). Aktuell leiden schätzungsweise mehr als 35 Mio. Menschen weltweit an dieser Erkrankung, davon ca. 1,2 Mio. in Deutschland (Querfurth und LaFerla, 2010; Alzheimer Forschung Initiative e.V.). Der grundlegende Risikofaktor ist das Alter (Ferri et al., 2005). Die Inzidenz verdoppelt sich nach dem 65. Lebensjahr in 5-Jahresrhythmus und liegt bei 1275/100000 Personen, die älter als 65 sind (Hirtz et al., 2007). Außerdem wird bei AD grundsätzlich zwischen zwei Gruppen differenziert: *early* und *late onset*. Zumeist betrifft AD Menschen über 65, sodass die *late onset* Gruppe ungefähr 95% alle Fälle einnimmt. Die restlichen 5%, die *early onset* Gruppe, sind vorwiegend familiär vererbt (Zhang et al., 2012).

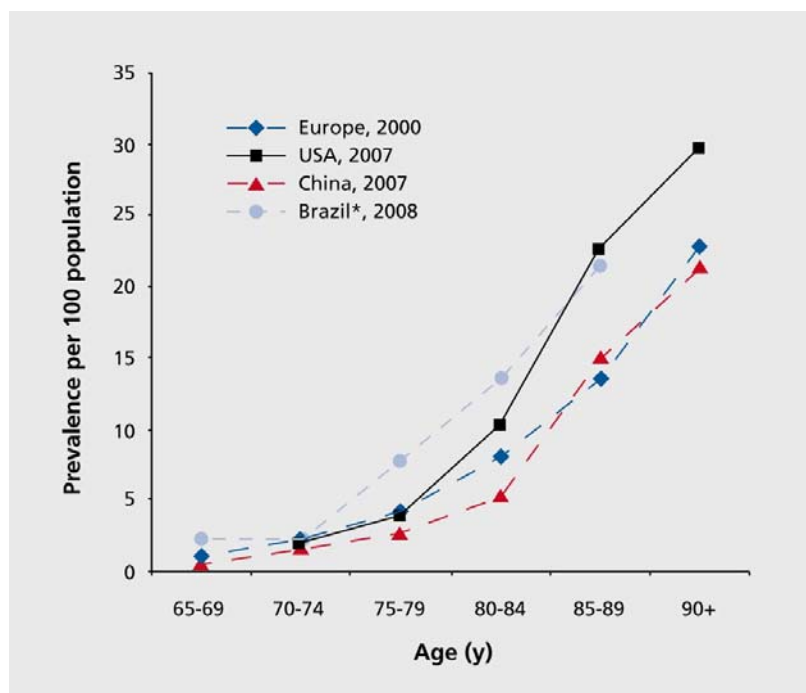


Abbildung 2: Altersabhängige Prävalenz der Alzheimer-Krankheit in unterschiedlichen Regionen

* Prävalenz aller Demenzformen. (Abbildung stammt aus Qiu et al., *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 2009)

Nach mehr als einem Jahrhundert intensiver Forschung gilt AD weiterhin als eine progressive neurodegenerative Erkrankung, die nicht effektiv behandelt werden kann (Cummings, 2004). Charakteristisch für AD-Patienten sind Einschnitte des Erinnerungsvermögens, Schwierigkeiten zur korrekten Artikulation sowie Verlust der räumlichen und zeitlichen Orientierung (Cummings und Cole, 2002). Zusätzlich wird der Krankheitsverlauf durch

Stimmungsschwankungen, Apathie, Angstzustände und Depressionen begleitet, wodurch der Patient sich zunehmend vom sozialen Alltag zurückzieht (Mega et al., 1996; Mirakhur et al., 2004). Je nach Grad der Schwere wird das klinische Erscheinungsbild der AD-Patienten in 3 Phasen eingeteilt: präklinisch, leichte kognitive Störung (*mild cognitive impairment*, MCI) und Demenz (Albert et al., 2011). Als präklinisch wird das Stadium bezeichnet, in welchem messbare Veränderungen der Biomarker auftreten, bevor klinische Symptome wie Gedächtnisverlust, Beeinträchtigung der Kognition und Verhaltensauffälligkeiten einsetzen. In der Phase der MCI sind Defizite des Denk- und Erinnerungsvermögens klar feststellbar, haben jedoch nur geringe Auswirkungen auf das Alltagsleben. Patienten im Endstadium hingegen verlieren die Fähigkeit, tägliche Bedürfnisse wie Essen oder Hygiene selbstständig aufrechtzuerhalten, sodass sie pflegebedürftig werden. Die häusliche Pflege übernehmen in den meisten Fällen Familienangehörige. Diese werden häufig neben zeitlichem und körperlichem Aufwand durch möglichen Verdienstausschlag enorm belastet. Die Kosten zur Behandlung und Pflege von AD-Patienten liegen im Vergleich zur gleichen Altersgruppe ohne Demenz um ein Vielfaches höher (Alzheimer's association, Chicago, IL, USA). Somit erlangt die Entwicklung wirksamer Strategien zur Vorbeugung und Behandlung dieser Alterskrankheit in der stetig alternden Gesellschaft eine zentrale Bedeutung.

1.1.2 Genetische Risikofaktoren

AD-Patienten, die vor dem 65. Lebensjahr dement werden, gehören zur *early onset* Gruppe. Während die Ursachen der *late onset* Formen sich vielfältig gestalten, liegt bei jedem zweiten *early onset* Fall eine genetische Prädisposition vor. Die meisten *early onset* Varianten sind entweder mit einer Erhöhung der totalen Amyloid β ($A\beta$)-Menge oder des $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Verhältnisses verbunden (Cai et al., 1993; Borchelt et al., 1996), die wiederum auf Mutationen der Gene *app*, *psen1* und *psen2* zurückgeführt werden (Mayeux und Schupf, 2012).

Das *app*-Gen ist auf dem Chromosom 21 lokalisiert (Robakis et al., 1987). Eine Vielzahl der heute bekannten menschlichen Mutationen des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) wurde Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts beschrieben: die Dutch-Mutation E693Q (Levy et al., 1990), die Indiana-Mutation V717F (Murrell et al., 1991), die London-Mutation V717I (Goate et al., 1991), V717G (Chartier-Harlin et al., 1991) sowie die schwedische Doppelmutation KM670/671NL (Mullan et al., 1992). Physiologische Auswirkungen dieser Mutationen sind äußerst unterschiedlich (Hall und Roberson, 2012). Die Dutch-Mutation begünstigt die Fibrillenbildung und verleiht zusätzlich eine Resistenz gegen Abbau. Die

schwedische Doppelmutation verstärkt die Aktivität der β -Sekretase, wodurch mehr A β 40 und A β 42 generiert werden. Mutationen an der Position 717 hingegen regulieren die Aktivität der γ -Sekretase hoch, wobei mehr A β 42 als A β 40 gebildet werden. Die vermehrte Bildung von A β 42 resultiert in eine beschleunigte Aggregation und Bildung unlöslicher Fibrillen (Suzuki et al., 1994). Eine Übersicht aller bislang entdeckten Mutationen kann im Internet unter „www.alzforum.org/res/com/mut/app/table1.asp“ aufgerufen werden. Interessanterweise wurde neuerdings eine weitere Mutation A673T beschrieben, die den Träger vor AD sowie kognitive Defizite im Alter schützt (Jonsson et al., 2012).

Mutationen von *psen1* und *psen2* kommen, verglichen mit Mutationen des *app*, deutlich häufiger vor (Blennow et al., 2006). Sie steigern die A β -Produktion und erhöhen das A β 42/A β 40-Verhältnis (Scheuner et al., 1996; Oyama et al., 1998; Sudoh et al., 1998). Phänotypisch wirken Mutationen des *psen1*-Gens wesentlich schwerer aus als jene von *psen2* (Bertram und Tanzi, 2004). Beispielweise gilt die L166P-Mutation des *psen1* als die aggressivste AD-Mutationsform und leitet die Erkrankung bereits ab einem Alter von 24 Jahren ein (Moehlmann et al., 2002).

1.1.3 Amyloid β : eine Frage der Balance

Charakteristisch für AD sind extrazelluläre Plaques bestehend aus A β -Peptiden und intrazelluläre neurofibrilläre Bündeln (auch „Tangles“ genannt), die sich aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein zusammensetzen (Mattson, 2004; Blennow et al., 2006). Weitere begleitende Merkmale schließen Neurodegeneration, Inflammation und oxidative Schäden mit ein (Querfurth und LaFerla, 2010). Aus mehreren Gründen gilt in der gegenwärtigen Forschung die Akkumulation fehlgefalteter A β -Peptide als Ausgangspunkt dieser Krankheit: (1) A β -Ablagerungen sind in AD-Patienten stark angereichert, (2) A β -Plaques befinden sich hauptsächlich in Regionen, die mit Erinnerung, Kalkulation und Entscheidung im Zusammenhang stehen und (3) Mutationen des APP verursachen familiär vererbte Varianten von AD (Selkoe, 2003). Diese inzwischen weitestgehend akzeptierte Sichtweise wird als „Amyloid-Hypothese“ bezeichnet und wurde vor zwanzig Jahren erstmalig formuliert (Hardy und Higgins, 1992). Im Wesentlichen beschreibt sie wie ein Ungleichgewicht zwischen Generation und Abbau die Akkumulation und Aggregation des A β auslöst (Hardy und Selkoe, 2002). Denn A β -Peptide können sich spontan zu Oligomeren und Fibrillen zusammenlagern, indem sie von einer α -helikalen in eine β -Faltblatt ähnliche Struktur wechseln (Walsh und Selkoe, 2007). Vor allem lösliche A β -Intermediate führen

oxidative und inflammatorische Schäden, synaptische Fehlfunktionen und letztlich den Untergang der Neuronen herbei.

1.1.3.1 Entstehung des Amyloid β

Nachdem multimere A β -Aggregate als Hauptbestandteile der senilen Plaques feststanden (Master et al., 1985), wurde der Generationsmechanismus des A β aus seinem Vorläuferprotein APP detailliert aufgeklärt. Das APP, ein Protein der Zelloberfläche, ist ubiquitär exprimiert und wird als Typ I Membranprotein mit langer N-terminal extrazellulärer Domäne und kurzer C-terminal intrazellulärer Domäne eingestuft (Kang et al., 1987; Koo et al., 1994; Rajendran et al., 2006). Aus den 18 Exons des *app*-Gens entstehen bedingt durch alternative Splicevorgänge überwiegend drei APP-Isoformen: APP770, APP751 und APP695 (Tanaka et al., 1989). In einem gesunden menschlichen Gehirn beträgt das Verhältnis dieser Isoformen APP695:APP751:APP770 20:10:1. Dabei sind APP770 und APP751 als Hauptformen in nichtneuronalen Geweben vorzufinden, APP695 jedoch wird hauptsächlich von Neuronen exprimiert (Rajendran und Annaert, 2012). Nach der Synthese im endoplasmatischen Retikulum (ER) wird das APP mittels Golgi-Apparat entlang des sekretorischen Pathways zur Zelloberfläche transportiert. Posttranslationale Modifikationen erfolgen bei der Transition durch das Golgi, während proteolytische Prozessierungen später an der Zelloberfläche oder in Endosomen/Lysosomen stattfinden (Koo et al., 1994). Die physiologische Rolle des APP bleibt bislang ungeklärt.

Die Abbildung 3 verdeutlicht, dass die proteolytische Prozessierung des APP auf zwei unterschiedlichen Wegen durchgeführt werden (Zheng und Koo, 2006; Zhang et al., 2012). Auf dem „nicht-amyloidogenen“ Weg wird APP zunächst durch die α -Sekretase vor der 17. Aminosäure (AS) im Bereich der A β -Sequenz geschnitten, wodurch das N-terminale sAPP α und das C-terminale C83 entstehen. Das C83 wird fortführend durch die γ -Sekretase geschnitten, sodass p3 und *APP intracellular domain* (AICD) generiert werden, die aber schnell abgebaut werden. sAPP α gilt als neuroprotektiv, indem das Wachstum von Neuriten und die Synaptogenese gefördert werden (Mattson et al., 1993). Außerdem wurde in Tiermodellen gezeigt, dass sAPP α das Lern- und Erinnerungsvermögen stärkt (Maziane et al., 1998). Die genaue Rolle von p3 ist unbekannt. AICD kann in den Zellkern translozieren und als transkriptioneller Regulator fungieren (Cao und Sudhof, 2001).

Auf dem „amyloidogenen“ Weg wird APP zunächst durch die β -Sekretase vor der A β -Sequenz geschnitten. Als Produkte entstehen sAPP β und C99. Ein Metabolit des sAPP β

bindet an Death Rezeptor 6, wodurch Caspase 6 aktiviert wird und neuronales Sterben verursacht (Nikolaev et al., 2009). Das C99 seinerseits wird durch die γ -Sekretase zu einem A β -Peptid mit einer Länge von 36-43 AS sowie AICD geschnitten. Mit welchem Mechanismus das A β kurz nach seiner Generation aus der Zelle sezerniert wird, ist Gegenstand derzeitiger Forschung (Moghekar et al., 2011). A β 40 und A β 42 bilden die prädominanten Isoformen, wobei A β 40-Monomere weitaus zahlreicher sind. Hingegen tendiert A β 42 stärker zur Aggregation und ist toxischer (McGowan et al., 2005). Neben der Zelltoxizität sind auch physiologische Funktionen des A β bekannt. Denn A β begünstigt die Endozytose der *N-methyl-D-aspartate* (NMDA)- und *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA)-Rezeptoren (Snyder et al., 2005; Hsieh et al., 2006). Diese Beobachtungen liefern eine mögliche Erklärung, weshalb physiologische A β -Konzentrationen exzitatorische Übertragungen dämpfen und eine neuronale Hyperaktivität verhindern können (Kamenetz et al., 2003).

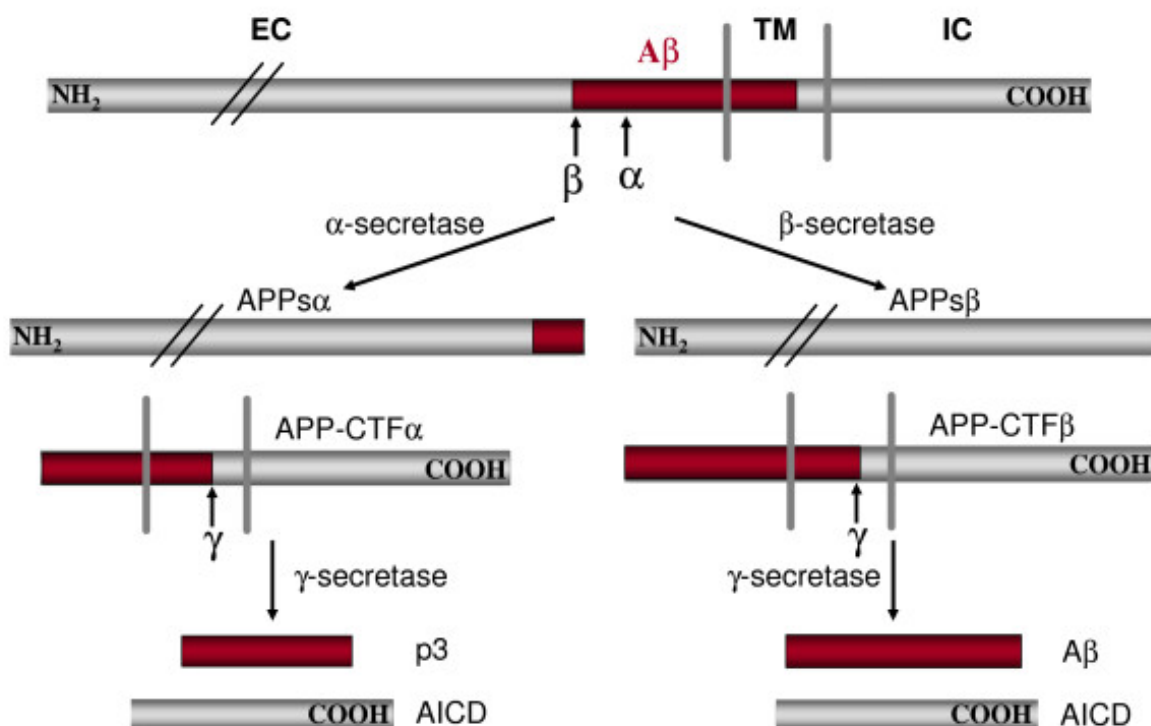


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP)

EC = extrazellulär, TM = transmembran, IC = intrazellulär. APP = Amyloid-Vorläuferprotein, CTF = C-terminales Fragment, AICD = *APP intracellular domain*. Die Sequenz des Amyloid β (A β) ist in rot hervorgehoben. (Abbildung stammt aus Zheng und Koo, *Molecular Neurodegeneration*, 2006)

1.1.3.2 Sekretasen

Bei der Prozessierung des APP sind α -, β - und γ -Sekretasen die zentralen Akteure, sodass die Modulation ihrer enzymatischen Aktivitäten eine beliebte Strategie zur Findung von neuen Therapeutika darstellt. Die α -Sekretase ist überwiegend an der Plasmamembran aktiv, zu einem geringen Teil auch im trans Golgi-Netzwerk (Lichtenthaler, 2011). Als potentielle α -Sekretasen wurden membranständige Zinkproteasen der *A desintegrin and metalloproteases* (ADAM)-Familie gehandelt: ADAM-9, -10 und -17 (Hebert et al., 2006). Jedoch wird ADAM-10 als Haupt- α -Sekretase betrachtet, da eine Mutation des ADAM-10 die Plaquebildung verstärkt und der *knock out* (ko) von ADAM-9 oder ADAM-17 keine Verringerung des sAPP α hervorbringt (Weskampf et al., 2002; Postina et al., 2004; Kuhn et al., 2010).

Für die Generation von A β wird APP an der Plasmamembran in einer Clathrin/Raft vermittelten Endozytose in Endosomen, Wirkungsstätten der β -Sekretase, internalisiert (Koo und Squazzo, 1994; Schneider et al., 2008). Zu den putativen β -Sekretasen zählen *beta-site APP cleavage enzyme* 1 (BACE1) und 2 (BACE2). BACE1 wurde 1999 erstmals beschrieben und ist eine membranständige Aspartylprotease mit 501 AS (Sinha et al., 1999). Dieses in den Endosomen und Lysosomen lokalisierte Enzym ist in Neuronen stark exprimiert, besitzt zwei aktive Motive in der extrazellulären Region und entfaltet maximale Aktivität bei saurem pH (Vassar et al., 1999; Ben Halima und Rajendran, 2011, Kogel et al., 2011). Das *trafficking* des BACE1 zum Endosom erfolgt entweder durch Transport an die Zelloberfläche mit anschließender Internalisierung oder direkt aus dem trans Golgi-Netzwerk (Rajendran und Annaert, 2012). Ein direkter Zusammenhang von BACE1 mit AD wurde in der Literatur mehrfach geschildert. So wurde in Hirnhomogenaten von AD-Patienten eine erhöhte Aktivität der β -Sekretase festgestellt, wobei die Aktivität der α -Sekretase vermindert vorlag (Tyler et al., 2002). In Übereinstimmung zeigten Yang und Kollegen wenig später, dass sowohl Proteinlevel als auch Aktivität von BACE1 in AD-Patienten erhöht war (Yang et al., 2003). In Alzheimer-Mausmodellen reduzierte eine BACE1-Defizienz die A β -Produktion massiv und verhinderte die Entwicklung AD-ähnlicher Pathologien (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001). Das Verhalten oder die Neurologie dieser Tiere, in denen der A β -Gehalt weniger als 10% im Vergleich zu den Kontrolltieren betrug, blieben unverändert. Über die Funktion von BACE2 ist bislang wenig bekannt. Ihre Expression, zumeist auf Gliazellen beschränkt, ist im Vergleich zu BACE1 wesentlich schwächer (Laird et al., 2005).

Im Gegensatz zur β -Sekretase stellt die γ -Sekretase ein multimerer Proteinkomplex dar, der sich aus den Komponenten Presenilin 1 oder 2 (PS1, PS2), Nicastrin (NCT), *anterior pharynx defective* 1- α (APH1- α) und - β (APH1- β) sowie *presenilin enhancer* 2 (PEN2) zusammensetzt (De Strooper, 2003). Presenilins, die den proteolytischen Kern bilden, werden zwischen der 6. und 7. Transmembran-Loop-Region geschnitten, wobei beide Fragmente für die Aktivität der γ -Sekretase wichtig sind (Thinakaran et al., 1996). Dieser Vorgang der Endoproteolyse wird durch PEN2 vermittelt (Luo et al., 2003). APH1 wird als Stabilisator des Komplexes eingestuft, weil es mit PS und NCT interagiert, um einen relativ stabilen Präkomplex innerhalb des ER zu formen (Lee et al., 2002). Über die Rolle des NCT herrscht Uneinigkeit. Denn obwohl NCT als Substratrezeptor die Stabilität und Aktivität der γ -Sekretase entscheidend beeinflusst (Shirotani et al., 2003; Shah et al., 2005), ist der Komplex auch in Abwesenheit von NCT in der Lage, ihre natürlichen Substrate Notch und APP zu schneiden (Zhao et al., 2010).

1.1.3.3 Entstehungsort des Amyloid β

Obwohl die Rolle der Sekretasen bei der Entstehung des A β detailliert aufgeklärt wurde, bleiben die Erkenntnisse auf der Suche nach dem präzisen Entstehungsort der A β weiterhin diskussionswürdig. Den ersten bedeutenden Vorstoß zur Aufklärung des Entstehungsortes leisteten T. Hartmann und Kollegen (Hartmann et al., 1997). Mittels Immunoelektronenmikroskopie fanden sie heraus, dass unterschiedliche intrazelluläre Kompartimente als Produktionsstätten der A β -Peptide dienen. Während A β 40 im trans Golgi-Netzwerk entsteht, wird A β 42 im ER gebildet. Im heute gängigen Modell werden die Entstehungsorte für unterschiedliche A β -Spezies nicht differenziert betrachtet (LaFerla et al., 2007). Nachdem das APP zur Plasmamembran dirigiert wird, wird der überwiegende Teil von der α -Sekretase geschnitten, wodurch der nicht-amyloidogene Prozessierungsweg eingeschlagen wird (Kojro et al., 2001). Der Rest des APP wird in Endosomen internalisiert. Endosomen enthalten BACE1, die das APP zu sAPP β und C99 spaltet. Das C99 verbleibt innerhalb der Membran verankert und kann anschließend entweder zurück zur Plasmamembran, ins ER oder in den Lysosomen transportiert werden. Sowohl im ER als auch in den Lysosomen wird das C99 durch die γ -Sekretase zu A β weiterverarbeitet. Jedoch wurde neulich in *in vitro* Experimenten gezeigt, dass APP von der Zelloberfläche direkt zu den Lysosomen transportiert wird (Lorenzen et al., 2010).

Eine direkte Assoziation des endo-/lysosomalen Systems mit der A β -Produktion wird seit langem vermutet (Sisodia und St. George-Hyslop, 2002; Kaether et al., 2006). Denn (1) β -Sekretase interagiert mit APP vorwiegend in Endosomen (Kinoshita et al., 2003), (2) β -Sekretase operiert mit einem pH-Optimum im sauren Bereich (Vassar et al., 1999), (3) auf lysosomalen Membranen ist die Aktivität der γ -Sekretase am stärksten (Pasternak et al., 2003), (4) Inhibition der Internalisierung des APP ins endo-/lysosomale System vermindert die Produktion des A β (Koo und Squazzo, 1994) und (5) Behandlung von Kulturzellen mit pH-erhöhenden Agenzien resultiert in verringerter Freisetzung von A β (Schrader-Fischer und Paganetti, 1996). Diese Erkenntnisse suggerieren, dass ein gewichtiger Teil des A β im endo-/lysosomalen System der Neuronen gebildet wird. Ob das dort generierte A β anschließend degradiert oder sezerniert wird, bleibt Gegenstand der aktuellen Forschung.

1.1.3.4 Degradation des Amyloid β

Die physiologische Konzentration des A β im Gehirn wird durch ständiger Produktion und kontinuierlichem Abbau stabil gehalten (Miners et al., 2008). Die Degradation der A β -Peptide *in vivo* wird vorwiegend durch die Proteasen *nepilysin* (NEP) und *insulin-degrading-enzyme* (IDE) gewährleistet. Das membranverankerte NEP mit einem Molekulargewicht von 90-110 kDa gehört zu den Zink-abhängigen Endopeptidasen (Kanemitsu et al., 2003). Sowohl A β -Monomere als auch -Oligomere vermag dieses Enzym abzubauen, wobei A β 40-Monomere effektiver als A β 42 degradiert werden. Aber abnormale A β -Isoformen, die durch Mutationen entstehen, können von NEP nicht gespalten werden (Tsubuki et al., 2003). Die Bedeutung des NEP für die Erhaltung der A β -Homöostase zeigt sich insbesondere dadurch, dass mRNA- und Proteinlevel von NEP in Gehirnregionen mit hohen Plaqueablagerungen verringert vorliegen und dass die NEP-Defizienz im AD-Mausmodell zur Akkumulation des A β führt (Yasojima et al., 2001; Iwata et al., 2001). Zusätzlich wurde in einer Studie mit *post mortem* Hirnproben von AD-Patienten nachgewiesen, dass die Menge an NEP mit wachsendem Alter sinkt und dass der NEP-Proteingehalt mit dem A β -Level invers korreliert (Hellström-Lindahl et al., 2006).

IDE, eine 110 kDa große Zink-Metalloendopeptidase, ist ein weiteres A β -abbauendes Enzym (Authier et al., 1996). Obwohl der Großteil dieses Proteins sich im Zytosol aufhält, existiert eine sekretierte Form in den extrazellulären Bereichen, beispielsweise in der Zerebrospinalflüssigkeit (*cerebrospinal fluid*, CSF) (Qiu et al., 1998). Zu den Substraten von IDE gehört neben A β -Monomere noch Insulin, Amylin sowie *insulin-like growth factors* I

und II (Miners et al., 2008). Anhand eines *ide* ko-Mausmodells demonstrierten Farris und Kollegen, dass die Degradation des A β in Abwesenheit des IDE um mehr als 50% abnimmt (Farris et al., 2003). Im Umkehrschluss reduziert eine Überexpression von NEP oder IDE die Bildung amyloider Ablagerungen (Leissring et al., 2003).

Andere Enzyme, die *in vitro* A β spalten können, sind *endothelin-converting enzyme* (ECE)-1 und 2, *angiotensin-converting enzyme* (ACE), Plasmin und Matrix-Metalloproteasen (MMPs). Überexpression der intrazellulären Zink-Metalloendopeptidasen ECE-1 und -2 in *chinese hamster ovary* (CHO) Zellen vermindert extrazelluläres A β um bis zu 90% (Eckman et al., 2001). ACE vermag A β 40 und A β 42 *in vitro* zu spalten (Hemming und Selkoe, 2005). Im Mausmodell jedoch hat weder die Inaktivierung des *ace*-Gens noch eine Inhibition des Enzyms einen signifikanten Einfluss auf die A β -Menge (Eckman et al., 2006). Die Serinprotease Plasmin schneidet A β an mehreren Stellen und unterbindet die Aggregation des A β 42 *in vitro* (Exley et al., 2001). Als einziges A β -abbauendes Enzym ist MMP-9 in der Lage, reife Fibrillen *in vitro* zu dissoziieren (Backstrom et al., 1996). Eine neuere Studie weist aber darauf hin, dass kein kausaler Zusammenhang zwischen den MMPs und AD *in vivo* besteht (Baig et al., 2008).

1.1.4 Neuroinflammation: ein zweischneidiges Schwert

Demenz, A β -Ablagerungen, neurofibrilläre Tangles, Verlust von Synapsen und chronische Inflammation sind die wichtigsten pathologischen Merkmale von AD. Sogenannte „*high pathology controls*“, also Patienten, die ein erhöhtes Erkrankungsrisiko haben, zeigen verstärkte A β -Ablagerungen, neurofibrilläre Tangles, Entzündung, jedoch keine Demenz und keinen Verlust an Synapsen (Lue et al., 1996). Demnach gilt es als sehr wahrscheinlich, dass Inflammation der Demenz und dem Verlust an Synapsen in der AD-Pathogenese voraussetzt. Entzündungsprozesse im Gehirn besitzen den Charakter eines zweischneidigen Schwertes. Einerseits führt die Freisetzung toxischer Zytokine zum Untergang von Neuronen, andererseits wird das Überleben der Neuronen durch Ausschüttung von Neutrophinen unterstützt und die Reparatur geschädigter Gewebe beschleunigt (Wyss-Coray und Mucke, 2002). Drei zentrale Fragestellungen bleiben vorerst unbeantwortet: (1) Ist die chronische Inflammation die Ursache oder eine Konsequenz? (2) Können antiinflammatorische Medikamente AD effektiv bekämpfen? (3) Obgleich Vorbeugung oder Behandlung, welches Medikament wirkt wann am besten? (Rogers, 2008). Zwar senken einige antiinflammatorische Präparate, speziell nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente

(NSAIDs), das Risiko, an AD zu erkranken (in't Veld et al., 2001). Aber sie verlangsamen lediglich den Krankheitsverlauf und können die Entwicklung zur Demenz letztendlich nicht stoppen (McPeer und McPeer, 2007; Vlad et al., 2008).

1.1.4.1 Rolle der Mikroglia in der Alzheimer-Krankheit

Mikroglia, auch bekannt als residente Makrophagen des zentralen Nervensystems (ZNS), machen ca. 12% aller Zellen im ZNS aus (Lawson et al., 1990). Während der Embryonalentwicklung wandern mikrogliale Vorläuferzellen aus dem Mesoderm ins sich formende Gehirn, differenzieren sich und bilden dort die immunologische Verteidigung des ZNS (Chan et al., 2007). Ihre ungleichmäßige Verteilung äußert sich dadurch, dass sie in der weißen Substanz in relativ hoher Anzahl vorhanden sind. Der Turnover dieser kleinen Gliazellen bleibt in Gehirn gering, sodass die Zellen sich überwiegend durch Proliferation aus dem endogenen Pool erneuern (Ajami et al., 2007). Jedoch ist ein Teil der Mikroglia perivaskulären Ursprungs und wird ständig durch Zellen aus dem Knochenmark ersetzt (Hickey und Kimura, 1988).

Die Reaktion der Mikroglia auf pathologische Ereignisse wird als mikrogliale Aktivierung bezeichnet. Nach der Aktivierung ändern sie ihre Morphologie und werden amöboid. Weiterhin wird die Konversion vom ruhenden zum aktivierten Phänotyp durch Produktion und Sekretion von Zytokinen, Chemokinen, Akutphasenproteinen sowie reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies begleitet (Cameron und Landreth, 2010). Die klassische Aktivierung (M1-Phänotyp) wird durch Oberflächenrezeptoren eingeleitet, die als Verteidigungsmechanismus gegen Pathogene fungieren. Aber gleichzeitig wird das umliegende Gewebe durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine geschädigt. Die alternative Aktivierung (M2-Phänotyp) ist mit Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-13 und *transforming growth factor- β* (TGF- β) verbunden (Martinez et al., 2009). Neben der Ausschüttung von *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und *nerve growth factor* (NGF) zur Förderung der Proliferation von Neuronen werden Stammzellen durch Mikroglia zu Stellen der Inflammation und Verletzung rekrutiert, die die Geweberegeneration anregen (Aarum et al., 2003). Moderne Techniken, die auf Positronen-Emissions-Tomographie (PET) basieren, erlauben ein *in vivo* Imaging der aktivierten Mikroglia (Cagnin et al., 2007). Möglicherweise können sie zu den offenen Fragen, wann, wo und wie Mikroglia im Gehirn aktiviert werden, neue Erkenntnisse liefern.

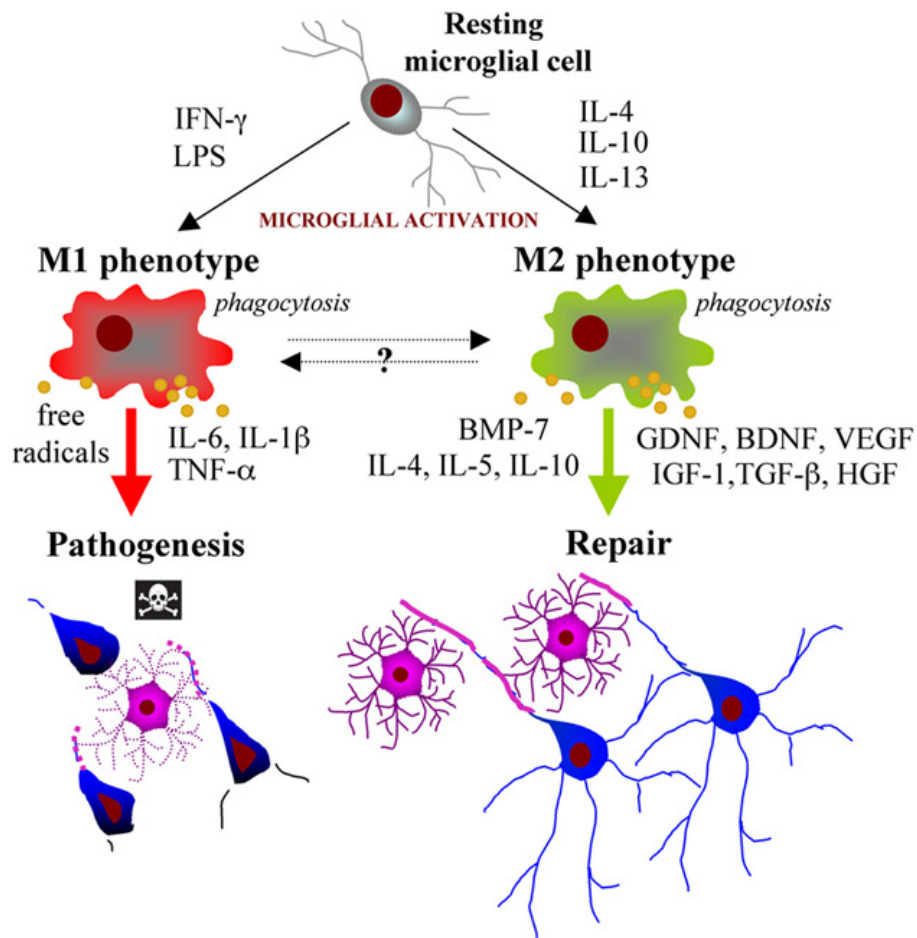


Abbildung 4: Phänotypen der mikroglialen Aktivierung

Die klassische Aktivierung (M1), die typischerweise durch Lipopolysaccharide (LPS) oder Interferon- γ (IFN- γ) eingeleitet wird, führt zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) oder IL-6. Gleichzeitig wird das umliegende Gewebe geschädigt. Im Gegensatz scheiden Mikroglia, die durch IL-4, IL-10 oder IL-13 alternativ aktiviert werden (M2), vermehrt antiinflammatorische Zytokine sowie Neutrophine aus, die das Überleben der Neuronen begünstigen und die Reparatur geschädigter Gewebe beschleunigen. (Abbildung stammt aus Fugamalli et al., *Frontiers in Bioscience*, 2011)

Die Kolo-kalisation aktivierter Mikroglia mit A β -Ablagerungen lieferte vor mehr als 20 Jahren den ersten Hinweis, dass sich die Inflammation an der AD-Pathogenese aktiv beteiligt (Akiyama et al., 2000). Später konnte mittels Multiphotonmikroskopie nachgewiesen werden, dass Mikroglia zu A β -Plaques wandern (Meyer-Luehmann et al., 2008). Die Immunantwort der Mikroglia auf A β -Aggregate gleicht in vielen Hinsichten der klassischen Aktivierung, weil sie nach A β -Stimulation *macrophage inflammatory protein 1- α* , *growth factor macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *monocyte chemoattractant peptide-1* (MCP-1) und proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und IL-6 ausstoßen (Lue et al., 2001). Allerdings ist in AD-

Mausmodellen neben der proinflammatorischen Aktivierung auch eine erhöhte Expression antiinflammatorischer Markergene wie IL-10 feststellbar (siehe Ergebnisse Teil II).

Als potente A β -Phagozyten stellen Mikroglia ein wichtiger Bestandteil zur Erhaltung des A β -Gleichgewichts dar. Sie verfügen über eine Vielzahl der bisher bekannten A β -Rezeptoren: *scavenger receptor class A* (SR-A) (auch bekannt als *macrophage scavenger receptor 1* (MSR-1)) (El Khoury et al., 1996), *scavenger receptor class B* (SR-B) (Paresce et al., 1996), *receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE) (Yan et al., 1996), *cluster of differentiation 36* (CD36) (El Khoury et al., 2003), CD14 (Liu et al., 2005), *toll-like receptor 4* (TLR4) (Walter et al., 2007) und TLR2 (Liu et al., 2012). In pathologischen Hirnregionen von AD-Patienten liegt eine deutliche Erhöhung von RAGE vor (Lue et al., 2001). Erhöhte Mengen an CD14, TLR2 und TLR4 wurden sowohl im Tiermodell als auch in AD-Patienten gefunden (Fassbender et al., 2004; Letiembre et al., 2007). TLR2 und TLR4 sind wichtige *pattern recognition* Rezeptoren der Mikroglia im Kampf gegen Pathogene wie Bakterien oder Viren. In Zusammenarbeit mit CD14 leiten sie die mikrogliale Antwort auf oligomeres und fibrilläres A β ein (Liu et al., 2005; Reed-Geaghan et al., 2009). Außerdem wurde im Tiermodell klar demonstriert, dass A β im Cortex und Hippocampus nach Inaktivierung des TLR4 vermehrt abgelagert werden (Tahara et al., 2006).

Wenn Mikroglia also potente A β -Phagozyten sind, weshalb können sie A β -Plaques *in vivo* nicht effektiv beseitigen? Eine von Hickman und Kollegen veröffentlichte Studie schien die Antwort auf diese zentrale Fragestellung gefunden zu haben. Sie berichteten, dass die Expression A β -bindender Rezeptoren sowie A β -abbauende Enzyme im Alzheimer-Mausmodell ab einem Alter von 8 Monaten abnahm und gleichzeitig eine verstärkte Aktivierung proinflammatorischer Gene auftrat (Hickman et al., 2008). Diese Resultate suggerieren, dass in der frühen Erkrankungsphase von AD eine effiziente Bereinigung des A β durch Mikroglia gewährleistet wird. In den späten Stadien jedoch führt die Herunterregulation jener Gene zu Beschränkungen im A β -Abbau, sodass die A β -Ablagerung stetig zunimmt. Ergebnisse weiterer Studien unterstützen diese Ansicht. Denn bereits zuvor wurde nachgewiesen, dass Mikroglia aus gealtertem Gehirn sich langsamer bewegen, schlechter phagozytieren und anders auf fibrilläres A β reagieren als jene aus neugeborenen Mäusen (Floden und Combs, 2006; Meyer-Luehmann et al., 2008). Das heißt, dass das Alter einen entscheidenden Einfluss auf die Funktionalität der Mikroglia ausübt. Allerdings konnte dieses Modell der Altersabhängigkeit in einer späteren Arbeit nicht bestätigt werden. Nach spezifischer Depletion der Mikroglia in jungen Mäusen wurden keine Veränderung des A β -

Plaqueloads registriert (Gratewohl et al., 2009). Es bleibt offen, ob die unterschiedlichen Effekte auf das jeweils verwendete Mausmodell zurückzuführen sind.

1.1.4.2 Rolle der Monozyten/Makrophagen in der Alzheimer-Krankheit

Monozyten aus dem Blut, die ursprünglich aus Zellen des Knochenmarks stammen, sind Vorläuferzellen von Makrophagen und antigenpräsentierenden Zellen (Feng et al., 2011). Monozyten sind nicht nur morphologisch, sondern auch funktional heterogen, sodass sie in mindestens fünf Klassen gegliedert werden (Gordon and Taylor, 2005). Die klassische Subklasse 1 besitzt CD14, aber kein CD16. Die Zellen der Subklasse 1 nehmen den Hauptteil (ca. 60%) der Monozyten ein. Klasse 2 (25%) und 3 (9%) exprimieren CD14 nur in geringem Maß, sind effektive Phagozyten und besitzen CD16. Die Klasse 4 (4%) sind Vorläufer von dendritischen Zellen und exprimieren viel CD40. Zellen der Klasse 5 (2%) bilden die kleinste Gruppe und werden als unreife Monozyten eingestuft. In Geweben differenzieren sich Monozyten zu Makrophagen, ein Vorgang, der durch *macrophage colony-stimulating factor* (MCSF) reguliert wird (Lutter et al., 2008). Ähnlich wie Mikroglia besteht die Hauptfunktion der Makrophagen darin, zu Orten inflammatorischer Aktivität zu migrieren und dort Pathogene sowie tote Zellen durch Phagozytose zu entfernen (Delamarre et al., 2005). Dabei setzen sie Zytokine und Chemokine nach Aktivierung frei. Die zwei Aktivierungsphänotypen gleichen denen der Mikroglia.

Das Hirngewebe wird permanent von Makrophagen aus dem peripheren Kreislauf infiltriert (Rezai-Zadeh et al., 2009). Dieser Vorgang wird normalerweise durch die Blut-Hirn-Schranke gehemmt, sodass nur wenige Makrophagen ins Gehirn eindringen. Jedoch zeigten Simard und Kollegen, dass das Gehirn von AD-Modellmäusen durch eine beträchtliche Anzahl an Makrophagen aus dem Blut infiltriert werden und dass diese Zellen A β -Plaques effektiv beseitigen (Simard et al., 2006). Eine auf Knochenmarkstransplantation basierende Studie bestätigte, dass Monozyten aus dem Blut ins Gehirn einwandern, sich dort zu Mikroglia differenzieren und einen bedeutenden Beitrag zur Reduktion des A β -Levels leisten (Hao et al., 2011). Umgekehrt bewirkt das selektive Entfernen der Makrophagen eine gesteigerte Ablagerung des A β (Rivest, 2009).

1.2 Sphingomyelinasen

1.2.1 Klassifikation der Sphingolipide

Sphingolipide bilden eine Lipidklasse, deren Namensgebung sich vom ungesättigten Aminoalkohol Sphingosin ableitet. Neben Phosphoglyceride und Cholesterol zählen sie zu den wichtigsten Bestandteilen der Zellmembran und erfüllen bedeutende Funktionen in der Signaltransduktion und zellulären Interaktion (Brown und London, 2000). Ihrem Aufbau entsprechend werden Sphingolipide in den Kategorien Ceramide, Sphingomyeline und Glycosphingolipide eingeteilt. Ceramide bestehen aus einem Sphingosin, das über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verbunden ist. Sphingomyeline werden aus einem Phosphorylcholin und einem Ceramidmolekül zusammengesetzt, die über eine Phosphodiesterbindung miteinander verknüpft sind. Unter Glycosphingolipide werden Cerebroside und Ganglioside zusammengefasst, die ein oder mehrere Zuckerreste enthalten.

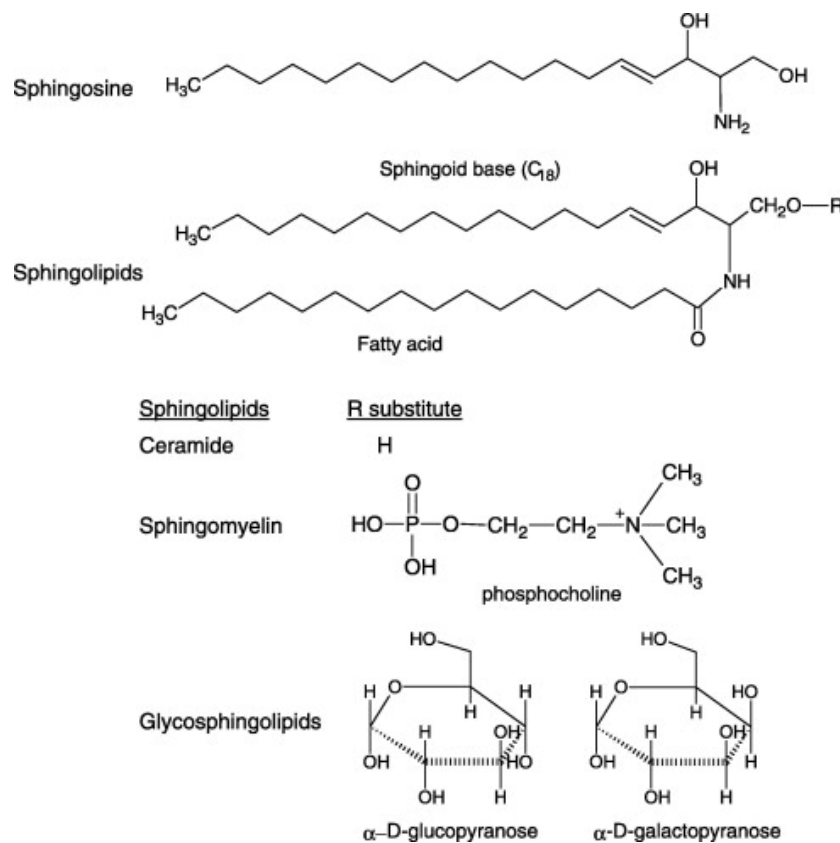


Abbildung 5: Grundstruktur und Klassifikation der Sphingolipide

Die Sphingolipide werden in Ceramide, Sphingomyeline und Glycosphingolipide eingeteilt. Das Grundgerüst aller Sphingolipide stellt das Sphingosin. Das Sphingosin in Verknüpfung mit einer Fettsäure ergibt ein Ceramid. Das Sphingomyelin setzt sich aus einem Ceramid und einem Phosphorylcholin zusammen. Glycosphingolipide enthalten zusätzliche Zuckerreste. (Abbildung stammt aus Patwardhan und Liu, *Progress in Lipid Research*, 2011)

1.2.2 Klassifikation der Sphingomyelinasen

Enzyme, die die Hydrolyse der Sphingomyeline zu Ceramiden und Phosphorylcholin katalysieren, werden Sphingomyelinasen (SMasen) genannt. In Abhängigkeit des pH-Optimums ihrer enzymatischen Aktivität werden sie in alkaline, neutrale und saure SMasen mit Untergruppierungen gegliedert (Alonso und Goni, 2002).

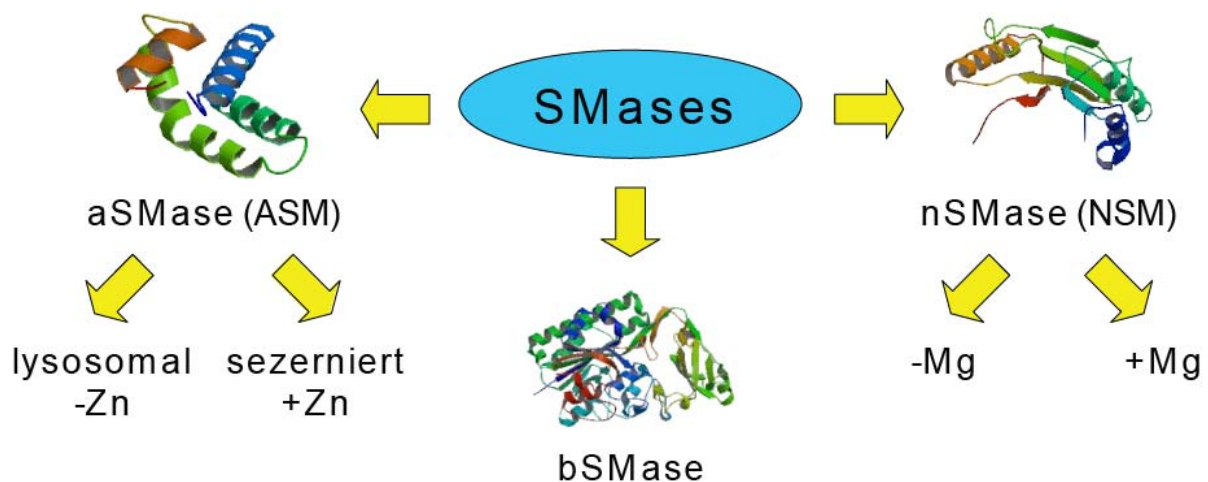


Abbildung 6: Einteilung der Sphingomyelinasen in Abhängigkeit ihres pH-Optimums

aSMase (ASM) = saure Sphingomyelinase, nSMase (NSM) = neutrale Sphingomyelinase, bSMase = basische oder alkaline Sphingomyelinase. Die NSM arbeitet sowohl Mg^{2+} -abhängig als auch Mg^{2+} -unabhängig im neutralen pH-Bereich. Vom gleichen Vorläuferprotein leiten sich bei der ASM zwei Varianten ab. Ein Teil der ASM wird zum Lysosom dirigiert und spaltet Sphingomyelin im sauren pH-Bereich. Die zweite ASM-Form wird sezerniert und arbeitet Zn^{2+} -abhängig im extrazellulären Raum. (Abbildungen der Proteinstrukturen stammen von *USCN Life Science Inc.*)

Die am besten untersuchte alkaline SMase (bSMase) wurde aus dem Darm von Ratten isoliert (Cheng et al., 2002). Dieses Enzym ist nicht in weiteren Organen exprimiert, arbeitet Mg^{2+} -abhängig und erfährt keine Inhibition durch Glutathion. Ferner wurde ihre Defizienz mit der Entwicklung des Kolonkarzinoms in Verbindung gebracht (Nilsson und Duan, 1999). Neutrale SMasen (nSMasen, NSMs) können sowohl in Abhängigkeit von Mg^{2+} als auch Mg^{2+} -unabhängig Sphingomyelin spalten, wobei die Mg^{2+} -abhängige Variante besser verstanden ist (Alonso und Goni, 2002). In Säugerzellen stellt die Mg^{2+} -abhängige NSM ein integrales Membranprotein dar, welches ein pH-Optimum nahe 7 besitzt. Die Expression dieses 92 kDa großen Proteins erscheint ubiquitär, wobei die Aktivität im Gehirn am stärksten ist. Die enzymatische Aktivität der Mg^{2+} -abhängigen NSM ist im höchsten Maß von Phosphatidylserin abhängig und wird durch Glutathion massiv inhibiert (Liu und Hannun, 2000). Dagegen existieren nur wenige Studien über die Eigenschaften der Mg^{2+} -unabhängigen NSM. Sie wurde ursprünglich als zytosolisches Protein in HL-60 Zellen beschrieben, welches

durch Metalle wie Kupfer, Eisen oder Zink inhibiert wird und bei pH7,5 ihre höchste Aktivität entfaltet (Okazaki et al., 1994). Später wurde ihre Präsenz in der Skelettmuskulatur nachgewiesen (Ghosh et al., 1998). Details zur sauren Sphingomyelinase (aSMase, ASM) werden im nächsten Abschnitt näher erläutert. Abseits der genannten SMasen gibt es eine weitere Gruppe bakterieller Sphingomyelinasen, die strukturelle Ähnlichkeiten zu Phospholipase C aufweisen. Beispielweise kann das α -Toxin aus *Clostridium perfringens* sowohl Phosphatidylcholin als auch Sphingomyelin spalten (Titball et al., 1993).

1.2.3 Saure Sphingomyelinase

Die ASM wurde 1966 erstmals beschrieben und ist von allen SMasen am besten charakterisiert (Barenholz et al., 1966). Bei Menschen wird sie durch das 6 kb große *smpd1*-Gen, das auf dem Chromosom 21 liegt, kodiert (Schuchman et al., 1992). Von den drei möglichen Splicevarianten führt nur Transkript 1 zu einem funktionalen Polypeptid mit einer Länge von 629 AS (Schuchman et al., 1991). Die primäre Struktur der ASM ist in der Abbildung 7 dargestellt. Sie enthält ein N-terminales Signalpeptid (AS 1-46), gefolgt von einer Saponin-ähnlichen Domäne (AS 89-165) und einer Prolin-reichen Region, bevor der katalytische Kern und der C-terminale Bereich den Schluss bilden (Jenkins et al., 2009).

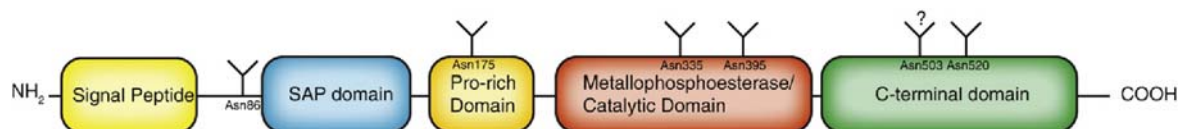


Abbildung 7: Primäre Struktur der sauren Sphingomyelinase (aSMase, ASM)

SAP domain = Saponin-ähnliche Domäne. Stellen der N-Glykosylierungen an den Asparaginen sind markiert. Glykosylierung an Asn503 ist bisher nicht bestätigt. (Abbildung stammt aus Jenkins et al., *Cell Signaling*, 2009)

Nach der Peptidsynthese wird die ASM mehrfach posttranslational modifiziert. Sobald sie ins ER eintritt, wird die N-terminale Signalsequenz entfernt. Anschließend werden Disulfidbrücken im ER-Lumen durch Proteindisulfid-Isomerasen geknüpft, wobei 16 der insgesamt 17 Cysteinresten sich an der Ausbildung der Disulfidbrücken beteiligen (Qiu et al., 2003). Die Deletion oder Oxidation des C-terminalen Cys629 resultiert in eine 4-5 fache Steigerung der enzymatischen Aktivität. Im Gegensatz zur NSM reagiert die ASM gegenüber reduzierenden Agentien äußerst empfindlich. Dieser Effekt ist höchstwahrscheinlich auf die Reduktion der Disulfidbrücken zurückzuführen (Liu und Hannun, 1997). Des Weiteren wurden 5 der 6 vorhergesagten N-Glykosylierungen (Asn503 nicht glykosyliert)

nachgewiesen (Ferlinz et al., 1997). Für die Aktivität und Beibehaltung der Konformation erwiesen sich die Glykosylierungen als essentiell, da Glykosylierungsdefekte an Asn333, Asn393 und Asn518 die Aktivität muriner ASM drastisch senken (Newrzella und Stoffel, 1996).

Das Verständnis der ASM wird vor allem durch die ungewöhnliche Regulation des intrazellulären *trafficking* erschwert. Ausgehend vom gleichen Vorläuferprotein leiten sich zwei Varianten ab, nämlich die L-SMase (auch aSMase) und die S-SMase (auch sSMase). Ihre Namensgebung liegt darin begründet, dass die L-SMase lysosomal lokalisiert ist und die S-SMase in den extrazellulären Raum sekretiert wird (Schissel et al., 1996). Eine mögliche Ursache für das sonderbare *trafficking* wird im Glykosylierungsmuster vermutet. Während das Glykosylierungsmuster der L-SMase einen hohen Anteil an Mannose enthält, zeigt die Glykosylierung der S-SMase einen komplexeren Aufbau (Schissel et al., 1998). Es ist bekannt, dass der Transport zu Lysosomen primär über das Mannose-6-Phosphat (M6P)-Rezeptor-System führt (Kornfeld, 1987). Falls Störungen im zellulären M6P-System auftreten, werden lysosomale Enzyme wie L-SMase fehlerhaft transportiert, sodass sie anstatt zum Lysosom verstärkt über den sekretorischen Pathway des Golgi-Apparats ausgeschieden werden (Takahashi et al., 2005). Ein alternativer Weg zum Lysosomentransport der L-SMase wird durch Sortilin vermittelt (Ni und Morales, 2006). Über welchen Mechanismus die Anteile der L- und S-SMasen reguliert werden, ist Gegenstand aktueller Forschung.

Die L-SMase operiert im sauren pH-Bereich und die S-SMase im neutralen (Schissel et al., 1998). Aber die Lokalisation, das Glykosylierungsmuster und die unterschiedlichen pH-Optima bleiben nicht die einzigen Unterscheidungsmerkmale zwischen L- und S-SMasen. Beispielweise beginnt der N-Terminus der S-SMase mit His60, L-SMase jedoch mit Gly66. Das bedeutet, dass im Lysosom weitere Prozessierungsschritte am N-Terminus durchgeführt werden, damit aus dem 75 kDa Vorläuferprotein letztlich ein 70 kDa großes reifes Enzym entsteht (Schissel et al., 1998). Außerdem wird die S-SMase im Gegensatz zur L-SMase durch physiologische Konzentrationen von Zn^{2+} aktiviert (Spence et al., 1989). Die genaue Zink-Bindestelle wurde bislang nicht gefunden.

1.2.4 Rolle der sauren Sphingomyelinase in pathologischen Vorgängen

Am prominentesten äußert sich die Funktion der sauren Sphingomyelinase im Niemann-Pick-Syndrom (*Niemann-Pick disease*, NPD). Diese nach Albert Niemann (1880-1921) und Ludwig Pick (1868-1944) benannte Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt und gehört zu den lysosomalen Speicherkrankheiten. Charakteristischerweise werden große Mengen an

Sphingomyelin in Endosomen und Lysosomen von Leber, Milz, Knochenmark und Gehirn gelagert. Als sekundärer Effekt akkumulieren weitere Lipide wie Cholesterol und Ganglioside, die zur Verstärkung des Krankheitsverlaufs beitragen (Schuchman, 2010).

Nach dem klinischen Erscheinungsbild und der molekularen Ursache werden NPD-Patienten in drei Typen eingeteilt. Bei NPD-Typ A und B wird die Defizienz der ASM durch einen genetischen Defekt des *smpd1*-Gens herbeigeführt. Die Inzidenz beider Typen liegt bei ungefähr 1/250000. Typ A erleiden schwere neurologische Ausfälle und leben selten länger als drei Jahre (McGovern et al., 2006). Bei Patienten von Typ B ist die Leber im Kindesalter geringfügig vergrößert. Im Erwachsenenalter manifestieren sich keine neurologische Symptome, sodass die Lebenserwartung nur leicht eingeschränkt ist (McGovern et al., 2008). Anders als die anderen beiden Formen wird Typ C mit einer Inzidenz von 1/150000 durch Mutationen in den Genen *npc1* und *npc2* verursacht, die Proteine des Cholesterinstoffwechsels kodieren. Charakteristisch für diese Variante ist die Akkumulation von Cholesterol in Lysosomen, die wiederum einen Verlust der ASM-Aktivität bewirken (Reagan et al., 2000).

Die Etablierung von *asm ko* Mäusen offenbarte die Beteiligung von ASM in weiteren pathologischen Vorgängen, die mit Ceramiden und *lipid rafts* zusammenhängen. Ceramide und deren Metabolite haben vielfältige Funktionen einschließlich Apoptose, Differenzierung, Migration, Angiogenese, Zellproliferation, Proteintransport, Infektion und Inflammation (Hannun und Obeid, 2008). Sie werden über *de novo* Synthese, Hydrolyse des Sphingomyelins oder den *salvage pathway* generiert (Perry, 2002; Kitatani et al., 2008). Ceramid-reiche Domänen verändern die biophysikalischen Eigenschaften der Zellmembran, welche sich zumeist in Resistenz gegen Detergenzien widerspiegeln (Sol et al., 2006). Zusätzlich begünstigt die Hydrolyse von Sphingomyelinen zu Ceramiden die Bildung der *lipid rafts*, kleine (10-200 nm) dynamische Mikrodomänen der Zellmembran, die reich an Cholesterin und Sphingolipide sind. Sie neigen zur Fusion und dienen beispielsweise als Plattform für Signaltransduktionsprozessen membranständiger Rezeptoren (Grassme et al., 2001). Bedingt durch die verringerte Ceramidproduktion sind *asm ko* Mäuse gegen Stimuli wie Fas-Ligand, Lipopolysaccharide (LPS), TNF- α , ionisierende Strahlung, Phototoxizität oder Ischämie geschützt (Jenkins et al., 2009). Hingegen zeigen diese Tiere als Antwort auf eine Infektion durch *Pseudomonas aeruginosa* Entzündung, Sepsis und erleiden schließlich den Tod (Grassme et al., 2003). Diese Symptomatik ist mit der von Patienten, die an zystischer Fibrose erkranken, vergleichbar. Die molekulare Basis liegt darin, dass infolge dieser Infektion die ASM zur Plasmamembran rekrutiert wird und dort Ceramide generiert,

um die Bildung der *lipid rafts* zu ermöglichen und die zelluläre Antwort auf die Infektion einzuleiten.

1.3 Lipidmetabolismus und Alzheimer-Krankheit

Abseits der Mutationen in den Genen *app*, *psen1* und *psen2*, die einen direkten Einfluss auf die A β -Produktion ausüben, ist *apoE* das prominenteste AD-Risikogen (Saunders et al., 1993). Dieses auf dem Chromosom 19 lokalisierte Gen kodiert für ein Apolipoprotein, das in der Leber synthetisiert wird und wasserunlösliche Lipide wie Cholesterol oder Phosphoglyceride in der Blutbahn transportiert. Von den sechs bekannten Isoformen kommen ApoE ϵ 2, ApoE ϵ 3 und ApoE ϵ 4 am häufigsten vor, die sich in ihrer Sequenz jeweils um eine AS unterscheiden und das AD-Risiko maßgeblich mitbestimmen. Denn ApoE ϵ 2 und ApoE ϵ 3 vermindern das Risiko, im hohen Alter an AD zu erkranken. Dagegen weisen Träger von ApoE ϵ 4 ein höheres A β -Level und mehr Plaques im Gehirn auf. Je nach Studie wurde ApoE ϵ 4 in 40-65% von allen AD-Fällen gefunden, sodass für ein ApoE ϵ 4-Allel ein vierfach und für zwei ApoE ϵ 4-Allele ein zehnfach erhöhtes Risiko prognostiziert wird (Corder et al., 1993; Saunders et al., 1993; Schmechel et al., 1993; Corder et al., 1994; Strittmatter und Roses, 1996). Darüber hinaus wurde kürzlich bekannt, dass ApoE ϵ 4-Träger weniger ApoE-Proteine im Plasma als Träger anderer ApoE-Varianten haben (van Vliet et al., 2009).

Aber warum generieren Träger von ApoE ϵ 4 mehr A β ? Die Antwort auf diese Frage findet sich nach den aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen im Stoffwechsel des Cholesterols, dessen Konzentration im Serum mit der A β -Menge des Gehirns korreliert. Epidemiologische Studien zeigten, dass ein Anstieg des Cholesterolspiegels das AD-Risiko signifikant anhebt (Kivipelto et al., 2001). Eine Hemmung der Cholesterolsynthese durch das Verabreichen von *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reductive* (HMG-CoA-Reduktasen)-Inhibitoren verringert die Inzidenz von AD (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000). Untersuchungen mit Tiermodellen führten zum gleichen Ergebnis. Fütterung von APP transgenen Mäusen und Hasen mit Cholesterol-angereichertem Futter verstärkt die A β -Ablagerung im Gehirn dieser Tiere (Simons et al., 2002). Folglich wird davon ausgegangen, dass im Blut der ApoE ϵ 4-Träger weniger Cholesterol gebunden wird, wodurch mehr Cholesterol als gewöhnlich im Organismus zirkuliert und die A β -Produktion letztlich anregt.

Weiterführende Studien demonstrierten, dass die Wirkung des Cholesterols mit den *lipid rafts* eng verbunden ist. Cholesterol ist in diesen Mikrodomänen angereichert, die als Standorte zur enzymatischen Prozessierung des APP durch β - und γ -Sekretasen dienen (Ehehalt et al., 2003;

Vetrivel et al., 2004). Der überwiegende Teil des APP, welcher sich auf *non-raft* Membranen befindet, wird von der α -Sekretase geschnitten (Kojro et al., 2001). Nur aus dem *raft*-assoziierten Teil des APP generieren β - und γ -Sekretasen das pathogene A β . Dabei ist die Palmitoylierung an den Cysteinresten für die Rekrutierung der β -Sekretase zu den *lipid rafts* essentiell (Thinakaran und Koo, 2008). Eine Depletion des Cholesterols inhibiert die β -Sekretase und reguliert gleichzeitig die Aktivität der α -Sekretase hoch, da der APP-Anteil auf den *lipid rafts* verkleinert wird (Simons et al., 2001; Kojro et al., 2001).

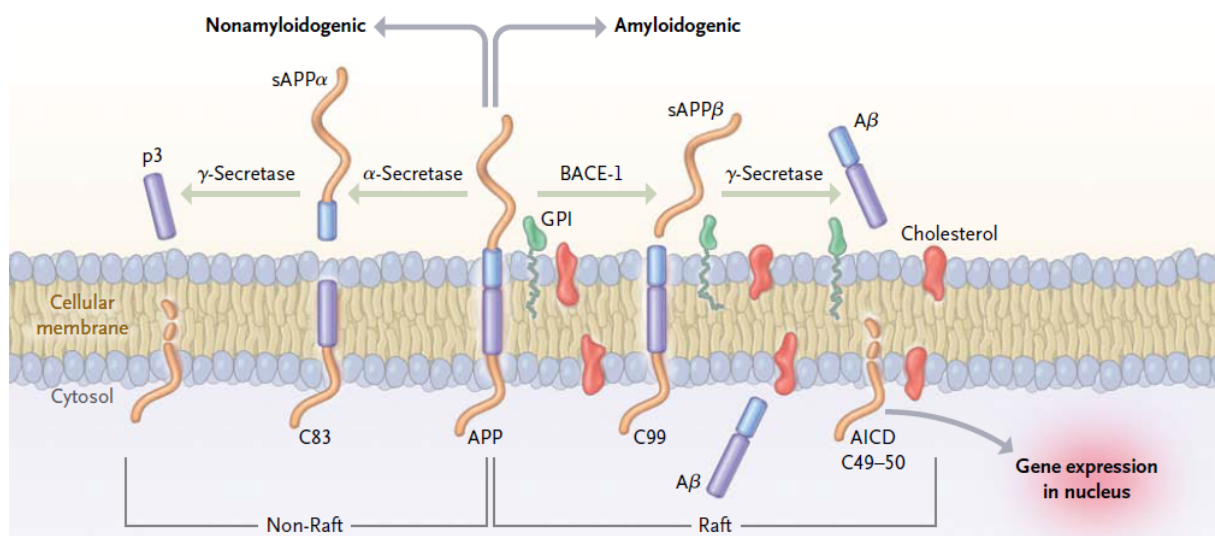


Abbildung 8: Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) in Abhängigkeit der *lipid rafts*

APP = Amyloid-Vorläuferprotein, AICD = APP intracellular domain, GPI = Glykosylphosphatidylinositol. (Abbildung stammt aus Querfurth und LaFerla, *New England Journal of Medicine*, 2010)

Neben ApoE und Cholesterin wurden auch Komponenten des Sphingomyelin-Metabolismus mit AD in Verbindung gebracht. Zu beachten gilt, dass klinische Studien des Sphingomyelin-Pathways in den meisten Fällen an *post mortem* Geweben durchgeführt wurden. Die Krankheitsstadien der eingeschlossenen Patienten variieren je nach Studie, sodass die Resultate stark voneinander abweichen. Zum Beispiel sind die Aussagen bezüglich der Veränderung des Sphingomyelinlevels in AD widersprüchlich. Die einzige Studie, die die Sphingomyelinmenge in allen Krankheitsstadien ermittelte, fand keinen Unterschied (Han et al., 2002). Aber übereinstimmend wurde eine höhere Ceramidmenge in AD-Patienten gemessen, sodass eine positive Korrelation zwischen ASM-Aktivität und A β in den gleichen Hirnregionen besteht (Han et al., 2002; Cutler et al., 2004; He et al., 2010; Filippov et al., 2012). Außerdem bestätigte eine weitere auf CSF basierende Untersuchung, dass AD-Patienten in der Tat mehr Ceramide generieren (Sato et al., 2005). Das menschliche Gehirn

wirkt dem jedoch entgegen, indem die Aktivität der sauren Ceramidase ebenfalls hochreguliert wird, um das überschüssige Ceramid abzubauen (Huang et al., 2004; He et al., 2010). Möglichweise übersteigt die Produktion den maximalen Abbaukapazitäten, wodurch ein Ungleichgewicht entsteht. Auch eine Verlagerung des Ceramidtransports ist denkbar, da die Ceramidmenge in AD-Gehirn und AD-CSF erhöht, im Blut aber verringert vorliegt (Mielke und Lyketsos, 2010). Der molekulare Nachweis oder Gegenbeweis dieser Hypothesen muss in künftigen Arbeiten erbracht werden.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die AD, die unter anderem durch extrazelluläre Ablagerungen des A β und chronische Inflammation im Gehirn gekennzeichnet wird, gilt derzeit als unheilbar. Gegenwärtige Behandlungsstrategien zielen vorwiegend auf (1) Verminderung der A β -Produktion, (2) Erhöhung der A β -Clearance, (3) Neutralisation der A β -Toxizität und (4) Verringerung der Neuroinflammation, um die Progression dieser Krankheit so weit möglich hinauszuzögern. Die Aktivität der ASM korreliert positiv mit der A β -Ablagerung in AD-Patienten, sodass eine Modulation dieses Enzyms therapeutische Relevanz in Aussicht stellt. In der vorliegenden Arbeit soll experimentell anhand von *in vitro* und *in vivo* Modellen Antworten auf folgende Fragestellungen gefunden werden:

1. Einfluss der ASM auf die A β -Produktion

- (a) Wird die Produktion des A β durch eine *asm*-Defizienz beeinträchtigt?
- (b) Falls ein Einfluss besteht, die Aktivität welcher Sekretase(n) wird verändert?
- (c) Wie erfolgt die Modulation der Sekretase(n)-Aktivität(en) durch ASM?
- (d) Ist das Resultat einer medikamentösen Inhibition der ASM mit *asm* ko vergleichbar?

2. Einfluss der ASM auf die Inflammation

Bekanntlich produzieren *asm*-defiziente Makrophagen vermehrt TNF- α infolge einer Stimulation durch LPS, indem die Aktivität von *TNF- α converting enzyme* (TACE, ADAM17) hochreguliert wird (Rozenova et al., 2010).

- (a) Ist dieser Effekt einzigartig oder haben weitere Stimulanzen ähnliche Auswirkungen?
- (b) Sind neben TNF- α noch weitere Zytokine und Chemokine betroffen?
- (c) Gibt es Unterschiede in der Aktivierung der *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs)?

3. Einfluss der ASM auf die A β -Clearance

- (a) Wird die A β -Phagozytose bei einer *asm*-Defizienz gesteigert oder gesenkt?
- (b) Akkumulieren *asm*-defiziente Makrophagen das phagozytierte A β , anstatt es abzubauen?

4. Einfluss der ASM auf die neuronale Integrität und synaptische Plastizität

- (a) Können kognitive Defizite in *asm*-defizienten AD-Modellmäusen eingeschränkt werden?
- (b) Kann der *asm* ko den Verlust neuronaler Markerproteine in AD-Modellmäusen aufhalten?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Herkunft
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Accu jet Pipettierhelfer	BrandTech Scientific (Essex, CT, USA)
Autoklav 3870 ELV	Systec (Wettenberg, Deutschland)
Autoklav V-150	Systec (Wettenberg, Deutschland)
Axiovert 25 invetiertes Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy (Jena, Deutschland)
Axiovert 40 CFL Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy (Jena, Deutschland)
Barnes Maze	Noldus Information Technology (Oberreifenberg, Deutschland)
Biofuge 13 Zentrifuge	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Biowizard KR-200 Sterilbank	Kojair Tech Oy (Vilppula, Finnland)
Bunsenbrenner	Camping Gaz (Hungen-Inheiden, Deutschland)
Eclipse TS100 invetiertes Mikroskop	Nikon Instruments (Melville, NY, USA)
Eclipse E600 Fluoreszenzmikroskop	Nikon Instruments (Melville, NY, USA)
Einkanalpipetten	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Einkanalpipetten Pipetman	Gilson (Middleton, WI, USA)
Einkanalpipetten Research	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eismaschine	Eurfrigor Ice Makers Srl (Lainate, Italien)
Elektrophoresekammer Midi horizontal	Neolab (Heidelberg, Deutschland)
FACSCanto II Durchflusszytometer	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Flüssigstickstoffbehälter	KGW-Isotherm (Karlsruhe, Deutschland)
Gefrierschrank Premium no frost	Liebherr (Lindau, Deutschland)
Gefrierschrank UF75-110 T	Colora (Frankfurt, Deutschland)
General Rotator STR4	Stuart Scientific (Staffordshire, UK)
HERAcell CO ₂ Inkubator	Heraeus (Hanau, Deutschland)
HERAcell 150i CO ₂ Inkubator	Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland)
HERASafe HS 12 Sicherheitswerkbank Klasse II	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Infinite M200 Fluoreszenzphotometer	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Inkubationsbad	GFL (Burgwedel, Deutschland)
Inkubationshaube TH-30	Edmund Bühler GmbH (Hechingen, Deutschland)
InoLab pH 720 pH-Messgerät	WTW (Weilheim, Deutschland)
Jouan B4i Zentrifuge	Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland)
Kühlbox KB 1001	Liebherr (Lindau, Deutschland)
Kühl- und Gefrierkombination KG39VVI30	Siemens (München, Deutschland)
Kühlschrank Premium	Liebherr (Lindau, Deutschland)
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Laboshake	Gerhardt Analytical Systems (Königswinter, Deutschland)
Mehrkanalpipette Research	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Gerät	Herkunft
Mikrowelle HF 26521	Siemens (München, Deutschland)
Mini-PROTEAN 3 Elektrophoresesystem	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Mini-PROTEAN Gelgießstand	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Mini-UV-Leuchttisch	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Morris Water Maze	Noldus Information Technology (Oberreifenberg, Deutschland)
Multipette Plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Nalgene Mr. Frosty Freezing Container	A. Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Optima LE-80K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Optima Max Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Perfection V700 Photoscanner	Epson (Meerbusch, Deutschland)
PowerPac 200 Power Supply	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Präzisionswaage 770	Kern & Sohn (Balingen, Deutschland)
Präzisionswaage CP 42023	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
PS250 Power Supply	Hybaid (Heidelberg, Deutschland)
PTC 200 DNA Engine Thermal Cycler	MJ Research (St. Bruno, Canada)
PURELAB Ultra Reinstwasseranlage	Elga (Celle, Deutschland)
Rocky 3D	Labortechnik Frübel (Lindau, Deutschland)
Savant SpeedVac DNA 110	Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland)
Schüttler SM-30	Edmund Bühler (Hechingen, Deutschland)
SmartSpec 3000 Spektralphotometer	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Sunrise Mikrotiterplattenlesegerät	Tecan (Männedorf, Schweiz)
SW41 Ti Rotor Package, Swinging Bucket	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Thermoblock TDB-120	BioSan (Riga, Lettland)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tiefkühlschrank Forma 900 Series	Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland)
Tiefkühlschrank V.I.P. Series -86 °C Freezer	Sanyo (Wood Dale, IL, USA)
Tischkühlzentrifuge 4K10	Sigma Laborzentrifugen (Osterode am Harz, Deutschland)
Tischkühlzentrifuge 4K15C	Sigma Laborzentrifugen (Osterode am Harz, Deutschland)
TLA-55 Rotor Package, Fixed Angle	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Transsonic T780	Elma (Singen, Deutschland)
Trockenschrank	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Ultrospec 3100 pro Spektralphotometer	Amersham Biosciences (München, Deutschland)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Vortex Shaker REAX 2000	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Wärmeschrank Kelvitron t	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Wasserbad	Köttermann (Hänigsen, Deutschland)
XCell SureLock Mini-Cell Elektrophoresesystem	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Herkunft
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Bechergläser aller Art	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Biosphere Filter Tips (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Blaubrand-Zählkammer (Neubauer)	Brand (Wertheim, Deutschland)
Blotting Paper Grade GB003	Whatman (Dassel, Deutschland)
Combitips Plus (5 ml, 10 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
CryoPure Röhren 1,8 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Dounce Homogenisator 1 ml	Wheaton (Millville, NJ, USA)
Erlenmeyerkolben aller Art	Schott (Mainz, Deutschland)
Falcon Multiwell Zellkulturplatten aller Art	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Falcon Round bottom test tubes 5 ml	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Filtropur Flaschenaufsätze	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Filtropur Spritzenfilter	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Gewebekulturschalen 100x20 mm	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Gewebekulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Glasflaschen aller Art	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Handschuhe Latex	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Handschuhe Nitril	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Injekt Solo Spritzen aller Art	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Küvetten aus Polystyrol	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Microlance Einmalkanülen aller Art	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Mikrolon 600 96-Well Mikroplatte	Greiner Bio-One (Frickhausen, Deutschland)
Mikroskopische Deckgläser 12x12 mm	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Mikrotestplatte 96-Well	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Mini-PROTEAN 3 Short Plates	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Mini-PROTEAN 3 Spacer Plates 1,5 mm	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Mini-PROTEAN Käbme (15 Wells, 1,5 mm)	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Nunc MaxiSorp 96-Well Platte, schwarz	Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland)
Objektträger	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Objektträger-Kasten	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
Parafilm M Verschlussfolie	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, IL, USA)
Pasteurpipetten	VWR (Darmstadt, Deutschland)
PCR Soft Tube 0,2 ml	Biozym Scientific (Oldendorf, Deutschland)
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Polyallomer Tube, 1,5 ml, Snap-On Cap	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Präzisionswischtücher Kimtech Science	Kimberly-Clark (Koblenz, Deutschland)
Pro-Gel 10-20% Tris-Tricin-Gel	Anamed Elektrophorese (Groß-Bieberau/Rodau, Deutschland)
Protran Nitrozellulose Transfermembran 0,2 µm	Whatman (Dassel, Deutschland)
PVDF Western Blotting Membranes	Roche (Mannheim, Deutschland)
Safe-Lock Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Verbrauchsmaterial	Herkunft
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Skalpellklingen	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Standzylinder aller Art	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Ultra-Clear Tubes, 13,2 ml	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
UV Quartzküvette 10 mm	Hellma (Müllheim, Deutschland)
Zellschaber	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zentrifugentubes (15 ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Herkunft
0,05% Trypsin/EDTA (1x)	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (HFIP)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
β -Sekretase Substrat IV, Fluorogenic	Merck (Darmstadt, Deutschland)
γ -Sekretase Substrat, Fluorogenic	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Agarose	Biozym (Oldendorf, Deutschland)
Amitriptylinhydrochlorid	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ampicillin	MP Biomedicals (Eschwege, Deutschland)
Antibiotikum-Antimycotikum 100x	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Borat	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Bromphenolblau	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
C16 Ceramide	Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland)
Chapso	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Chloroform	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
DNA Ladder (100 bp, 1 kb)	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
dNTP Mix	Roche (Mannheim, Deutschland)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ethidiumbromid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Fetal Calf Serum (FCS)	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
FITC-A β 42	Bachem (Bubendorf, Schweiz)
Geneticin (G418)	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerin	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Guanidinhydrochlorid	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Chemikalie	Herkunft
H ₂ SO ₄	Fluka (Buchs, Schweiz)
Ham's F12 Medium	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Hexamer Random Primer	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Hygromycin B	Pan-Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Isofluran	Baxter (Unterschleißheim, Deutschland)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
KHCO ₃	Merck (Darmstadt, Deutschland)
KCl	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kanamycin	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
LB Agar	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
LB Broth	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Lipopolysaccharide (LPS)	Axxora (Lörrach, Deutschland)
Lysenin	PeptaNova (Sandhausen, Deutschland)
MgCl ₂	Fluka (Buchs, Schweiz)
MgSO ₄	Fluka (Buchs, Schweiz)
Magermilchpulver	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Methanol	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
NaCl	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaF	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Na ₄ P ₂ O ₇	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Na ₃ VO ₄	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
NH ₄ Cl	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Okadasäure	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Orange G	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Opti-MEM	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Pam3CSK4	Invivogen (San Diego, CA, USA)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Polyethylenglycol (PEG) 4000	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Proteaseinhibitor Cocktail	Roche (Mannheim, Deutschland)
Rotiphorese Gellösung 30	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
RPMI 1640	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Sucrose	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Tricin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tris	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Triton X-100	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Chemikalie	Herkunft
TRIzol	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Tween 20	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Western Lightning ECL Substrat	Perkin Elmer (Rodgau, Deutschland)
Xylencyanol	Molekula (München, Deutschland)

2.1.4 Kits

Bezeichnung	Herkunft
A β 40 Human ELISA Kit	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
A β 42 Human ELISA Kit	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
DyNAmo TM Flash SYBR Green qPCR Kit	Thermo Scientific (Bonn, Deutschland)
Endo Free Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Mouse TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience (San Diego, CA, USA)
Mouse CCL2 (MCP-1) ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience (San Diego, CA, USA)
OptEIA TM Human TNF ELISA Set	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
OptEIA TM TMB Substrate Reagent Set	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RQ1 RNase-free DNase	Promega (Mannheim, Deutschland)
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
T4 Ligase	Roche (Mannheim, Deutschland)
TaKaRa LA Taq DNA-Polymerase	Clontech (Heidelberg, Deutschland)

2.1.5 Enzyme

Die bei der molekularen Klonierung verwendete T4-DNA-Ligase wurde von Roche (Mannheim, Deutschland) bezogen. Restriktionsendonukleasen stammten von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) und die TaKaRa LA Taq[®] Polymerase von Clontech (Heidelberg, Deutschland).

2.1.6 Plasmide

Das Plasmid pCEP4 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) wurde dazu verwendet, stabile *asm knock down* Zelllinien zu generieren. pCEP4-transformierte Bakterien wurden mit Ampicillin und pCEP4-transfizierte Zellen mit Hygromycin B selektioniert.

Das Plasmid pEYFP-N1 (Clontech, Heidelberg, Deutschland) wurde dazu verwendet, SH-SY5Y Zellen mit stabiler Überexpression von humanem APP695 zu generieren. pEYFP-N1-

transformierte Bakterien wurden mit Kanamycin und pEYFP-N1-transfizierte Zellen mit G418 selektioniert.

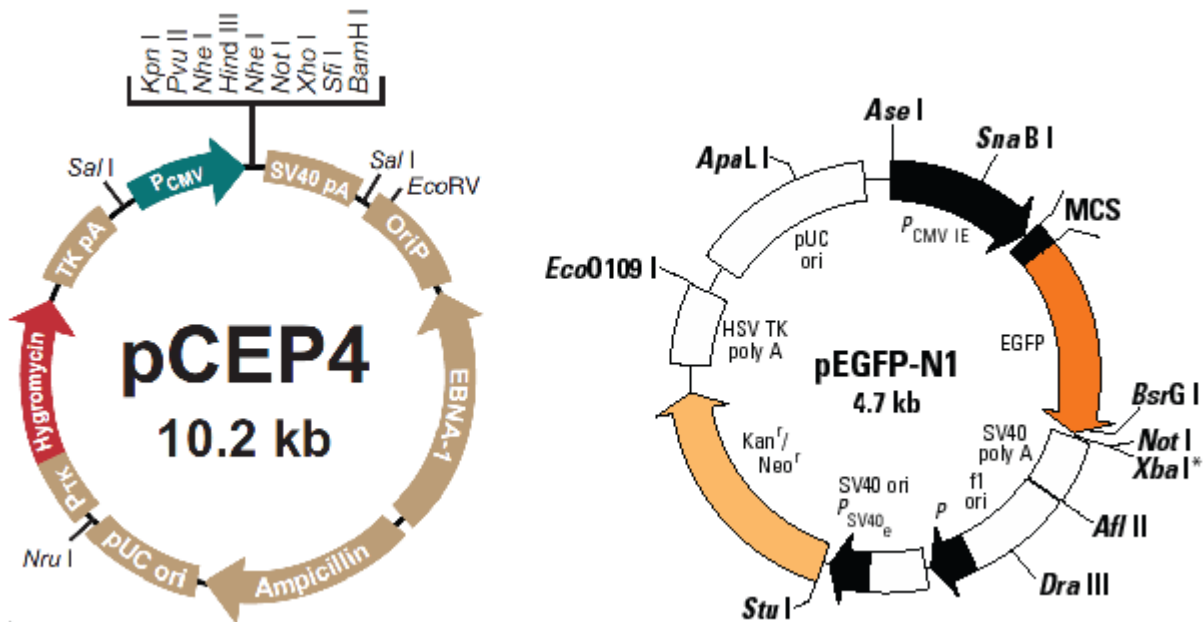


Abbildung 9: Plasmide pCEP4 und pEFP-N1

Das Plasmid pCEP4 wurde dazu verwendet, um stabile *asm knock down* Zelllinien herzustellen. Das Plasmid pEYFP-N1 diente zur Klonierung der humanen *app695* Sequenz zwecks Überexpression in SH-SY5Y Zellen.

2.1.7 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Tabelle 1: Oligonukleotide und Sequenzierungsprimer für human *ASM knock down*

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
hSMPD1 oligo 1	TGCTGTTCCACGGACGATAAGTACCTGTTTTGGCCACTGAC TGACAGGTACTTCGTCCGTGGAA
hSMPD1 oligo 2	CCTGTTCCACGGACGAAGTACCTGTCAGTCAGTGGCCAAAA CAGGTACTTATCGTCCGTGGAAC
EmGFP seq primer	GGCATGGACGAGCTGTACAAG

Tabelle 2: Primer für die Klonierung und Sequenzierung der humanen APP695-Sequenz in pEYFP-N1

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
hAPP695 Primer for	GGGAAGCTTCCCACCATGCTGCCCCGTTTGG
hAPP695 Primer rev	ATAAGAATGCTTCCGCTACTAGTTCTGCATCTGC
SeqhAPP	ATGTCGTAACAACCTCCGC

Tabelle 3: Primerpaare für die Real-Time-quantitative-PCR mit SYBR® Green

Gen	Primer forward 5' - 3'	Primer reverse 5' - 3'
<i>mouse aph1-α</i>	CCAGTATGGCCTCCTGATTT	TGATGCTAAGCCCTCATCTG
<i>mouse aph1-β</i>	TTGGTGTCTCTCCTGCTGTC	AGCCTGAACAGCTCTTGGAT
<i>mouse β-actin</i>	CCCTGAAGTACCCCATTGAAC	CCATGTCGTCCCAGTTGGTAA
<i>mouse basigin</i>	GGACCGTGTTACATCCAT	GAGTAAGGTGGTTGCGGTCT
<i>mouse gapdh</i>	ACAACCTTTGGCATTGTGGAA	GATGCACGGATGATGTTCTG
<i>mouse il-1β</i>	GAAGAAGAGCCCATCCTCTG	TCATCTCGGAGCCTGTAGTG
<i>mouse il-6</i>	AGTCCGGAGAGGAGACTTCA	ATTCCACGATTCCCAGAG
<i>mouse il-10</i>	AGGCGCTGTCATCGATTTCTC	TGCTCCACTGCCTTGCTCTTA
<i>mouse inos</i>	ACCTTGTTACAGCTACGCCTT	CATTCCCAAATGTGCTTGTC
<i>mouse ccl-2</i>	AAGAGATCAGGGAGTTTGTCT	CTGCCTCCATCAACCACTTT
<i>mouse nicastrin</i>	GTACTGGCAGGATTGTGTGG	ATCTGATGAGTGGCGTTGAG
<i>mouse pen2</i>	GGTTCTTCAGAGAGGCGTTC	GATCACCCAGAAGAGGAAGC
<i>mouse ps1</i>	CTGGTTGAAACAGCTCAGGA	TTCTTGGGTACCCTCCTTTG
<i>mouse ps2</i>	ACGCTGTGTATGATCGTGGT	TGTTAAGCACGGAGTTGAGG
<i>mouse tnf-α</i>	ATGAGAAGTTCCCAAATGGC	CTCCACTTGGTGGTTTGCTA
<i>human asm1</i>	GTCTCCGCCTCSTCTCTCTC	GCACTTTGTCTCCTCGATCC
<i>human gapdh</i>	GAAGGACTCATGACCACAGT	GTCATCATATTTGGCAGGTT

2.1.8 Antikörper

Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Herkunft
<i>mouse monoclonal anti α-tubulin</i>	Abcam (Cambridge, UK)
<i>mouse monoclonal anti actin</i>	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
<i>rabbit polyclonal anti AKT</i>	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
<i>mouse monoclonal anti phospho-AKT</i>	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
<i>mouse monoclonal anti Amyloid β</i>	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
<i>rabbit polyclonal anti ASM</i>	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
<i>mouse monoclonal anti BACE</i>	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
<i>rabbit polyclonal anti Calnexin</i>	Abcam (Cambridge, UK)
<i>mouse monoclonal anti Ceramide</i>	Glycobiotech (Kükels, Deutschland)
<i>rat monoclonal anti CD14</i>	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
<i>rabbit polyclonal anti Flotillin 1</i>	Abcam (Cambridge, UK)
<i>rabbit polyclonal anti JNK</i>	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
<i>rabbit polyclonal anti phospho-JNK</i>	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
<i>rabbit monoclonal anti Lamp 1</i>	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
<i>rabbit anti Lysenin antiserum</i>	PeptaNova (Sandhausen, Deutschland)
<i>rabbit polyclonal anti Munc18-1</i>	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
<i>rabbit monoclonal anti Nicastrin</i>	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
<i>rabbit polyclonal anti p38 MAPK</i>	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
<i>rabbit polyclonal anti phospho-p38 MAPK</i>	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
<i>rabbit monoclonal anti p44/42</i>	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)

Antikörper	Herkunft
<i>rabbit polyclonal anti phospho-p44/42</i>	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
<i>rabbit monoclonal anti Presenilin 1</i>	Abcam (Cambridge, UK)
<i>mouse monoclonal anti PSD95</i>	Abcam (Cambridge, UK)
<i>rabbit polyclonal anti PSD95</i>	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
<i>rabbit polyclonal anti SNAP25</i>	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
<i>mouse monoclonal anti Synaptophysin</i>	Abcam (Cambridge, UK)
<i>rabbit polyclonal anti TLR 2</i>	Abcam (Cambridge, UK)
<i>goat anti mouse HRP Conjugate</i>	Dako (Hamburg, Deutschland)
<i>goat anti rabbit HRP Conjugate</i>	Promega (Mannheim, Deutschland)
<i>rabbit anti rat HRP Conjugate</i>	Dako (Hamburg, Deutschland)

2.1.9 Pufferlösungen

Tabelle 5: Zusammensetzung der Pufferlösungen

Pufferlösung	Chemikalie	Menge	Konzentration
10x PBS	NaCl	400 g	1,37 M
	KCl	10 g	27 mM
	Na ₂ HPO ₄	71 g	100 mM
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	69 g	100 mM
	dest. H ₂ O	auf 5 Liter auffüllen	
	auf pH 7,4 einstellen		
10x TBS	Tris	302,5 g	500 mM
	NaCl	425 g	1,45 M
	dest. H ₂ O	auf 5 Liter auffüllen	
	auf pH 7,4 einstellen		
5x DNA-Ladepuffer	Bromphenolblau	1 mg	0,1%
	Xylencyanol	2 mg	0,2%
	Orange G	2 mg	0,2%
	Sucrose	500 mg	50%
	0,5 M EDTA [pH 8,0]	2 µl	1 mM
	dest. H ₂ O	auf 1 ml auffüllen	
5x TBE	Tris	270 g	446 mM
	Borat	137,5 g	446 mM
	0,5 M EDTA [pH 8,0]	100 ml	10 mM
	dest. H ₂ O	auf 5 Liter auffüllen	
3x SDS-Page Ladepuffer	1 M Tris/HCl [pH 6,8]	187,5 µl	187,5 mM
	20% SDS	300 µl	6%
	Glycerin	300 µl	30%
	β-Mercaptoethanol	150 µl	15%
	3% Bromphenolblau (w/v)	10 µl	0,03%
	dest. H ₂ O	auf 1 ml auffüllen	

Pufferlösung	Chemikalie	Menge	Konzentration
10x SDS-Tris-Glycin Laufpuffer	Tris	151,5 g	250 mM
	Glycin	720,5 g	1,92 M
	SDS	50 g	1% (w/v)
	dest. H ₂ O	auf 5 Liter auffüllen	
10x SDS-Tris-Tricin Laufpuffer	Tris	121 g	1 M
	Tricin	171 g	1 M
	SDS	10 g	1% (w/v)
	dest. H ₂ O	auf 1 Liter auffüllen	
10x Transferpuffer	Tris	30 g	248 mM
	Glycin	138 g	1,84 M
	dest. H ₂ O	auf 1 Liter auffüllen	
beim Gebrauch 100 ml 10x Transferpuffer mit 200 ml Methanol und 700 ml dest. H ₂ O mischen			
SDS-Zellysepuffer	1 M Tris/HCl [pH 7,5]	2,5 ml	50 mM
	0,5 M EDTA [pH 8,0]	200 µl	2 mM
	0,5 M EGTA [pH 8,0]	200 µl	2 mM
	Proteaseinhibitor (Roche)	1 Tablette	1x
	20 µM Okadasäure	125 µl	50 mM
	0,25 M Na ₄ P ₂ O ₇	1 ml	5 mM
	1 M Na ₃ VO ₄	100 µl	100 µM
	1 M DTT	50 µl	1 mM
	1 M NaF	2,5 ml	50 mM
	20% SDS	5 ml	2%
	dest. H ₂ O	auf 50 ml auffüllen	

2.1.10 Bakterielle Kulturmedien und Selektionsantibiotika

Bakterien wurden in Luria Bertani (LB) -Medium bzw. auf LB-Agarplatten gezüchtet. Die ursprüngliche Rezeptur wurde 1951 von Giuseppe Bertani formuliert. Heute gebräuchliche Zusammensetzungen enthalten Trypton (10 g/l), Hefeextrakt (5 g/l) und NaCl (0,5 - 10 g/l). Der pH-Wert beträgt 7.

Als Flüssignährmedium wurden 20 g LB Broth Pulver (Sigma Aldrich) in 1 l ddH₂O gelöst und 20 min bei 121 °C sterilisiert. Selektionsantibiotika wurden nach Abkühlen der Flüssigkeit hinzugefügt. Um LB-Agarplatten herzustellen, wurden 35 g LB-Agarpulver (Sigma Aldrich) in 1 l ddH₂O gelöst und 20 min bei 121 °C sterilisiert. Die Suspension wurde auf 60 °C abgekühlt und Selektionsantibiotika hinzugefügt. Eine LB-Agarplatte enthielt ca. 20 ml LB-Agar und wurde bei 4 °C für eine Maximaldauer von 3 Monaten gelagert. Als Arbeitskonzentrationen wurden 100 mg/l für Ampicillin und 50 mg/l für Kanamycin gewählt.

2.1.11 Bakterien

E. coli DH5 α TM (Genotyp: F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ -) wurde von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) bezogen und dazu verwendet, um Vektoren zu amplifizieren.

2.1.12 Zelllinien

Drei Zelllinien wurden für die vorliegende Arbeit verwendet: SH-SY5Y, THP-1 und L-929. Bei den SH-SY5Y Zellen handelt es sich um eine adhärenente humane Zelllinie, die ursprünglich aus dem Neuroblastoma eines vierjährigen Mädchen isoliert, vierfach subkloniert und 1978 erstmals beschrieben wurde. THP-1 ist eine humane Suspensionszelllinie, die aus der Monozytenleukämie eines einjährigen Jungen stammte. L-929 ist eine adhärenente murine Fibroblastenzelllinie, die ursprünglich aus dem Bindegewebe einer männlichen C3H-Maus etabliert wurde. Sämtliche Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland) bezogen.

2.1.13 Mäuse

Zwei Alzheimer-Mausmodelle wurden für dieses Projekt verwendet: (1) TgCRND8 Mäuse, freundlicherweise bereitgestellt vom Prof. Dr. David Westaway (Centre for prions and protein folding diseases, University of Alberta, Edmonton, Kanada) und (2) APP/PS1-21 Mäuse, freundlicherweise bereitgestellt vom Prof. Dr. Mathias Jucker (Abteilung für Zellbiologie neurologischer Erkrankungen, Hertie-Institut für Klinische Hirnforschung, Universität Tübingen, Deutschland).

TgCRND8 ist eine human APP695 cDNA transgene Mauslinie. Die humane APP695 cDNA enthält sowohl die Schwedische (KM670/671NL) als auch die Indiana-Mutation (V717F) und obliegt der Kontrolle des Goldhamster Prion-Promotors. Diese Mauslinie, ein Hybrid aus C3H und C57BL/6, zeichnet sich durch Bildung von amyloiden Plaques ab einem Alter von 3 Monaten aus, wobei gewöhnlich mehr A β 42 als A β 40 gebildet werden. Allerdings beträgt die Überlebensrate dieser Tiere bei einem Alter von 3 Monaten lediglich 50% (Chishti et al., 2001).

Das andere Alzheimer-Mausmodell APP/PS1-21 ist eine neuartige Variante des APP/PS1, die die humane APP695 cDNA mit Schwedischer Mutation und mutiertes Presenilin 1 (L166P)

unter der Kontrolle des Neuronen spezifischen Thy1-Promotors coexprimiert. Diese Mauslinie mit C57BL/6J Hintergrund bildet amyloide Ablagerungen ab einem Alter von 2 Monaten. Das Verhältnis A β 42:A β 40 liegt altersabhängig zwischen 1,5-5 (Radde et al., 2006). *Asm knock out (asm ko)* Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Erich Gulbins (Institut für Molekularbiologie, Zentrum für medizinische Biotechnologie, Universitätsklinikum Essen) bereitgestellt. Um die Auswirkungen des *asm ko* im Alzheimer-Mausmodell zu untersuchen, wurde die Linie *asm ko* mit TgCRND8 und APP/PS1-21 gekreuzt. Der Phänotyp der Tiere aus beiden Kreuzungen wurde bei einem Alter von 6 Monaten analysiert.

Das zur Behandlung von Depression und Schmerzen eingesetzte Amitriptylin aus der Gruppe der trizyklischen Antidepressiva inhibiert die Aktivität der ASM und beschleunigt gleichzeitig den Abbau dieses Proteins (Teichgräber et al., 2008). Um die Auswirkungen des Amitriptylins mit Mäusen aus den oben genannten Kreuzungen zu vergleichen, wurden 3 Monate alte TgCRND8 Tiere mit 100 mg/l Amitriptylin im Trinkwasser für eine Dauer von 3 Monaten behandelt.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

SH-SY5Y und THP-1 Zellen wurden in 75 cm² und 175 cm² Gewebekulturflaschen aus Polystyrol mit rotem Schnellverschluss-Schraubkappe und Belüftungskappe gezüchtet. Während SH-SY5Y Zellen mit DMEM+10% FCS kultiviert wurden, proliferierten THP-1 und L-929 Zellen in RPMI 1640+10% FCS am besten. Eine Mischung aus Antibiotika-Antimykotika, die neben Streptomycin und Penicillin auch Amphotericin B enthielt, wurde zum Kulturmedium zugefügt, um bakterielle und fungale Kontaminationen zu vermeiden. Die Kultivierung fand bei 37 °C und 5% CO₂ statt. Zur Ermittlung der Effekte des Amitriptylins auf zellulärer Basis wurde das Kulturmedium von SH-SY5Y Zellen für 24 h mit Vehikel, 1 μ M und 10 μ M Amitriptylin supplementiert.

2.2.2 Herstellung von Zelllysaten

Um Zelllysate aus SH-SY5Y oder THP-1 herzustellen, wurden die Zellen aus Kulturflaschen bei 300 xg, 8 min, 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml DMEM+10% FCS oder 1 ml RPMI 1640+10% FCS resuspendiert und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer

bestimmt. 2 Mio. Zellen wurden erneut zentrifugiert, das Pellet in 100 µl TBS+1% Triton X-100+1x Proteaseinhibitor Cocktail gelöst und 30 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurde unlösliches Zellmaterial durch Zentrifugation bei 5000 xg, 10 min, 4 °C pelletiert und der Überstand mit den darin enthaltenen löslichen Proteinen auf ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Zellysate wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Konstruktion von Vektoren

Bei der vorliegenden Arbeit wurden die Konstrukte pCEP4-*asm* miRNA-EmGFP zur *knock down* der sauren Sphingomyelinase (ASM) und pEYFP-N1-hAPP695 zur Überexpression des humanen Amyloid-Vorläuferproteins (APP, Splicevariante 695 Aminosäuren) für die Transfektion in humane Zelllinien verwendet.

Das Konstrukt pCEP4-*asm* miRNA-EmGFP mit dem dazugehörigen Kontrollvektor wurde von Dr. Wenlin Hao (Neurologie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland) gefertigt und freundlicherweise bereitgestellt. In den folgenden Abschnitten wird die Klonierung des Konstruktes pEYFP-N1-hAPP695 erläutert, welche die Arbeitsschritte Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Gelextraktion, enzymatischer Verdau, Ligation, Transformation, Verifikation und Plasmidvervielfältigung einschließt.

2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifikation der humanen APP695-Sequenz wurde das Plasmid pcDNA3-hAPP695-YFP5 als Vorlage eingesetzt. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit der TaKaRa LA Taq[®] DNA-Polymerase durchgeführt, die eine thermostabile DNA-Polymerase mit 3' zu 5' Exonukleaseaktivität (*proofreading* Funktion) darstellt. Ein Reaktionsmix mit einem Volumen von 50 µl setzte sich wie folgt zusammen:

Komponenten	Menge	Endkonzentrationen
TaKaRa LA Taq DNA-Polymerase (1 Unit/µl)	0,5 µl	0,5 Unit
dNTP Mix (10 mM)	2 µl	400 µM
10x LA PCR Puffer	5 µl	1x
cDNA Vorlage	1 µl	200 ng
hAPP695 Primer for (10 µM)	1 µl	0,2 µM
hAPP695 Primer rev (10 µM)	1 µl	0,2 µM
bidest. Wasser	39,5 µl	-

Das PCR-Programm beinhaltete folgende Schritte:

Schritt	Wirkung	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Initial-Denaturierung	94 °C	1 min	1
2	Denaturierung	98 °C	10 s	45
	Annealing	58 °C	30 s	
	Elongation	72 °C	3 min	
3	Finale Elongation	72 °C	10 min	1

Nach der Amplifikation wurde der Reaktionsmix in einem 0,8% Agarose-Gel mit Ethidiumbromid (500 µg/ml) bei 100 V aufgetrennt. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der sich in Nukleinsäuren interkaliert, so dass diese unter UV-Anregung visualisiert werden. Das hAPP695-Amplifikat hatte eine Größe von ~2000 bp. Die entsprechende Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein bereits gewogenes Reaktionsgefäß transferiert.

2.2.3.2 Gelextraktion

Die Gelextraktion wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 16,100 xg, 1 min, 4 °C vollzogen. Nachdem das Gewicht des Gelstücks durch Wiegen abgeschätzt wurde, wurden 3 Volumen QG Puffer zu einem Volumen Gelstück (100 mg ~ 100 µl) hinzugefügt und bei 50 °C für 10 min inkubiert, sodass sich das Gelstück komplett löste. Das Reaktionsgefäß wurde zwischendurch geschüttelt, um den Lösevorgang zu beschleunigen. Die gelöste DNA wurde durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol gefällt, auf ein QIAquick Spin Column geladen und zentrifugiert, um die DNA an die Säule zu binden. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen, 500 µl QG Puffer auf die Säule geladen und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Um die Säule mit der gebundenen DNA zu waschen, wurde 750 µl PE Puffer auf die Säule pipettiert und wieder zentrifugiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt, um Rückstände des PE Puffers zu entfernen und die Membran der Säule vor der Elution zu trocknen. Die Säule wurde auf ein unbenutztes Reaktionsgefäß platziert, 50 µl bidest. Wasser zentral auf die Membran gegeben und 1 min bei RT inkubiert. Schließlich wurde die DNA durch Zentrifugation eluiert.

2.2.3.3 Enzymatischer Verdau

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA-Fragmente an spezifischen Erkennungsstellen. Für die Klonierung des pEYFP-N1-hAPP695-Konstruktes wurden sowohl das PCR-Amplifikat als auch der leere pEYFP-N1 Vektor mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und NotI geschnitten, wobei die Verdauvorgänge hintereinander stattfanden.

Dazu wurden 24 µl PCR-Amplifikat mit 3 µl 10x R Puffer (Fermentas) und 3 µl HindIII (10 Units/µl) vermischt und bei 37 °C für 12 h inkubiert. Für die Restriktion des Vektors wurden 10 µl (3 µg) des pEYFP-N1 Vektors mit 3 µl 10x R Puffer (Fermentas), 3 µl HindIII (10 Units/µl) und 14 µl bidest. Wasser vermischt und bei 37 °C für 12 h inkubiert. Nach dem enzymatischen Verdau wurden 20 µl bidest. Wasser zu den Schnittprodukten hinzugefügt, um das Volumen zu erhöhen. Dann wurde die DNA auf ein QIAquick Spin Säule geladen, mit 750 µl PE Puffer gewaschen und schließlich mit 24 µl bidest. Wasser eluiert.

Für den zweiten Verdauvorgang wurden 24 µl des HindIII geschnittenen PCR-Amplifikates oder des Vektors mit 3 µl 10x O Puffer (Fermentas) und 3 µl NotI (10 Units/µl) vermischt und bei 37 °C für 8 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Reaktionsmischungen in einem 0,8% Agarose-Gel bei 100 V aufgetrennt. Beim PCR-Amplifikat wurde eine ~2000 bp große Bande und beim Vektor eine ~4000 bp große Bande aus dem Gel geschnitten. Die DNA wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit wie im Abschnitt 2.2.3.2 wiedergewonnen und in 30 µl bidest. Wasser gelöst. Durch die Inkubationen mit den Restriktionsendonukleasen wurde die kodierende Sequenz für das *enhanced yellow fluorescence protein* (EYFP) des pEYFP-N1-Vektors entfernt.

2.2.3.4 Ligation von Vektor und Insert

Bevor die zweifach geschnittenen Vektor und Insert miteinander ligiert wurden, wurde die jeweilige DNA-Konzentration in einer UV Quartzküvette mit dem SmartSpec 3000 Spektralphotometer (Bio-Rad Laboratories) ermittelt. Ein Ligationsansatz mit 10 µl Volumen setzte sich wie folgt zusammen:

Komponenten	Menge	Endkonzentration
Vektor pEYFP-N1	0,5 µl	100 ng
Insert hAPP695	2,5 µl	100 ng
10x Ligase Puffer	1 µl	1x
T4 Ligase (1 Unit/µl)	1 µl	1 Unit
bidest. Wasser	5 µl	-

Die Ligation fand bei 4 °C über Nacht statt und die Ligase wurde vor der Transformation nicht inaktiviert. 5 µl des Ligationsansatzes wurde für die Transformation eingesetzt.

2.2.3.5 Herstellung kompetenter *E. coli*

Als Kompetenz wird die Fähigkeit eines Organismus, freie DNA-Fragmente aufzunehmen, bezeichnet. *E. coli* DH5α wurde für die Aufnahme von Plasmiden chemisch kompetent gemacht. Zunächst wurde ein Klon in 100 ml LB-Medium angeimpft und solange bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht wurde. Die Bakterien wurden bei 3000 xg, 5 min, 4 °C pelletiert und in 10 ml eiskalten Kompetenzlösung (10% Polyethylenglycol 4000, 5% DMSO, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 15% Glycerin in LB-Medium) resuspendiert. Danach wurden sie aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und später bei -80 °C dauerhaft gelagert. Für Transformationen wurden kompetente *E. coli* DH5α verwendet, die nicht länger als 2 Monate eingefroren wurden.

2.2.3.6 Transformation in *E. coli*

Für die Transformation mittels Hitzeschock wurden 100 µl kompetente *E. coli* DH5α mit 5 µl des Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden die Bakterien in einem Thermomixer comfort (Eppendorf) für 45 s bei 42 °C erwärmt und anschließend sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. 1 ml LB Medium wurde zu den transformierten Bakterien gegeben und eine 60 minütige Inkubation bei 37 °C gestartet, damit die Bakterien sich erholten und das Resistenzgen gegen Kanamycin exprimiert werden konnte. Durch die Zentrifugation bei 5000 xg, 3 min, 4 °C wurden die Bakterien pelletiert und 1 ml Überstand wurde entfernt. In der verbleibenden Flüssigkeit wurden sie resuspendiert, um auf LB Agarplatten mit 50 µg/ml Kanamycin plattiert zu werden. Die Platten wurden für 16 h bei 37 °C aufbewahrt, sodass sich bakterielle Kolonien deutlich ausbildeten.

2.2.3.7 Verifikation des einklonierten Inserts

Um positiv transformierte Bakterien von den Falschpositiven zu unterscheiden, wurde die Plasmid-DNA aus einzelnen Klonen isoliert und durch Inkubation mit den Restriktionsendonukleasen überprüft. 6 Klone wurden mit Pipettenspitzen gepickt und in jeweils 3 ml LB Medium+50 µg/ml Kanamycin angeimpft. Die Kulturen wurden für 16 h bei 200 rpm, 37 °C inkubiert, so dass sie am Ende trüb erschienen.

2 ml jeder Kultur wurden für die Isolation der Plasmid-DNA mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit benötigt. Zuerst wurden die Bakterien bei 10000 xg, 3 min, RT zentrifugiert und das resultierende Pellet in 250 µl P1 Puffer mit RNase A aufgenommen. Die Lyse wurde durch Zugabe von 250 µl P2 Puffer gestartet und betrug nicht länger als 5 min. 350 µl N3 Puffer wurde hinzugefügt und die Reaktionsgefäße mehrmals invertiert, um die Lyse zu stoppen. Das Lysat wurde bei 16,100 xg, 10 min, 4 °C zentrifugiert, um ungelöstes Material zu pelletieren. Danach wurde der Überstand auf QIAprep Spin Column übertragen und für 1 min bei 16,100 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Säule mit 750 µl PE Puffer gewaschen. Nachdem die restliche Waschlösung durch wiederholte Zentrifugation entfernt wurde, wurde die Plasmid-DNA mit 50 µl bidest. Wasser eluiert.

Für die Kontrollrestriktion wurden 3 µl Plasmid-DNA aus dem jeweiligen Klon mit 0,5 µl HindIII (10 Units/µl), 1 µl NotI (10 Units/µl), 1 µl 10x R Puffer (Fermentas) und 4,5 µl bidest Wasser gemischt und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden auf einem 1% Agarosegel bei 100 V aufgetrennt und auf einem UV Tisch betrachtet. Klone mit Plasmid-DNA, bei der ein ~2000 bp großes Restriktionsfragment vorhanden war, wurden als transformiert eingestuft.

Als zusätzliche Absicherung wurden Plasmide mit Insert korrekter Größe sequenziert, um mögliche Mutationen auszuschließen. Die Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab Sequence Laboratories (Göttingen, Deutschland) vorgenommen.

2.2.3.8 Plasmidvervielfältigung

Das EndoFree® Plasmid Maxi Kit wurde eingesetzt, um Plasmid-DNA in größerer Menge für die Transfektion aufzureinigen. Die Arbeitsschritte entsprechen im Wesentlichen dem gleichen Prinzip wie die Isolation der Plasmid-DNA mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit. Für einen Maxiprep wurden 100 ml LB-Medium+50 µg/ml Kanamycin mit einer Kolonie angeimpft und für 16 h bei 220 rpm, 37 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden bei 5000 xg, 10 min, 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. 10 ml P2 Puffer wurden hinzugefügt, 5x invertiert und bei RT für 5 min inkubiert, um die Lyse einzuleiten. Anschließend wurden 10 ml gekühlter P3 Puffer hinzugegeben und das Reaktionsgefäß erneut 5x invertiert. Das Lysat wurde in eine QIAfilter Kanüle geladen und für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Abdeckung des Abflusses entfernt, der Kolben in die QIAfilter Kanüle eingeführt und das Lysat in ein 50 ml Falcon filtriert. 2,5 ml ER Puffer wurden zum Lysat pipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Während dessen wurde eine QIAGEN-tip

500 Säule mit 10 ml QBT Puffer equilibriert. Nachdem die Säule mit dem filtrierten Lysat beladen wurde, wurde sie 2x mit 30 ml QC Puffer gewaschen und die DNA schließlich mit 15 ml QN Puffer eluiert. Zur Präzipitation der DNA wurden 10,5 ml Isopropanol hinzugefügt, gemischt und bei 16,100 xg, 30 min, 4 °C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und erneut bei 16,100 xg, 10 min, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 7 min getrocknet, bevor die DNA in 300 µl Endotoxin-freier TE Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert wurde.

2.2.4 Etablierung von Zelllinien durch stabile Transfektion

Die Transfektion stellt eine gängige Methode dar, um funktionale Analysen an einzelnen Molekülen, wie z. B. an einem Protein, in eukaryotischen Zellen durchzuführen. Das Ziel der Transfektion ist in den meisten Fällen entweder eine Überexpression oder eine Unterdrückung der Expression (*knock down*) eines Zielproteins. Während bei der stabilen Transfektion Plasmid-DNA langfristig in der Wirtszelle verbleibt, handelt es sich bei der transienten Transfektion in Form von siRNA (*short interference RNA*) oder shRNA (*short hairpin RNA*) um eine kurzzeitige Behandlung, bei der die eingebrachten DNA-Fragmente innerhalb von Tagen durch die Wirtszelle abgebaut werden und somit ihre Wirkung verlieren.

2.2.4.1 Stabile Transfektion mit Lipofectamine™ 2000

Bei dieser Arbeit wurden Plasmid-DNA mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 in SH-SY5Y oder THP-1 Zellen eingebracht. Lipofectamine enthält Lipide, die in wässriger Umgebung Liposomen bilden und die Plasmid-DNA einhüllen. Die Liposomen fusionieren mit der Plasmamembran der Zielzelle und geben deren Inhalt ins Zytoplasma frei.

Zur Transfektion von SH-SY5Y wurden 1 Mio. Zellen in DMEM+10% FCS auf 6-Well gesät. Am folgenden Tag wurde das Medium entfernt und durch 2 ml Opti-MEM®+10% FCS ohne Antibiotikum ersetzt. 10 µl Lipofectamine-Transfektionsreagenz wurden mit 240 µl Opti-MEM® vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Parallel wurden 5 µg Plasmid-DNA mit 250 µl Opti-MEM® verdünnt. Im Anschluss wurde das verdünnte Transfektionsreagenz mit der Plasmid-DNA vereinigt und bei RT 20 min inkubiert, damit sich Liposomen-DNA-Komplexe ausbilden. Schließlich wurde das Gemisch zu den Zellen gegeben und nach 24 h entfernt.

Die Transfektion von THP-1 wurde ähnlich durchgeführt. Am Vortag der Transfektion wurden 0,5 Mio. Zellen in 400 µl Opti-MEM[®]+10% FCS ohne Antibiotikum auf 24-Well gesät. 2 µl Transfektionsreagenz wurden mit 48 µl Opti-MEM[®] vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Parallel wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 50 µl Opti-MEM[®] verdünnt. Weitere Arbeitsschritte glichen denen der Transfektion von SH-SY5Y.

pCEP4 transfizierte Zellen wurden mit 500 µg/ml Hygromycin B für zwei Wochen selektioniert. pEYFP-N1 transfizierte Zellen wurden mit 500 µg/ml G418 für vier Wochen selektioniert. Die Beibehaltung der Transfektion wurde mit 250 µg/ml Hygromycin B oder G418 erzielt.

2.2.4.2 Nachweis des Transfektionserfolges

pCEP4-transfizierte Zellen exprimierten das EmGFP. Zum Nachweis der grünen Fluoreszenz wurden die SH-SY5Y und THP-1 Zellen auf Objektträger geladen und mit dem Nikon Eclipse E600 Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Neben der Fluoreszenzmikroskopie wurden *western blot* (Abschnitt 2.2.11) und Real-Time-quantitative-PCR (Abschnitt 2.2.14) als weitere Nachweismethoden eingesetzt.

pEYFP-N1-transfizierte SH-SY5Y überexprimierten humanes APP695 und Aβ. Um die Überexpression nachzuweisen, wurden 1 Mio. Wildtyp SH-SY5Y in DMEM+10% FCS oder 1 Mio. hAPP695-transfizierte SH-SY5Y in DMEM+10% FCS+250 µg/ml Hygromycin B auf 6-Well gesät und für 48 h bei 37 °C 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und durch 800 µl DMEM ohne FCS und ohne Antibiotikum ersetzt. 24 h später wurde der Überstand gesammelt und bei -80 °C eingefroren. Um zellinternes Aβ zu quantifizieren, wurden Zelllysate gemäß den Angaben im Abschnitt 2.2.2 angefertigt. Aβ-Konzentrationen im Überstand und Zelllysat wurden mit Hilfe von ELISA Kits bestimmt (Abschnitt 2.2.18). Zusätzlich wurde *western blot* angewandt, um die Überexpression von hAPP695 und Aβ zu überprüfen.

2.2.5 Isolation von Lysosomen

SH-SY5Y Zellen aus zwei 175 cm² Kulturflaschen in konfluentem Zustand wurden zweimal mit 20 ml sterilem PBS gewaschen. 10 ml 0,05% Trypsin-EDTA (1x) wurde zu den Zellen hinzugefügt und bei 37 °C 1 min inkubiert, bis die Zellen sich vom Flaschenboden ablösten. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion mit 10 ml PBS abgestoppt und die Zellen bei

300 xg, 8 min, 4 °C pelletiert. Danach wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 ml TBS+1x Proteaseinhibitor Cocktail resuspendiert und die Zellen in einem Wheaton Dounce Homogenisator (1 ml Volumen) mit 50 Stößen auf Eis aufgebrochen. Nachdem das Homogenat bei 1.000 xg, 10 min, 4 °C zentrifugiert wurde, wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und das Pellet mit den Zellkernen verworfen. Der postnukleäre Überstand wurde erneut bei 16.100 xg, 60 min, 4 °C zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand (S2) enthielt hauptsächlich zytosolische Proteine und wurde bei -80 °C eingefroren. Das Pellet wurde als *crude organelle fraction* (CO) bezeichnet.

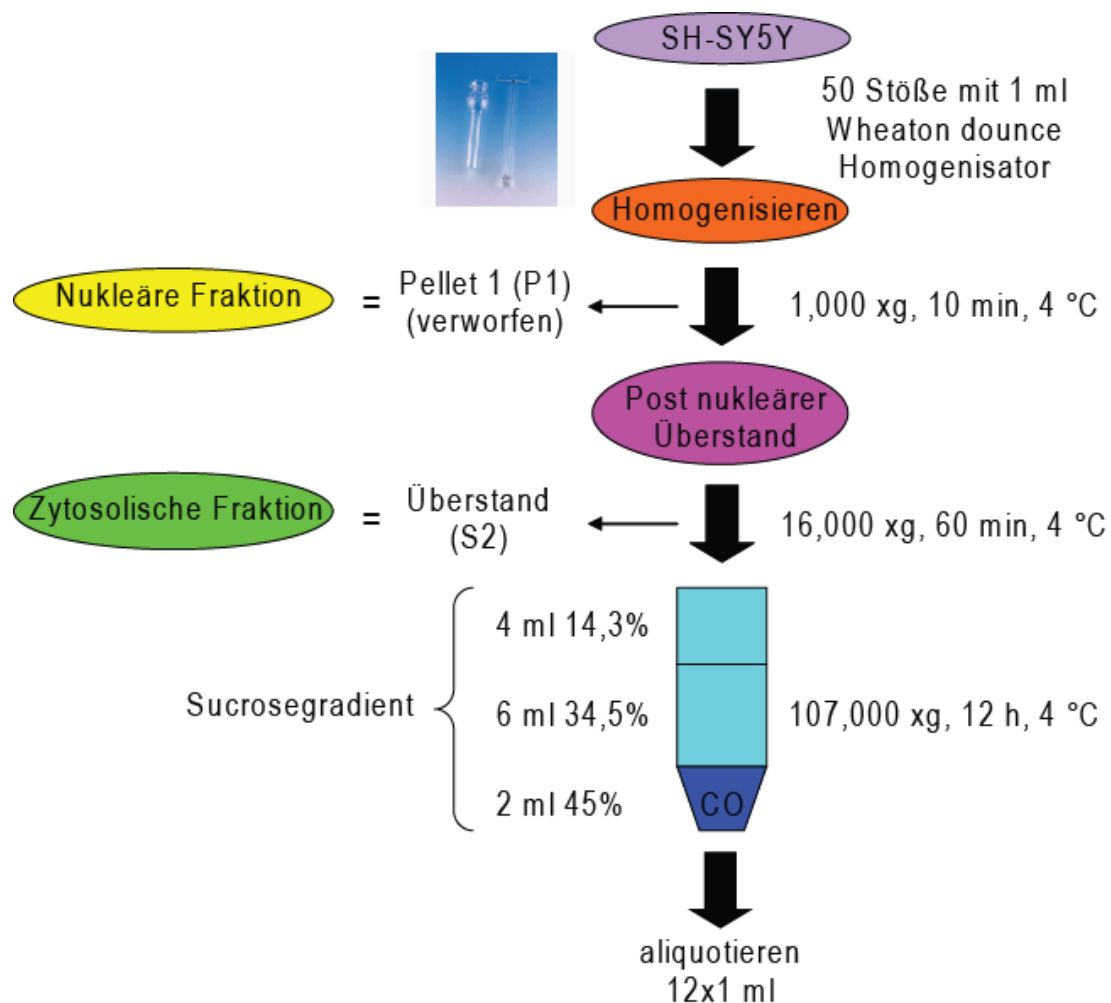


Abbildung 10: Schematischer Verlauf zur Isolation der Lysosomen aus SH-SY5Y Zellen

Um die Zellorganellen voneinander zu trennen, wurde das Pellet mit den Organellen mit 2 ml 45% TBS/Sucroselösung vermischt und auf dem Boden eines transparenten 13,2 ml Dünnwand-Ultrazentrifugentubes platziert. Darüber wurden sequenziell 6 ml 34,5% und 4 ml 14,3% TBS/Sucroselösung überschichtet. Die Dünnwand-Ultrazentrifugentubes mit den

jeweiligen Proben wurden in Titangefäße des SW 40 Ti Rotor Swinging Bucket Systems geladen, gewogen und austariert. Die darauf folgende Zentrifugation fand bei 107.000 xg, 12 h, 4 °C statt. Die Beschleunigung wurde auf *slow acceleration* und die Bremsleistung auf *no break* gesetzt, so dass die reelle Zentrifugationszeit 14,5 h betrug. Nach der Zentrifugation konzentrierte sich die Fraktionen in den zwei Interphasen und erschienen als schleierartige Gebilden. Beginnend von der Oberfläche der Suspension wurde das aufgetrennte Organellgemisch in 12 x 1 ml aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Überprüfung der Lysosomenisolation erfolgte mittels SDS-Page und *western blot*.

2.2.6 Isolation der Membranfraktion

Die Isolation der Membranfraktion aus SH-SY5Y Zellen und Mäusegehirnen wurde anhand eines publizierten Protokolls mit Veränderungen durchgeführt (Grimm et al., 2011). Für die Isolation aus Zellen wurden konfluente SH-SY5Y Zellen einer 175 cm² Kulturflasche zweimal mit 10 ml gekühlten PBS gewaschen. Zum Ablösen vom Gefäßboden wurden die Zellen mit 10 ml 0,05% Trypsin-EDTA (1x) bei 37 °C 1 min inkubiert. Nach dem Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit 10 ml PBS wurden diese bei 300 xg, 8 min, 4 °C pelletiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Sucrosepuffer (10 mM Tris/HCl [pH 7,4], 1 mM EDTA, 200 mM Sucrose) aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wurde zunächst 10x durch 24G Nadel und anschließend 10x durch 27G Nadel passiert. Um die nukleäre Fraktion zu entfernen, wurde das Homogenat bei 1.000 xg, 10 min, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein neues 1,5 ml Polyallomar-Reaktionsgefäß transferiert.

Um die Stabilität des γ -Sekretase Proteinkomplexes in den SH-SY5Y *knock down* Zellen zu testen, wurde bei der Isolation der Membran zusätzlich Triton X-100 in unterschiedlichen Konzentrationen (Vehikel, 0,03%, 0,1%, 0,3%, 1%, 2% und 3%) zum Sucrosepuffer hinzugefügt. Sonstige Arbeitsschritte glichen denen im oberen Abschnitt.

Für die Isolation aus Mäusegehirnen wurde 1 ml Sucrosepuffer zu der Hälfte einer Hemisphäre hinzugefügt. Zur Herstellung des Gehirnhomogenats wurde das Gewebe wie bei den SH-SY5Y Zellen zuerst 10x durch 24G Nadel und anschließend 10x durch 27G Nadel passiert. Die nukleäre Fraktion wurde bei 1.000 xg, 10 min, 4 °C pelletiert und der Überstand erneut bei 10.000 xg, 10 min, 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand auf ein neues 1,5 ml Polyallomar-Reaktionsgefäß transferiert.

Sämtliche Zell- und Mausproben wurden gewogen und tariert. Die Membranfraktion wurde mit Hilfe eines TLA-55 Rotors in einer OPTIMAX Ultrazentrifuge bei 186.000 xg, 75 min, 4 °C pelletiert und der geklärte Überstand verworfen. Bis zur Weiterverarbeitung wurde das Pellet bei -80 °C eingefroren.

2.2.7 β - und γ -Sekretasen Aktivität Assays

β - und γ -Sekretasen stellen entscheidende Enzyme zur Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins dar. Ihre Aktivitäten wurden mittels fluormetrischen Assays bestimmt, die auf die enzymatische Spaltung des jeweiligen Substrates zu einem fluoreszenten Produkt basieren.

Zur Überprüfung der Aktivität der β -Sekretase wurde das Pellet der Membranfraktion in 200 μ l (SH-SY5Y) oder 500 μ l (Mausgehirn) β -Sekretase Assay Puffer (100 mM Natriumacetat [pH 4,5]) gelöst. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bio-Rad Protein Assay bestimmt und bei allen Proben auf 200 μ g/ml angeglichen. Proteine der Membranfraktion wurde gemeinsam mit DMSO, β -Sekretase Assay Puffer und β -Sekretase Substrat auf eine schwarze Nunc Maxisorp 96-Well Platte aufgebracht (Tabelle 6). Die Kinetik der β -Sekretaseaktivität wurde auf einem Tecan Infinite M200 Fluoreszenzphotometer, bereitgestellt von AG Hannig (Institut für Zahnerhaltung, Universitätsklinik des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland), bei folgenden Parametern gemessen: Anregung = 350 nm (\pm 9 nm), Emission = 490 nm (\pm 20 nm), Verstärkung = 100, Temperatur = 37 °C, 73 Zyklen je 5 min. Vor jedem Messvorgang wurde die Platte 5 s orbital geschüttelt.

Zur Überprüfung der Aktivität der γ -Sekretase wurde das Pellet der Membranfraktion in 200 μ l (SH-SY5Y) oder 500 μ l (Mausgehirn) γ -Sekretase Assay Puffer (50 mM Tris/HCl [pH 6,8], 2 mM EDTA) gelöst. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bio-Rad Protein Assay bestimmt und bei allen Proben auf 1 mg/ml (SH-SY5Y) oder 2 mg/ml (Mausgehirn) angeglichen. Proteine der Membranfraktion wurde gemeinsam mit γ -Sekretase Assay Puffer und γ -Sekretase Substrat auf eine schwarze Nunc Maxisorp 96-Well Platte aufgebracht (Tabelle 6). Die Kinetik der γ -Sekretaseaktivität wurde auf einem Tecan Infinite M200 Fluoreszenzphotometer bei folgenden Parametern gemessen: Anregung = 355 nm (\pm 9 nm), Emission = 440 nm (\pm 20 nm), Verstärkung = 100, Temperatur = 37 °C, 73 Zyklen je 5 min. Vor jedem Messvorgang wurde die Platte 5 s orbital geschüttelt.

Von jeder Probe wurden Triplikate angefertigt. Bei der Auswertung der Daten wurde der Messwert des ersten Zyklus als Hintergrund betrachtet und von allen nachfolgenden Messwerten subtrahiert.

Tabelle 6: Auftragsschema für β - und γ -Sekretase Assay

	β -Sekretase Assay		γ -Sekretase Assay	
	Menge	Endkonzentration	Menge	Endkonzentration
Proteinsuspension	62,5 μ l	100 μ g/ml	62,5 μ l	0,5 mg/ml (SH-SY5Y) 1 mg/ml (Mausgehirn)
Assay Puffer	40 μ l	-	52,5 μ l	-
DMSO	12,5 μ l	10%	-	-
Substrat	10 μ l	8 μ M	10 μ l	8 μ M

2.2.8 Isolation der *lipid rafts*

Detergentien resistente Domänen der Membran, die reich an Sphingolipide und Cholesterin sind, werden als *lipid rafts* bezeichnet. Sie stellen eine Art Plattform für zelluläre Signal- und Transportprozesse dar. In dieser Arbeit wurden *lipid rafts* aus THP-1 Zellen sowie Mäusegehirnen unter Zuhilfenahme der Detergentien Triton X-100 und Chapso isoliert.

Zur Isolation der *lipid rafts* aus 40 Mio. THP-1 Zellen wurden diese bei 300 xg, 8 min, 4 °C pelletiert und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 ml TBS/Triton X-100 Isolationspuffer (TBS [pH8,0], 1% Triton X-100, 1x Proteaseinhibitor Cocktail, 1 mM PMSF, 5 mM NaF und 1 mM Na₃VO₄) für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Homogenat bei 1.000 xg, 10 min, 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der postnukleäre Überstand wurde bei -80 °C gelagert oder direkt für die Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation genutzt.

Zur Isolation der *lipid rafts* aus Mäusegehirnen wurde die Wirkung von zwei verschiedenen, mit Detergentien versetzten Puffern miteinander verglichen: (1) TBS/Triton X-100 Isolationspuffer (TBS [pH8,0], 1% Triton X-100, 1x Proteaseinhibitor Cocktail, 1 mM PMSF, 5 mM NaF und 1 mM Na₃VO₄); (2) MBS/Chapso Isolationspuffer (25 mM MES [pH6,5], 150 mM NaCl, 1% Chapso, 0,5 mM PMSF, 1x Proteaseinhibitor Cocktail). Dazu wurde eine Hemisphäre mit 1 ml Isolationspuffer versetzt, 20x durch eine 24G Nadel passiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde dreimal in Folge bei 1.000 xg, 10 min, 4 °C zentrifugiert, um sämtliche Rückstände der Kernfraktion zu entfernen. Der postnukleäre Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und wurde bei -80 °C gelagert oder direkt für die Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation verwendet.

Für die Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation wurde 1 ml des postnukleären Überstandes aus THP-1 Zellen oder Mäusegehirnen mit 1 ml 84% TBS/Sucroselösung oder MBS/Sucroselösung gleichmäßig vermischt und auf dem Boden eines transparenten 13,2 ml Dünnwand-Ultrazentrifugentubes platziert. Zur Erzeugung eines diskontinuierlichen Gradienten wurden 6 ml 35% und 4 ml 5% TBS/Sucroselösung oder MBS/Sucroselösung überschichtet. Die Ultrazentrifugentubes wurden auf das SW 40 Ti Rotor Swinging Bucket System geladen, gewogen und tariert. Das *floating* der *lipid rafts* erfolgte bei 250.000 xg, 18 h, 4 °C. Die Beschleunigung wurde auf *slow acceleration* und die Bremsleistung auf *no break* eingestellt. Als Folge der Zentrifugation ist eine wolkige Interphase, welche die *lipid rafts* enthielt, im oberen Drittel des Tubes deutlich sichtbar. Beginnend von der Oberfläche wurde das aufgetrennte Gemisch in 12 x 1 ml aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Bestätigung der erfolgreichen Trennung der *lipid rafts* von den restlichen Membranbestandteilen erfolgte über SDS-Page und *western blot*.

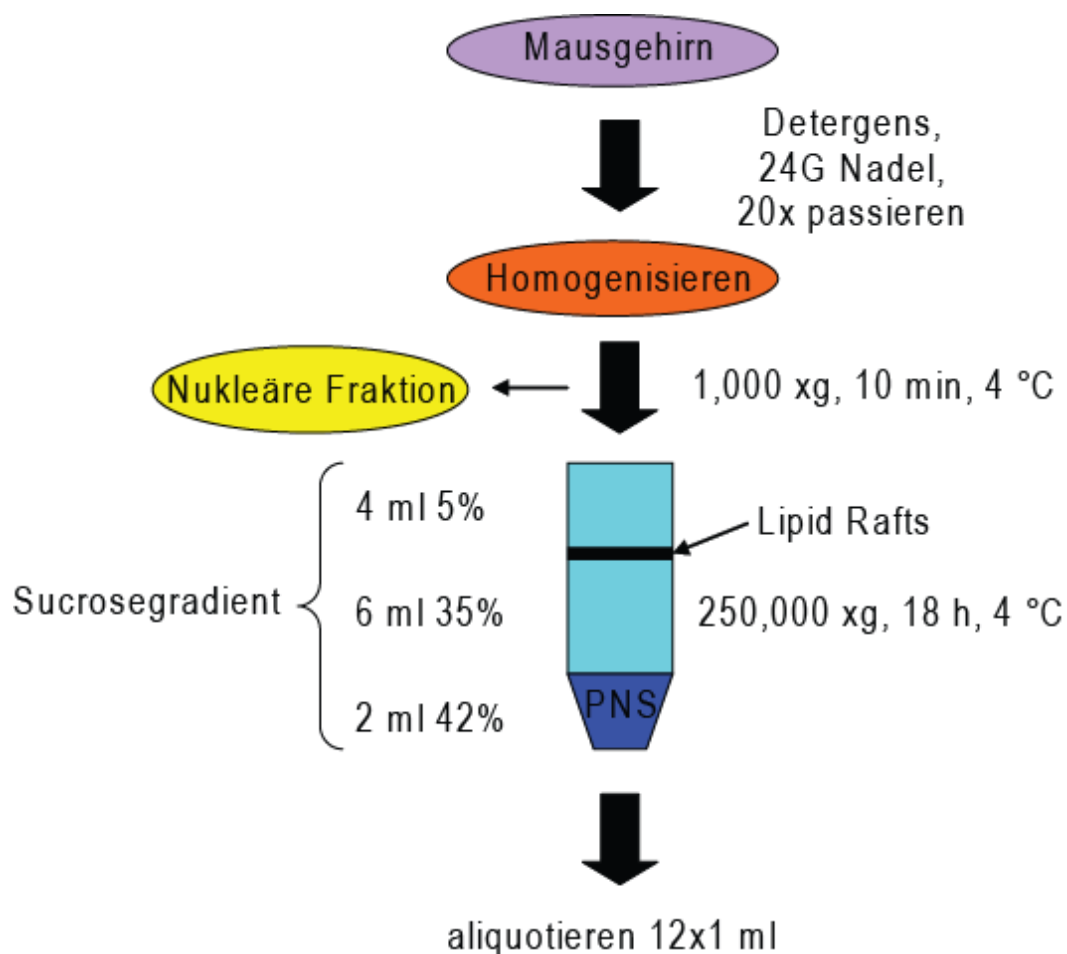


Abbildung 11: Schematischer Verlauf zur Isolation der *lipid rafts* aus dem Mäusegehirn

2.2.9 Bio-Rad Protein Assay

Konzentrationen löslicher Proteine wurden mit dem Bio-Rad Protein Assay quantifiziert. Dieser Test basiert auf der Bradford-Methode, welche im Wesentlichen einen differentiellen Farbwechsel des Farbstoffs Coomassie® Brilliant Blue G-250 von 465 nm zu 595 nm nach Proteinbindung beinhaltet. Als Proteinstandard diente das Albumin aus dem Rinderserum mit einer Verdünnungsreihe von 0-500 µg/ml. Bei der Messung wurden 20 µl jeder Probe oder Standard in ein 96-Well einer Mikrottestplatte pipettiert und dann 200 µl 1x Bio-Rad Protein Assay Reagenz hinzugefügt. Mit Hilfe eines Tecan Sunrise™ Mikrotiterplattenlesegeräts wurde die Absorption bei 595 nm ausgelesen und die Proteinkonzentration anhand der Standardkurve bestimmt.

2.2.10 SDS-Page

Die Technik der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-Page) trennt Proteine in einem elektrischen Feld ihrem Molekulargewicht entsprechend auf. Das anionische Detergens SDS lagert sich unspezifisch an allen Proteinen, linearisiert sie und zerstört dabei annähernd alle nicht-kovalente Wechselwirkungen. Zur Reduktion der Disulfidbrücken werden zusätzlich 1,4-Dithiothreitol (DTT) oder β-Mercaptoethanol zugefügt.

Bei selbstangefertigten Tris-Glycin Gelen wurde nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Elektrophorese ein basisches 10% oder 12% Trenngel gegossen und mit einem leicht sauren 5% Sammelgel überschichtet (Laemmli, 1970). Das Gel wurde in eine Mini-PROTEAN® 3 Elektrophorese-Zelle installiert und 500 ml SDS-Page Tris-Glycin Laufpuffer wurden in die Laufkammer eingefüllt. Kommerzielle 10-20% pre-cast Tris-Tricin Gele (Anamed) wurden in einem XCell SureLock™ Mini-Cell Elektrophoresesystem installiert und 500 ml SDS-Page Tris-Tricin Laufpuffer wurden in die Laufkammer eingefüllt. Vor der Auftrennung wurden Proteinproben mit 3x SDS-Page Ladepuffer gemischt, 5 min bei 95 °C erhitzt, auf Eis 1 min gekühlt und kurz abzentrifugiert. Zur näherungsweisen Schätzung des Molekulargewichtes wurden neben den Proben 5 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 120 V solange fortgesetzt, bis die Front des Farbstoffs Bromphenolblau das Ende des Gels erreichte.

Tabelle 7: Zusammensetzung der selbstangefertigten Tris-Glycin Gele (Menge für 2 Gele)

Chemikalie	5% Sammelgel	10% Trenngel	12% Trenngel
Rotiphorese Gel 30	840 µl	6450 µl	8000 µl
1M Tris/HCl [pH6,8]	1880 µl	-	-
1M Tris/HCl [pH8,8]	-	7500 µl	7500 µl
bidest. Wasser	2200 µl	4950 µl	3400 µl
20% SDS	25 µl	97,5 µl	97,5 µl
10% APS	50 µl	195 µl	195 µl
TEMED	6 µl	24 µl	24 µl

2.2.11 Western blot

Die Methode *western blot* wird zum immunologischen Nachweis immobilisierter Proteine angewandt. Die Immobilisierung erfolgt durch den Transfer der in der SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran, die aus Nitrozellulose (NC) oder Polyvinylidenfluorid (PVDF) besteht. Membranen aus PVDF müssen vor dem Transfer durch kurze Inkubation in 100% Methanol aktiviert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Whatman Papier und Schwämme vor dem Transfer in Transferpuffer equilibriert und der Transferpuffer bei 4 °C gekühlt. Das SDS-Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde in einem Sandwich bestehend aus Whatman Papier, Schwämme, SDS-Gel und Membran auf ein Mini Trans-blot Cell System geladen. Die Transferkammer wurde komplett mit Transferpuffer gefüllt und der Transfer bei 250 mA 75 min vollzogen. Anschließend wurde das Sandwich entpackt und das SDS-Gel verworfen. Die Trägermembran mit den immobilisierten Proteinen wurde in PBS+10% Magermilchpulver (w/v) für 1 h bei RT oder 4 °C über Nacht geblockt, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Dann wurde die Membran zweimal je 5 min mit PBS gewaschen. Der Primärantikörper wurde in PBS+1% Magermilchpulver (w/v) in der unten angegebenen Konzentration verdünnt und mit der Membran bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nachdem ungebundene Antikörper 3x 10 min mit PBS und 3x 10 min mit PBS+0,1% Tween 20 abgewaschen wurden, wurde die Membran mit dem geeigneten Sekundärantikörper in der unten angegebenen Konzentration inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde in PBS+0,5% Magermilchpulver (w/v) angesetzt und die Inkubationsdauer betrug 1,5 h. Erneut wurde die Membran je 3x mit PBS und PBS+0,1% Tween 20 gewaschen, bevor sie mit dem Western Lightning ECL Substrat (Perkin Elmer) entwickelt wurde. Gemäß Angaben des Herstellers wurden Substratlösung A und Substratlösung B im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran gleichmäßig verteilt. Nach 2 min wurde die Substratmischung entfernt und die Chemolumineszenz mit Hilfe von Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) in einer

Dunkelkammer detektiert. Kodak GBX Entwickler und Fixierer wurden verwendet, um Signale sichtbar zu machen und dauerhaft zu erhalten.

Die *western blot* Filme wurden mit dem Epson Perfection V700 Fotoscanner eingescannt. Densitometrische Analysen wurden mit dem Bildverarbeitungsprogramm Image J (NIH, Version 1.43) durchgeführt.

Tabelle 8: Verwendung der Primärantikörper für *western blot*

Antigen	Ursprung	Typ	Klon	Verdünnung	Herkunft
α -Tubulin	Maus	monoklonal	DM1A	1:10000	Abcam
AKT	Hase	polyklonal		1:1000	Cell Signaling
Aktin	Maus	monoklonal	C4	1:1500	Millipore
Amyloid β	Maus	monoklonal	W0-2	1:1000	Millipore
ASM	Hase	polyklonal		1:1000	Cell Signaling
BACE	Maus	monoklonal	61-3E7	1:1000	Millipore
Calnexin	Hase	polyklonal		1:2000	Abcam
CD14	Ratte	monoklonal	rmc5-3	1:500	BD Pharmingen
Flotillin 1	Hase	polyklonal		1:1000	Abcam
JNK	Hase	polyklonal		1:1000	Cell Signaling
Lamp 1	Hase	monoklonal	C54H11	1:5000	Cell Signaling
Munc18-1	Hase	polyklonal		1:2000	Cell Signaling
Nicastrin	Hase	monoklonal	D38F9	1:1000	Cell Signaling
p38	Hase	polyklonal		1:1000	Cell Signaling
p44/42	Hase	monoklonal		1:1000	Cell Signaling
Phospho-p38	Hase	polyklonal		1:1000	Cell Signaling
Phospho-p44/42	Hase	polyklonal		1:1000	Cell Signaling
Phospho-AKT	Maus	monoklonal		1:1000	Cell Signaling
Phospho-JNK	Hase	polyklonal		1:1000	Cell Signaling
Presenilin 1	Hase	monoklonal	EP2000Y	1:1000	Abcam
PSD95	Maus	monoklonal	6G6-1C9	1:2000	Abcam
PSD95	Hase	polyklonal		1:2000	Cell Signaling
SNAP25	Hase	polyklonal		1:2000	Cell Signaling
Synaptophysin	Maus	monoklonal	SY38	1:3000	Abcam
TLR 2	Hase	polyklonal		1:1000	Abcam

Tabelle 9: Verwendung der Sekundärantikörper für *western blot*

Antigen	Ursprung	Typ	Verdünnung
anti Maus	Ziege	HRP konjugiert	1:5000-1:10000
anti Hase	Ziege	HRP konjugiert	1:3000-1:5000
anti Ratte	Hase	HRP konjugiert	1:2000

2.2.12 Analyse des Ceramid-Gehalts

2.2.12.1 Dot blot Analyse des Ceramid-Gehalts

SH-SY5Y Zelllysate wurden nach den Angaben im Abschnitt 2.2.2 angefertigt. Von jeder Testprobe wurden zwei 2 µl Spots auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetragen und die Membran für 10 min bei RT getrocknet. Spots aus reinem Lysepuffer dienten als Kontrolle. Dann wurde die Membran in PBS für 10 min equilibriert und anschließend in PBS+10% Magermilchpulver (w/v) für 1 h bei RT geblockt. Der Ceramid-spezifische Primärantikörper monoklonal Maus anti Ceramide IgM wurde 1:500 in PBS+1% Magermilchpulver (w/v) verdünnt und mit der Membran für 16 h bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Membran 6x 10 min mit PBS+0,1% Tween 20 gewaschen wurde, wurde der Sekundärantikörper Ziege anti Mouse HRP 1:2500 in PBS+1% Magermilchpulver (w/v) verdünnt und mit der Membran für 2 h bei RT inkubiert. Die Waschgänge mit PBS+0,1% Tween 20 wurden wiederholt und die Signale mit ECL wie im Abschnitt 2.2.11 detektiert. Anschließend wurde der Blockvorgang erneut ausgeführt. Als Ladekontrolle wurde die Membran mit monoklonal Maus anti α -Tubulin 1:10000 in PBS+1% Magermilchpulver (w/v) für 1 h bei RT inkubiert und dann 6x 10 min mit PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde Ziege anti Mouse HRP 1:10000 in PBS+0,5% Magermilchpulver (w/v) appliziert und für 1 h bei RT inkubiert. Erneut wurden die Signale mit ECL visualisiert. Der zelluläre Ceramid-Gehalt wurde als Verhältnis Ceramid/ α -Tubulin kalkuliert.

2.2.12.2 Supplementierung von C16-Ceramiden

Um den möglichen Einfluss der zellulären Ceramide auf die γ -Sekretase Aktivität zu ergründen, wurde C16-Ceramide in 100% Ethanol gelöst. SH-SY5Y Zellen wurden mit Vehikel, 1 µM oder 10 µM C16-Ceramiden in DMEM+10% FCS für 24 h inkubiert. Im Anschluss wurde der Ceramidgehalt nach den Angaben im Abschnitt 2.2.12.1 untersucht und die Membranfraktion gemäß den Angaben im Abschnitt 2.2.6 für den γ -Sekretase Aktivitätstest isoliert.

2.2.13 Analyse des Sphingomyelingehalts

Lysenin, ein aus dem Regenwurm aufgereinigtes Protein, bindet spezifisch an Sphingomyelin (Yamaji et al., 1998). Dadurch gibt die Menge des Lysenins direkte Auskunft über den zellulären Sphingomyelingehalt.

SH-SY5Y Zelllysate wurden nach den Angaben im Abschnitt 2.2.2 angefertigt. Von jeder Testprobe wurden zwei 2 µl Spots auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetragen und die Membran für 15 min bei RT getrocknet. Spots aus reinem Lysepuffer dienten als Kontrolle. Dann wurde die Membran in TBS für 10 min equilibriert und anschließend in TBS+5% BSA (w/v) für 1 h bei RT geblockt. Die Membran wurde 3x 10 min in TBS gewaschen und mit 0,5 µg/ml Lysenin in TBS+1% BSA (w/v) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Ungebundenes Lysenin wurde 3x 10 min mit TBS und 3x 10 min mit TBS+0,1% Tween 20 abgewaschen. Als Primärantikörper zur Detektion des Lysenin wurde die Membran mit Hase anti Lysenin Antiserum 1:1000 in TBS+1% BSA (w/v) für 16 h bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde 3x 10 min mit TBS+0,1% Tween 20 gewaschen und mit dem Sekundärantikörper Ziege anti Hase HRP 1:3000 in TBS+1% BSA (w/v) für 2 h bei RT inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte wie im Abschnitt 2.2.11. Inkubation mit Maus anti α -Tubulin als Ladekontrolle wurde nach Angaben im Abschnitt 2.2.12.1 durchgeführt. Der zelluläre Sphingomyelingehalt wurde als Verhältnis Lysenin/ α -Tubulin kalkuliert.

2.2.14 Real-Time-quantitative-PCR

Die Real-Time-quantitative-PCR ist eine auf der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruhende Methode zur Quantifizierung spezifischer Gentranskripte. Die Quantifizierung wird anhand Fluoreszenzmessungen jedes Wells einer 96-Well Platte durchgeführt, die mit Hilfe einer Digitalkamera nach jedem PCR-Zyklus erfasst wird. Die Amplifikation des PCR-Produktes steht in einem proportionalen Verhältnis zur steigenden Fluoreszenz, die während der PCR-Reaktion gewöhnlich eine S-Funktion beschreibt. Jedoch ist die korrekte Ermittlung der DNA-Menge aufgrund der Reaktionsbedingungen nur innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase möglich.

Zwei Varianten der Real-Time-quantitative-PCR wurden in der vorliegenden Arbeit angewandt: DNA-Interkalator basierende und Reporter-Sonden basierende. Die im Vergleich einfachere und auch kostengünstigere Methode ist die Nutzung von Farbstoffen wie SYBR Green, die sich in allen doppelsträngigen DNA-Fragmenten interkalieren und fluoreszieren. Aufgrund der geringen Spezifität wird bei diesem Verfahren eine Schmelzkurvenanalyse nach Ende der PCR benötigt. Hingegen ist die auf *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) basierende Methode mit den TaqMan-Sonden wesentlich spezifischer. Diese Sonden enthalten neben Oligonukleotiden zusätzlich an einem Ende einen Reporter-Farbstoff und an dem anderen Ende einen sog. Quencher, der die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors bei

intakter Sonde unterdrückt. Während der PCR-Reaktion bindet die Sonde an die DNA und die DNA-Polymerase trennt den Reporter-Farbstoff von dem Quencher, wodurch die Fluoreszenz ansteigt.

2.2.14.1 RNA-Isolation mit TRIzol®

Zur Isolation der totalen RNA wurde Maushirngewebe oder Zellmaterial in 1 ml TRIzol® homogenisiert. Dabei wurde das Maushirngewebe 10x durch 24G Nadel passiert, während sich Zellen in TRIzol® innerhalb von Sekunden komplett auflösten. Die Proben wurden 5 min bei RT inkubiert, bevor sie bei 12.000 xg, 10 min, 4 °C zentrifugiert wurden. Der resultierende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und 200 µl Chloroform hinzugefügt. Anschließend wurden die Tubes für 15 s kräftig geschüttelt, 2 min bei RT inkubiert und erneut bei 12.000 xg, 15 min, 4 °C zentrifugiert, um die wässrige Phase von der organischen Phase zu trennen. Die wässrige Phase mit der darin enthaltenen RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Zur Fällung der RNA wurde 500 µl Isopropanol zugegeben und gemischt. Die Lösung wurde bei RT für 10 min inkubiert und wieder bei 12.000 xg, 15 min, 4 °C zentrifugiert, um die RNA zu pelletieren. Danach wurde das RNA-Pellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und bei 7.500 xg, 5 min, 4 °C zentrifugiert. Schließlich wurde das RNA-Pellet für 5 min luftgetrocknet und in 50 µl RNA-freies Wasser gelöst. Die Menge der RNA wurde mit dem Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer bestimmt.

2.2.14.2 Reverse Transkription

Als Vorbereitung der reverse Transkription wurden sämtliche Rückstände genomischer DNA in RNA-Proben durch Inkubation mit DNase I eliminiert. Die RQ1 (*RNA qualified*) RNase-free DNase I baut sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige DNA-Fragmente ab. Zum Verdau der DNA wurden 3 µg RNA (in 8 µl Volumen) mit 1 µl 10x RQ1 Reaktionspuffer und 1 µl RQ1 RNase-free DNase I (1 Unit/µl) gemischt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. 1 µl RQ1 Stopplösung wurde hinzugefügt und bei 65 °C für 10 min erhitzt, um den enzymatischen Vorgang zu beenden.

Die Erzeugung des Erststrangs der *complementary DNA* (cDNA) wurde mit Hilfe der *SuperScript II Reverse Transcriptase* durchgeführt. 11 µl RNA-Proben wurden mit 1 µl *hexamer random primer* (250 ng/µl) und 1 µl dNTPs (je 10 mM) bei 65 °C erhitzt und dann rasch auf Eis abgekühlt. Nach kurzer Zentrifugation wurden 4 µl 5x Erststrang-Puffer und 2

µl 0,1 M DTT hinzugefügt und bei RT für 2 min gelagert. 1 µl *SuperScript II Reverse Transcriptase* (200 Units/µl) wurde als letzte Komponente dazugegeben und die Mixtur bei 42 °C für 50 min erwärmt. Die Inaktivierung des Enzyms fand bei 70 °C 15 min statt.

2.2.14.3 Durchführung der Real-Time-quantitative-PCR mit SYBR® Green

Quantitative Messung der Gentranskripte wurde mit dem DyNAmo™ Flash SYBR® Green PCR Kit auf einem Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System durchgeführt.

Ein Reaktionsmix mit 20 µl Volumen setzte sich folgendermaßen zusammen:

Komponenten	Menge	Endkonzentrationen
2x DyNAmo™ Flash SYBR® Green Master Mix	10 µl	1x
Primer forward (10 µM)	0,5 µl	0,25 µM
Primer reverse (10 µM)	0,5 µl	0,25 µM
50x ROX Referenz-Farbstoff	0,06 µl	0,3x
cDNA	1 µl	max. 150 ng
ddH ₂ O	8 µl	

Das Cycling-Protokoll beinhaltete folgende Reaktionsschritte:

Schritt	Wirkung	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Initial-Denaturierung	95 °C	7 min	1
2	Denaturierung	95 °C	10 s	40
	Annealing + Elongation	60 °C	30 s	
3	Schmelzkurvenanalyse	60 - 98 °C	-	1

Nach dem Amplifikationsvorgang wurden die Schwellenwerte (Ct) jedes Testgens innerhalb des exponentiellen Bereichs ermittelt. ΔCt-Werte berechnete sich aus Ct (Haushaltsgen) - Ct (Testgen) der gleichen Probe. Das Verhältnis der Transkripte wurde mit $2^{(\Delta Ct)}$ dargestellt.

2.2.15 Barnes maze und morris water maze

Um die kognitive Fähigkeiten der TgCRND8 und APP/PS1-21 Mäuse im Alter von 6 Monaten zu testen, wurden zwei Methoden angewandt: *barnes maze* und *morris water maze*. *Barnes maze* wurde 1979 von Carol Barnes als eine Form von *dry-land maze* entwickelt, um räumliches Lern- und Erinnerungsvermögen von Tieren zu testen (Barnes 1979). Die Tiere flüchten von einer hell erleuchteten, runden Plattform in eine schmale, dunkle, vertiefte Kammer, die unter einem der 40 in der Peripherie angelegten Löcher platziert ist. *Morris water maze*, entwickelt von Richard Morris im Jahr 1981, stellt eine weitere Verhaltensanalyse des

räumlichen Lernens von Nagetieren dar (Morris, 1981). Die Mäuse schwimmen in einem großen runden Becken mit dem Ziel, selbstständig auf eine unter der Wasseroberfläche angebrachte und damit für sie unsichtbare runde Plattform zu gelangen, auf der sie bequem stehen können. Auf aversive Reize wie Lärm, Licht oder gar Futterentzug wurde bewusst verzichtet, um das Verhalten der Tiere nicht mit Stressbelastungen zu verfälschen. Ein EthoVision XT Trackingsystem (Version 7.0), welches an der Decke des Raums angebracht wurde, diente dazu, (1) die Latenzzeit bis zum Erreichen des Zufluchtsortes, (2) die zurückgelegte Distanz bis zum Erreichen des Zufluchtsortes und (3) die Bewegungsgeschwindigkeit des Tieres während des Tests festzuhalten.

Versuche mit *barnes maze* wurden 5 Tage in Serie wie folgt durchgeführt. Zu Beginn jedes Testvorgangs wurde die Maus mittig auf die Plattform (Durchmesser 122 cm) gesetzt. Zwei Sekunden später startete die Aufnahme des Trackingsystems. Die Bewegung der Maus wurde bis zum Erreichen des Zufluchtsortes aufgezeichnet. Der Testvorgang wurde am gleichen Tag zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt und die Ergebnisse zusammengefasst. Der erste Testtag wurde als Training betrachtet und floss nicht in die statistische Analyse ein.

Versuche mit *morris water maze* wurden 5 Tage in Serie wie folgt durchgeführt. Zu Beginn jedes Testvorgangs wurde die Maus an einer Plattform (Durchmesser 11 cm) nahe Stelle ins Becken (Durchmesser 134,5 cm, Tiefe 83 cm) gesetzt. Das Schwimmverhalten der Maus wurde so lange aufgezeichnet, bis sie auf die Plattform kletterte und sich dort länger als eine Sekunde aufhielt. Der Testvorgang wurde am gleichen Tag zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt und die Ergebnisse zusammengefasst. Jedoch wurde die Maus bei der Wiederholung an einem Plattform fernen Ort ins Wasser gelassen. Der erste Testtag wurde als Training betrachtet und floss nicht in die statistische Analyse ein.

2.2.16 Präparation von Maushirngeweben

Zur Isolation vom Gehirn wurde die Maus mit Isofluran in tiefer Narkose versetzt und vorsichtig aufgeschnitten. Nachdem peripheres Blut mit einer EDTA-behandelten Spritze aus der Bauchvene gezogen wurde, wurde die Maus mit 20 ml PBS über die linke Herzkammer perfundiert. Anschließend wurde der Mauskopf abgeschnitten, die Schädeldecke geöffnet und das Gehirn entnommen. Das Kleinhirn wurde verworfen. Das Großhirn wurde sagittal gespalten und die linke Hemisphäre in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Das in PFA fixierte Gewebe wurde in Paraffin eingebettet und für die Immunhistochemie verwendet. Von der rechten Hemisphäre wurde eine 0,5 mm dicke Scheibe sagittal abgeschnitten und in

TRIZOL® für die RNA-Isolation bei -80 °C aufbewahrt. Der Rest der rechten Hemisphäre wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die spätere Homogenisierung bei -80 °C gelagert.

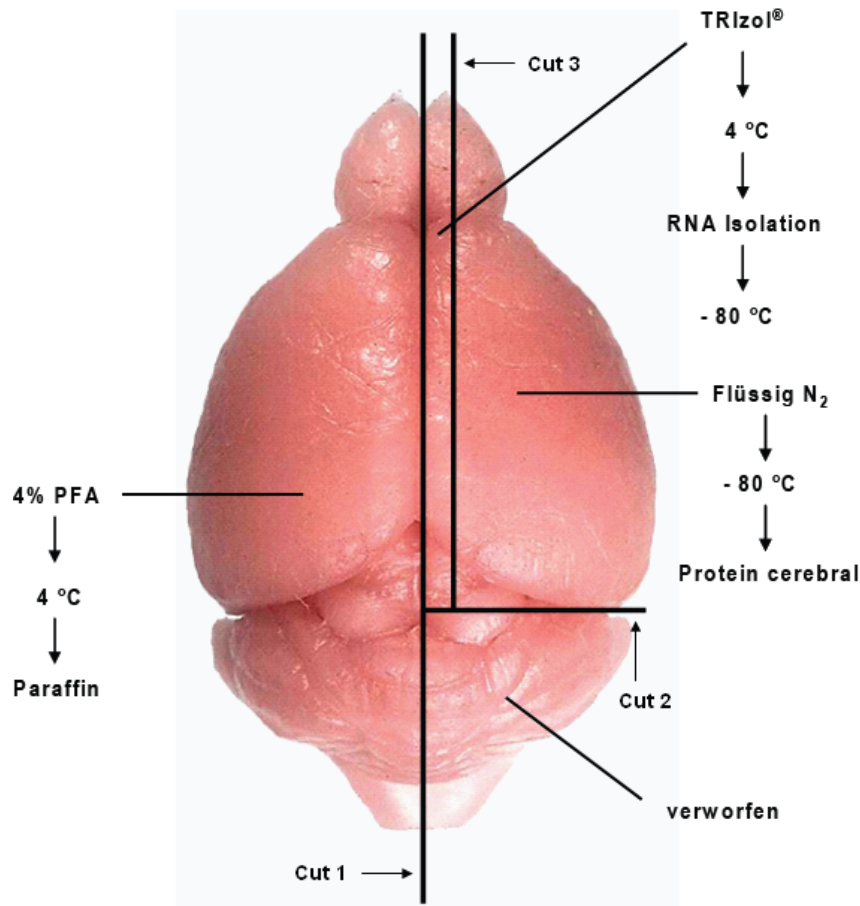


Abbildung 12: Schematische Auftrennung des Maushirngewebes

2.2.17 Maushirnhomogenat

Maushirnhomogenat wurde nach einem etablierten Protokoll hergestellt (Maier et al., 2008). Nachdem die gefrorene Großhirnhemisphäre gewogen wurde, wurde das Gewebe in TBS+1x Proteaseinhibitor Cocktail (500 µl/100 mg Gewebe) homogenisiert und bei 16.100 xg, 30 min, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein neues Reaktionsgefäß übertragen und bei -80 °C gelagert. Das Pellet wurde in TBS+1% Triton X-100+1x Proteaseinhibitor Cocktail (500 µl/100 mg Gewebe) resuspendiert, in einem Eiswasserbad mit dem Ultraschallgerät Transsonic T 780 für 5 min behandelt und erneut bei 16.100 xg, 30 min, 4 °C zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand auf ein neues Reaktionsgefäß übertragen und bei -80 °C gelagert. Bei dem dritten Extraktionsschritt wurde Guanidinpuffer (5 M Guanidin-HCl, 50 mM

Tris/HCl [pH 8.0] in gleichem Verhältnis wie zuvor zum Pellet hinzugefügt, bei RT für 16 h kräftig geschüttelt und erneut bei 16.100 xg, 30 min, 4 °C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration sämtlicher Proben wurde mittels Bio-Rad Protein Assay bestimmt.

2.2.18 A β -Detektion mit pre-coated ELISA Kits

Die Menge von A β 40 und A β 42 in den drei Fraktionen des Maushirnhomogenats (Abschnitt 2.2.17) und aus dem Überstand oder Lysaten hAPP695-überexprimierender SH-SY5Y Zellen (Abschnitt 2.2.4.2) wurde mit dem jeweiligen ELISA Kit (Invitrogen) quantifiziert. Folgende Standardreihe wurde für den A β 40-ELISA hergestellt: 0 pg/ml, 7,8 pg/ml, 15,6 pg/ml, 31,25 pg/ml, 62,5 pg/ml, 125 pg/ml, 250 pg/ml und 500 pg/ml. Die nachfolgende Standardreihe wurde für den A β 42-ELISA verwendet: 0 pg/ml, 15,6 pg/ml, 31,25 pg/ml, 62,5 pg/ml, 125 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml und 1000 pg/ml. Je 50 μ l Standard oder Probe wurde zu einem Well, der mit Fängerantikörper gegen A β 40 oder A β 42 beschichtet wurde, pipettiert und mit 50 μ l anti-human A β 40- oder A β 42-Detektionsantikörper vermischt. Die Platte wurde versiegelt und für 3 h bei RT geschüttelt. Danach wurde die Mischung entfernt und die Platte 6x gewaschen. 100 μ l Anti-rabbit Ig's HRP Arbeitslösung wurde zu jedem Well pipettiert, die Platte versiegelt und für 30 min bei RT inkubiert. Die Platte wurde erneut 6x gewaschen und 100 μ l Substratlösung hinzugegeben, so dass die Flüssigkeiten in den Wells blau wurden. Die Substratinkubation wurde nach 30 min durch Zugabe von 100 μ l Stopplösung beendet und die Absorption bei 450 nm (Referenzwellenlänge 570 nm) in einem Mikrotiterplattenlesegerät ausgelesen. Die Standardreihen wurden genutzt, um die nötige Standardkurve zu erstellen, damit die Konzentrationen von A β 40 und A β 42 abgeschätzt werden konnten.

2.2.19 Kultivierung muriner BMDMs

Zur Isolation muriner Makrophagen aus dem Knochenmark (*bone marrow derived macrophages*, BMDMs) wurden 8 - 10 Wochen alte Mäuse verwendet. Dabei wurde das Tier mit Isofluran in tiefer Narkose versetzt und das Fell mit 70% Ethanol gründlich desinfiziert. Femora und Tibiae wurden von Haut und Beinmuskulatur befreit und die Füße abgeschnitten. Die in PBS gesammelten Beinknochen wurden an deren Enden aufgeschnitten und das Knochenmark mit 5 ml PBS in eine Kulturschale gespült. Mit Passagen durch einer 24G Nadel wurden die Zellen des Knochenmarks vereinzelt und bei 300 xg, 8 min, 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 2 ml hypotonem Erythrozyten-Lysepuffer (156 mM

NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 100 mM EDTA) resuspendiert und 2 min bei RT inkubiert. 6 ml PBS wurde hinzugegeben und die verbleibenden Leukozyten bei 300 xg, 8 min, 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in DMEM+10% FCS bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen aus dem Überstand bei 300 xg, 8 min, 4 °C pelletiert und in DMEM+10% FCS+20% L929 konditioniertem Medium kultiviert, um eine Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen zu erzielen. Das Medium wurde jeweils nach drei Tagen ausgetauscht und nach etwa einer Woche konnten die BMDMs nach verstärkter Proliferation experimentell eingesetzt werden.

2.2.20 Aβ-Präparation

Synthetisches humanes Aβ₄₂ in lyophilisierter Form wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Botond Penke (Albert Szent-Györgyi Medical University, Szeged, Ungarn) bereitgestellt. Die Präparation des Aβ₄₂-Peptides für Zellstimulation wurde nach einem bekannten Protokoll durchgeführt (Dahlgren et al., 2002).

Zunächst wurde 1 mg Aβ₄₂ in 1 ml 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol komplett gelöst und für 30 min bei RT inkubiert. 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol besitzt die Eigenschaft, Aβ-Aggregate gleichgültig in welcher Form zu Monomeren aufzulösen. Dann wurde das flüchtige Lösungsmittel mit einem Savant SpeedVac DNA 110 Concentrator bei RT entfernt (Dauer ca. 2 h). Die Aβ₄₂-Monomeren wurden zur Aggregation gebracht, indem 1 mg Aβ₄₂ in 40 µl DMSO gelöst, mit Ham's F12 Medium (mit L-Glutamin, ohne Phenolrot) auf 100 µM verdünnt und bei 37 °C für drei Tage inkubiert wurde.

2.2.21 Aβ-Stimulation

BMDMs (2 x 10⁵ Zellen/Well) wurden in DMEM+10% FCS+20% L929 konditioniertem Medium auf 48-Well Platte gesät. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und durch DMEM+10% FCS ersetzt. Ein Tag später wurden die Zellen mit 200 µl 5 µM oder 10 µM aggregiertem Aβ₄₂ für 24 h stimuliert. Der Überstand wurde direkt für ELISA verwendet oder bei -20 °C eingefroren. Als Positivkontrollen wurden 1 ng/ml und 10 ng/ml Pam3CSK4 und Lipopolysaccharid (LPS) verwendet. Während Pam3CSK4 ein spezifischer TLR1/TLR2-Ligand ist, stellt das bakterielle LPS ein potenter TLR4-Agonist dar.

THP-1 Zellen (2 x 10⁵ Zellen/Well) wurden in RPMI 1640+10% FCS+10 nM Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) auf 48-Well Platte gesät und für 48 h bei 37 °C und 5% CO₂

inkubiert, so dass die Zellen sich zu Makrophagen differenzierten und am Boden adhärirten. Im Anschluss wurde das Medium entfernt und durch RPMI 1640+10% FCS ersetzt. Für die Stimulation von THP-1 Zellen wurde entweder 200 µl 1 µg/ml Pam3CSK4 oder 1 µg/ml LPS verwendet. Auf Aβ wurde verzichtet, da die Stimulation mit 10 µM aggregiertem Aβ42 zu keiner messbaren Freisetzung inflammatorischer Mediatoren führte.

2.2.22 Detektion inflammatorischer Mediatoren mit ELISA Kits

Mit Hilfe kommerziell erhältlicher ELISA Kits konnten die Konzentrationen von TNF-α und CCL-2 im Überstand muriner BMDMs bzw. THP-1 Zellen nach Stimulation ermittelt werden. ELISA Kits zur Quantifizierung von TNF-α und CCL-2 im Überstand muriner BMDMs wurden von eBioscience bezogen. OptEIA ELISA Kit zur Quantifizierung der TNF-α Menge im Überstand der THP-1 Zellen wurde von BD Biosciences bezogen.

Die Experimente wurden gemäß den Protokollen der Hersteller durchgeführt. Am Vortag des Experiments wurde 100 µl Fängerantikörper in 1x Coating-Puffer in jedes Well einer Mikrolon 600 96-Well Mikroplatte (Greiner Bio-One) pipetiert. Die Mikroplatte wurde mit Parafilm versiegelt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dem Coating wurde die Platte 3x mit PBS+0,1% Tween 20 gewaschen und mit 200 µl Assay-Diluent pro Vertiefung für 1 h bei RT geblockt. Nach erneuten Waschgängen wurde 100 µl Standard (0-1000 pg/ml) oder Überstand stimulierter Zellen auf die Platte geladen und für 2 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde wieder 6x gewaschen, 100 µl Detektionsantikörper zu jedem Well pipetiert und 1 h bei RT inkubiert. Nach wiederholten Waschgängen wurde 100 µl Streptavidin-HRP Arbeitslösung zu jeder Vertiefung gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde wieder 6x gewaschen, 100 µl Substratlösung je Well hinzugefügt und für 20 min bei RT im Dunkeln gelagert, so dass sich die Lösung durch das umgesetzte TMB-Substrat blau verfärbt. Schließlich wurde die enzymatische Reaktion mit 50 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption mit Hilfe eines Tecan Sunrise™ Mikrotiterplattenlesegeräts bei 450 nm abgelesen. Absorptionswerte der Referenzwellenlänge 570 nm wurden subtrahiert. Die Berechnung der Mengen inflammatorischer Zytokine im Überstand stimulierter Zellen erfolgte anhand der Standardkurve.

2.2.23 Untersuchung der MAPK-Aktivierung

Die Aktivierung der MAP (*mitogen activated protein*)-Kinase-Wege in primären murinen BMDMs wurde nach Stimulation mit Pam3CSK4 oder LPS untersucht. Eine Mio. BMDMs wurden in DMEM+10% FCS+20% L-929 konditioniertem Medium auf 6-Well ausgesät. 24 h später wurde der Überstand durch in DMEM+10% FCS ausgetauscht. Bei der Stimulation wurden die Zellen mit 10 ng/ml LPS oder 100 ng/ml Pam3CSK4 für 10 min, 30 min, 60 min und 120 min inkubiert, wobei Zellen ohne Stimulanz als Kontrolle dienten. Nach der Stimulationsperiode wurden die Zellen zweimal mit gekühltem PBS gewaschen und mit 0,05% Trypsin-EDTA (1x) für 10 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurden sie mit der Pipette vom Boden der 6-Well Platte abgelöst und bei 300 xg, 8 min, 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 50 µl SDS-Zellysepuffer resuspendiert, so dass die Zellen sich komplett auflösten. Das Lysat wurde in einem Eiswasserbad mit dem Ultraschallgerät Transsonic T 780 für 10 min behandelt, um die DNA zu fragmentieren. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay bestimmt und 5 µg Gesamtprotein jeder Probe wurde für die Analyse der Phosphorylierung in SDS-Page und *western blot* aufgetragen.

2.2.24 Analyse der A β -Phagozytose

Für die Untersuchung der phagozytischen Aktivität von Makrophagen wurde auf die Methode der Durchflusszytometrie zurückgegriffen. Als Vorbereitung wurde FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-gelabeltes A β 42 sowie ungelabeltes A β 42 unabhängig voneinander zur Aggregation gebracht (Abschnitt 2.2.20). Ein Tag vor dem Versuch wurde das FITC-gelabelte A β 42 im Verhältnis 1:10 mit ungelabeltem A β 42 vermischt, damit sie sich zusammenlagern konnten. Das A β 42-Gemisch wurde mit DMEM+10% FCS auf 0,5 µM verdünnt und 300 µl dieses Gemisches wurden auf 2×10^5 BMDMs für den Phagozytostest gegeben. Folgende Inkubationszeitpunkte wurden ausgewählt: 1 h, 3 h, 6 h und 24 h. BMDMs ohne Kontakt zu A β 42 dienten als Vergleichskontrolle. Das ungebundene A β 42 wurde mit PBS ausgewaschen, die Zellen mit 0,05% Trypsin/EDTA (1x) von der Platte abgelöst und bei 500 xg, 8 min, 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gelagert. Die mittlere Fluoreszenzintensität des aufgenommenen FITC-A β 42 in den Zellen sowie der prozentuale Anteil FITC-positiver Zellen wurden mit dem BD FACSCanto II Durchflusszytometer ermittelt.

Zur Überprüfung der effektiven Degradation von A β wurden 2×10^5 BMDMs für 3 h mit 0,5 µM A β 42 inkubiert. Im Anschluss wurde das A β 42 ausgewaschen und Zellysate zu den

Zeitpunkten 0, 3, 6 und 24 h angefertigt, um die Menge des internalisierten A β 42 im *dot blot* zu detektieren. Die Durchführung des *dot blot* mit dem monoklonalen Maus anti Amyloid β Antikörper (Klon W02) erfolgte auf gleicher Weise wie für *western blot* (Abschnitt 2.2.11).

2.2.25 Statistik

Die in den Abbildungen gezeigten Daten werden als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Zum Vergleich zweier Testgruppen wurde der Zweistichproben-T-Test verwendet. Zum Vergleich mehrerer Testgruppen wurde die ein- oder zweifaktorielle Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) gefolgt von der Bonferroni-, Tukey-, LSD-, Dunnette- oder Tamhane-Korrektur herangezogen. Statistische Analysen wurden mit der Statistik-Software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) Version 16.0 durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde auf $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) gesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle der ASM bei der Generation von Amyloid β

3.1.1 ASM, APP und γ -Sekretase colokalisieren in Endosomen und Lysosomen

Die saure Sphingomyelinase (*acid sphingomyelinase*, ASM) ist in endosomalen und lysosomalen Vesikeln lokalisiert (Smith und Schuchman, 2008; Edelman et al., 2011). Gleichzeitig finden in diesen Zellorganellen die amyloidogene Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP), nämlich die enzymatische Spaltung durch die β - und γ -Sekretasen, zur Entstehung des Amyloid β Peptides ($A\beta$) statt. Zur Verifikation der räumlichen Assoziation zwischen ASM, APP und Sekretasen wurden Organellen aus der humanen Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y isoliert, mit Sucrose-Gradientenzentrifugation entsprechend ihrer jeweiligen Dichte aufgespalten und in 12 Fraktionen unterteilt. Gemeinsam mit Proteinen der zytosolischen Fraktion (S2) wurden sie in SDS-Page aufgetrennt, um folgende Komponenten mit *western blot* zu detektieren: (1) ASM; (2) APP; (3) β -Sekretase (BACE); (4 und 5) γ -Sekretasekomponenten Presenilin 1 (PS1) und Nicastrin (NCT); (6) das endosomal und lysosomal lokalisierte *lysosomal associated membrane protein 1* (Lamp1), (7) Calnexin als Markerprotein des endoplasmatischen Retikulums (ER) und (8) α -Tubulin als Stellvertreter der zytosolischen Fraktion.

Wie in der Abbildung 13 dargestellt, war das α -Tubulin ausschließlich in S2 vorhanden und wies damit darauf hin, dass die isolierten Organellen nicht mit Proteinen aus dem Zytosol verunreinigt waren. Lamp1, APP, PS1 und NCT waren neben den Fraktionen 4 und 5 auch teilweise in Fraktionen höherer Dichte vorzufinden (9-12), während sich BACE größtenteils in Fraktionen 4 und 5 befand. Jedoch signalisierte die Anwesenheit von Calnexin, dass in Fraktionen niedriger Dichte (4 und 5) Endosomen mit Fragmenten des ERs gemischt vorlagen. Im Gegensatz dazu tauchte ASM nach Organellisolation nur in Fraktionen größerer Dichte (10-12) auf und colokalisierte mit Lamp1, APP, NCT sowie geringen Mengen an PS1 in Fraktion 10. Dadurch dass die Fraktion 10 weder mit Calnexin noch α -Tubulin verunreinigt war, wurde der Nachweis erbracht, dass in SH-SY5Y Zellen ASM, APP, Nicastrin und PS1 gemeinsam in den zellulären Kompartimenten Endosomen und Lysosomen vertreten waren. Bei dieser Untersuchung wurde zwischen sekretorische und konventionelle Lysosomen nicht unterschieden.

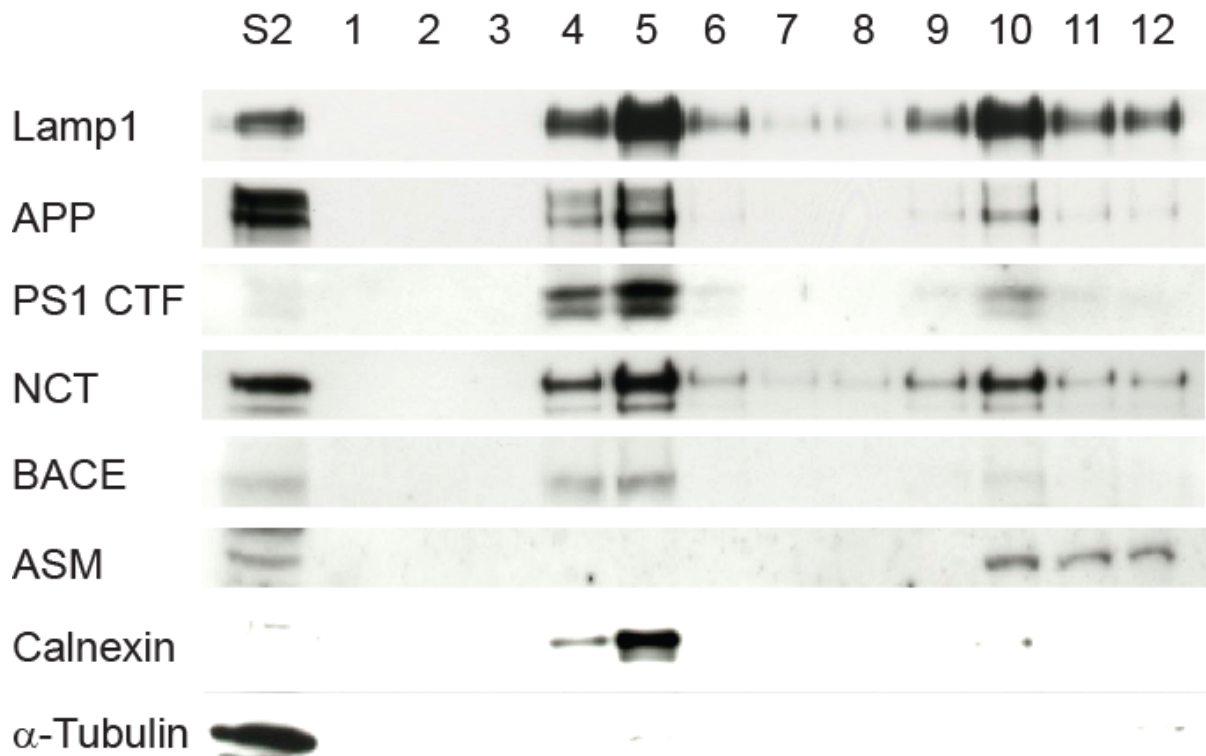


Abbildung 13: APP, ASM und γ -Sekretase colokalisieren in Endosomen und Lysosomen

Organellen wurden aus SH-SY5Y Zellen isoliert und mittels Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation in 12 Fraktionen aufgeteilt. Gemeinsam mit der zytosolischen Fraktion (S2) wurden sie im SDS-Page aufgetrennt und die Proteine *lysosomal associated membrane protein 1* (Lamp1), Amyloid-Vorläuferprotein (APP), Presenilin 1 (PS1), Nicastrin (NCT), β -Sekretase (BACE), saure Sphingomyelinase (ASM), Calnexin und α -Tubulin im *western blot* detektiert. ASM colokalisierte mit dem Endosom/Lysosommarkerprotein Lamp1, dem APP und den γ -Sekretasekomponenten PS1 und NCT in der Fraktion 10, welche nicht mit dem zytosolischen Protein α -Tubulin und dem ER-Markerprotein Calnexin verunreinigt war. CTF = C-terminales Fragment.

3.1.2 Etablierung von *asm knock down* und *app695 tg/asm knock down* SH-SY5Y

Nachdem die Colokalisation von ASM, APP und Komponenten der γ -Sekretase in Endosomen und Lysosomen ermittelt wurde, galt es herauszufinden, ob die Produktion des A β durch ASM beeinflusst wird. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden *asm knock down* (*asm-kd*) SH-SY5Y sowie *app695*-überexprimierende/*asm-kd* SH-SY5Y (*app695 tg/asm-kd*) Zelllinien etabliert. Bei der Herstellung von SH-SY5Y *asm-kd* Zellen wurden Wildtyp SH-SY5Y mit einem pCEP4-Konstrukt stabil transfiziert, welche eine *asm*-miRNA Sequenz zwecks RNA-Interferenz enthielt. Kontrollzellen (*ct-kd*) wurden mit einem pCEP4-Konstrukt, die eine nicht zum humanen Genom komplementäre miRNA transkribiert, stabil transfiziert. Der Vektor pCEP4 enthält die kodierende Sequenz für das *Emerald green fluorescent protein* (EmGFP), sodass transfizierte Zellen unter geeigneter Anregung grünes Licht emittieren (Abb. 14).

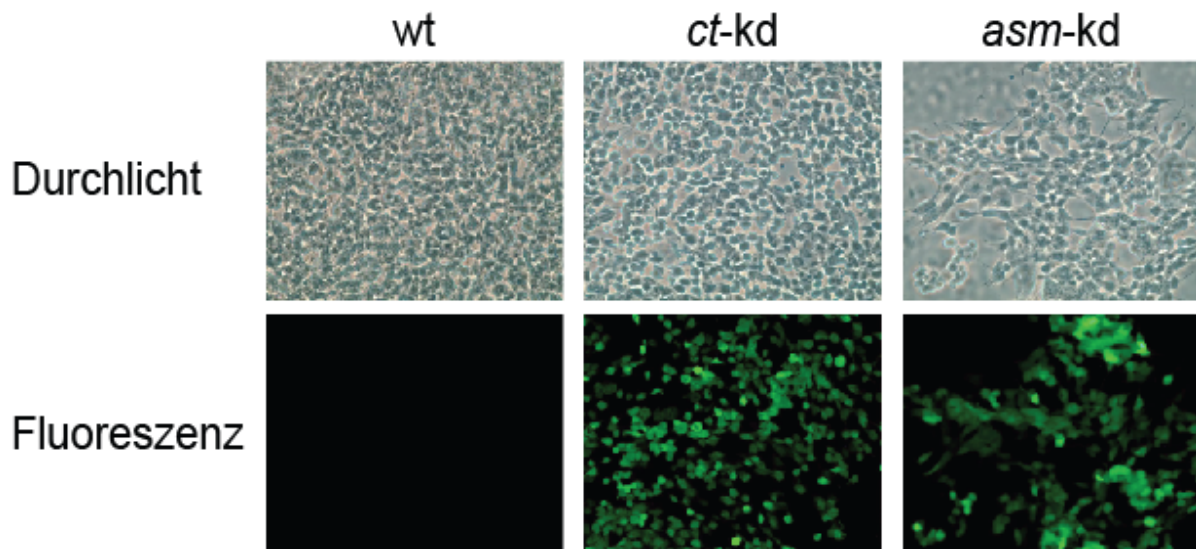


Abbildung 14: Fotografien von Wildtyp und mit pCEP4-miRNA-Konstrukten transfizierten SH-SY5Y

SH-SY5Y wurden mit einem pCEP4-*asm*-miRNA-Konstrukt (*asm-kd*) oder einem pCEP4-Konstrukt, welche eine Kontrollsequenz enthielt (*ct-kd*), stabil transfiziert. Transfizierte Zellen exprimierten das *Emerald green fluorescent protein*, wodurch sie grün fluoreszierten.

Für die Herstellung der SH-SY5Y *app695 tg/asm-kd* Zelllinie wurden Wildtyp-Zellen zunächst mit einem *app695*-überexprimierenden pEYFP-N1-Konstrukt stabil transfiziert, bevor sie im zweiten Arbeitsschritt mit pCEP4-miRNA-Konstrukten wie oben beschrieben stabil transfiziert wurden. Bei der Klonierung der humanen *app695*-Sequenz in den pEYFP-N1-Vektor wurde die ursprünglich enthaltene kodierende Sequenz für das *yellow fluorescent protein* entfernt. Daher konnte eine erfolgreiche Transfektion nicht mit optischen Hilfsmitteln nachgewiesen werden. Stattdessen wurde die Überexpression des APP695-Proteins im *western blot* überprüft (Abschnitt 3.1.3).

3.1.3 *Knock down* von *asm* verringert die Bildung von A β

Wildtyp SH-SY5Y schütten nur geringe Mengen an A β ins Kulturmedium aus. Deshalb wurde für die Untersuchung, inwiefern die *asm*-Defizienz die Bildung von A β beeinträchtigt, *app695 tg/asm-kd* SH-SY5Y Zellen verwendet. Der *knock down* Effekt der *asm*-miRNA wurde mittels *western blot* kontrolliert. In der Tat verringerte sich die ASM-Proteinmenge in den SH-SY5Y *app695 tg/asm-kd* Zellen signifikant ($\Delta 65,49\%$, $p < 0,001$), während das Kontrollplasmid keinen Effekt aufwies. Ferner ging aus den *western blot* Ergebnissen hervor, dass das sekretierte A β im Kulturüberstand nach *asm-kd* deutlich abnimmt ($\Delta 39,17\%$, $p = 0,029$), wobei die Expression des APP695-Proteins unverändert blieb.

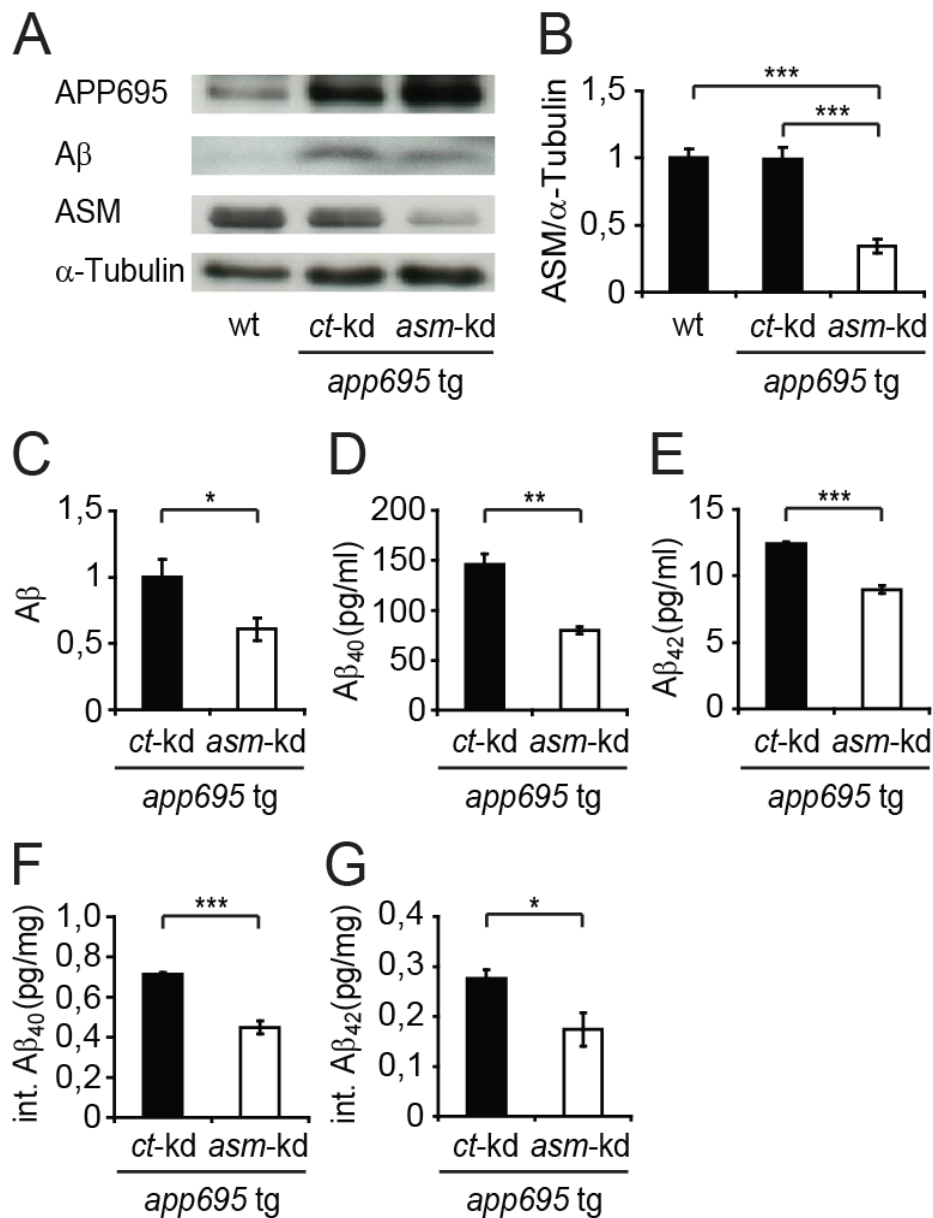


Abbildung 15: Asm knock down verringert die Aβ-Produktion

Überstand und Zellysate wurden aus SH-SY5Y *app695 tg/ct-kd* und *app695 tg/asm-kd* Zellen isoliert. (A-C) Western blot Analyse der Proteine APP695, Aβ, ASM und α-Tubulin (n ≥ 5). Die intra- und extrazelluläre Konzentrationen an Aβ₄₀ (D und F) und Aβ₄₂ (E und G) wurden mit ELISA Kits bestimmt (n ≥ 3). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Ergänzend zur speziesübergreifenden Detektion mit dem anti Aβ Antikörper W02 im *western blot* wurden ELISA Kits zur quantitativen Bestimmung der intra- und extrazellulären Konzentration von Aβ₄₀ und Aβ₄₂ eingesetzt. Zur Bestätigung der *western blot* Ergebnisse gingen die gemessenen intra- und extrazellulären Konzentrationen an Aβ₄₀ und Aβ₄₂ nach *asm-kd* signifikant zurück. Extrazelluläres Aβ₄₀ wurde um 45,19% (*ct-kd* $145,82 \pm 10,2$ pg/ml vs. *asm-kd* $79,93 \pm 3,62$ pg/ml, $p = 0,004$) und Aβ₄₂ um 27,69% (*ct-kd* $12,39 \pm 0,16$ pg/ml vs. *asm-kd* $8,97 \pm 0,31$ pg/ml, $p < 0,001$) reduziert. Der intrazelluläre Aβ₄₀-Spiegel

verringerte sich um 36,98% (*ct-kd* $0,71 \pm 0,01$ pg/mg Protein vs. *asm-kd* $0,45 \pm 0,03$ pg/mg Protein, $p < 0,001$) und der A β 42-Spiegel um 36,91% (*ct-kd* $0,27 \pm 0,02$ pg/mg Protein vs. *asm-kd* $0,17 \pm 0,03$ pg/mg Protein, $p = 0,017$). Des Weiteren wurde anhand der ermittelten A β - und Proteinkonzentrationen Rückschlüsse auf das Sekretionsverhalten der SH-SY5Y nach *ct-kd* und *asm-kd* gezogen. In beiden Zelllinien verblieb nur ein sehr geringer Teil des gebildeten A β in den Zellen (*ct-kd* 0,04% vs. *asm-kd* 0,06%). Zusammenfassend führten diese Daten zu der Annahme, dass die *asm*-Defizienz lediglich die Produktion und nicht die Sekretion des A β unterdrückte.

3.1.4 *Asm*-Defizienz schwächt die Aktivität der γ -Sekretase

Bei der Prozessierung des APP wird zwischen dem nicht-amyloidogenen und dem amyloidogenen Weg unterschieden. Der nicht-amyloidogene Weg beinhaltet die Spaltung des APP durch die α - und γ -Sekretase, wodurch die Produkte sAPP α , p3 und *amyloid precursor protein intracellular c-terminal domain* (AICD) entstehen. Der amyloidogene Weg verläuft über den enzymatischen Verdau des APP durch die β - und γ -Sekretase und als Produkte entstehen sAPP β , A β und AICD. Somit bot die Untersuchung der Aktivitäten dieser drei Sekretasen die Möglichkeit, die Ursache für die reduzierte A β -Produktion infolge der *asm*-Defizienz herauszufinden.

Für die Evaluation der α - und β -Sekretasenaktivitäten wurden die primäre Spaltungsprodukte sAPP α und C99 (= A β +AICD) im *western blot* detektiert. Das von dem anti A β Antikörper (Klon W02) erkannte Epitop umschließt die Aminosäuren 5-9 innerhalb der A β -Sequenz, sodass Kreuzreaktionen mit sAPP β und C83 (= p3+AICD) vermieden wurden. Nach *asm-kd* wurden keine Veränderungen der α - und β -Sekretasenaktivitäten im *western blot* beobachtet (Abb. 16 A-B). Ergänzend dazu wurden Fluoreszenz basierte Assays verwendet, um die Aktivitäten der β - und γ -Sekretasen in Abhängigkeit der Zeit aufzulösen. Dabei wurde die Membranfraktion aus SH-SY5Y *ct-kd* und *asm-kd* Zellen oder Mausgehirnen verschiedener *asm*-Genotypen isoliert und mit Substraten inkubiert, deren Spaltungsprodukte fluoreszierten. Als Bestätigung des *western blot* Ergebnisses blieben die Aktivitäten der β -Sekretase sowohl auf zellulärer Ebene nach *asm-kd* als auch in *asm*-defizienten Mäusen im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrolle unverändert (Abb. 16 C und E). Dagegen traten signifikante Verminderungen der γ -Sekretaseaktivität im Zuge der *asm*-Defizienz in Zellen und Mausgehirnen auf (Abb. 16 D und F). Im Vergleich zu *ct-kd* zeigte SH-SY5Y *asm-kd* eine

durchschnittliche Schwächung der γ -Sekretaseaktivität von 11,2% ($p < 0,001$) innerhalb der siebenstündigen Inkubationsperiode. In $asm^{-/-}$ Mausgehirnen ($asm^{+/+}$ vs. $asm^{-/-}$ $\Delta 17,01\%$, $p < 0,001$) nahm die γ -Sekretaseaktivität stärker als in Proben ihrer $asm^{+/+}$ Geschwister ($asm^{+/+}$ vs. $asm^{-/-}$ $\Delta 9,46\%$, $p < 0,001$) ab. Die Ergebnisse aus der Untersuchung der Sekretasenaktivitäten suggerierten, dass die verringerte A β -Produktion auf eine Inhibition der γ -Sekretaseaktivität zurückzuführen war.

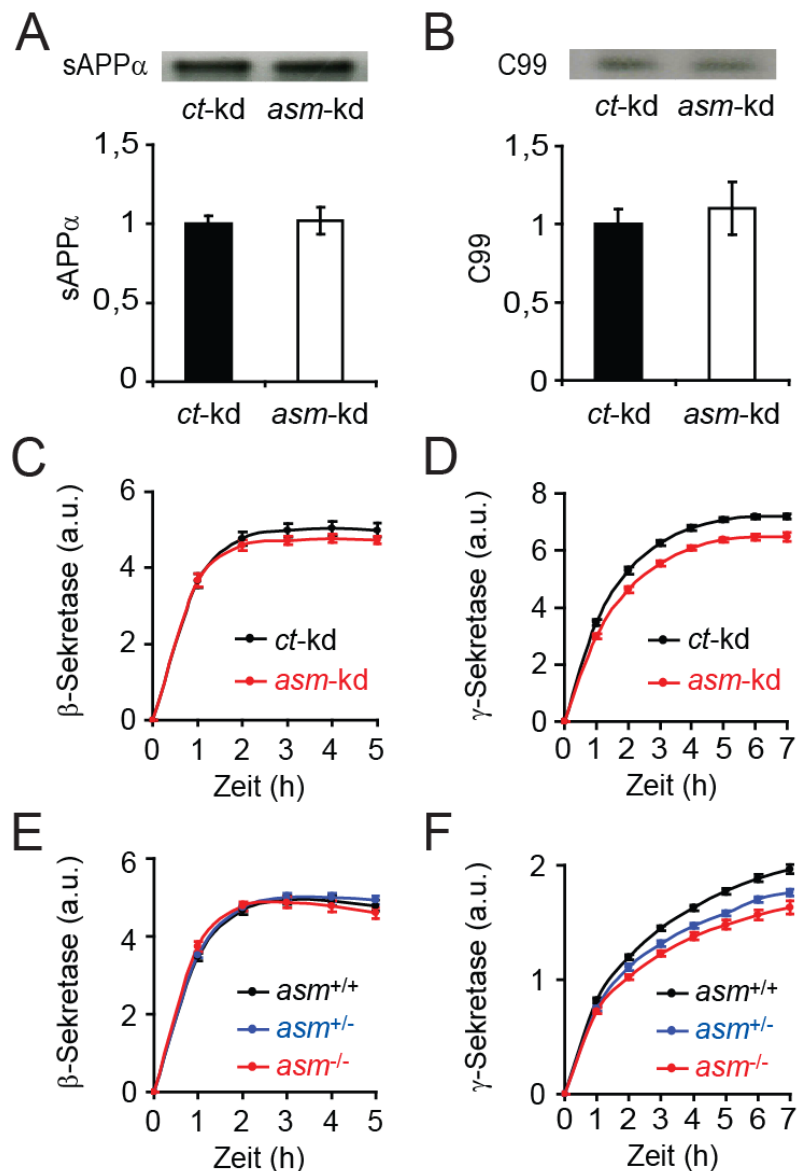


Abbildung 16: Asm-Defizienz schwächt die Aktivität der γ -Sekretase

Die Mengen der APP-Spaltprodukte sAPP α (A) und C99 (B) aus SH-SY5Y *ct-kd* und *asm-kd* Zellen wurden in *western blot* ermittelt ($n = 3$). Außerdem wurden die Aktivitäten der β - und γ -Sekretasen aus Zellen (C und D) und Mausgehirnen (E und F) in Abhängigkeit der Zeit evaluiert. Es wurden keine Veränderungen der β -Sekretaseaktivität festgestellt. Hingegen wurde die γ -Sekretaseaktivität sowohl in SH-SY5Y *asm-kd* Zellen ($n = 4$, $p < 0,001$) als auch in *asm*-defizienten Mäusen ($n \geq 7$ je Gruppe, $p < 0,001$ für *asm^{+/-}* und *asm^{-/-}*) signifikant reduziert. a. u. = *arbitrary unit*, willkürliche Einheit.

3.1.5 Analyse der Sekretasekomponenten

Auf der Suche nach der Ursache, durch welchen molekularen Mechanismus die *asm*-Defizienz eine Inhibition der γ -Sekretaseaktivität hervorrief, wurden die Proteinmengen von BACE, PS1 und NCT in SH-SY5Y und Mausgehirnen quantifiziert. Im Mausgehirn wurden zusätzlich die Expression aller Komponenten der γ -Sekretase (*ps1*, *ps2*, *pen2*, *nct*, *aph1- α* und *aph1- β*) mittels Real-Time-quantitative-PCR ermittelt. Weder in SH-SY5Y *asm*-kd Zellen noch in *asm*-defizienten Mäusen wurden Abweichungen der BACE, PS1 und NCT Proteinmengen festgestellt (Abb. 17 und 18 A). Auch auf transkriptioneller Ebene unterschieden sich die Expressionen der γ -Sekretasekomponenten in *asm*^{+/+} und *asm*^{-/-} Mäusen unwesentlich (Abb. 18 B).

3.1.6 *Asm knock down* und Proteintransport

In der Literatur wurden einige Proteine, beispielsweise *sorting protein-related receptor* (sorLa), *LDL receptor class A domain containing 3* (LRAD3) oder *huntingtin associated protein 1* (HAP1), als Regulatoren des APP-Transports identifiziert (Andersen et al., 2005; Ranganathan et al., 2011; Yang et al., 2012). Sie üben direkten Einfluss darauf, ob die Prozessierung des APP amyloidogen oder nicht amyloidogen abläuft. Die Ergebnisse aus dem Abschnitt 3.1.1 belegten, dass ASM, APP und γ -Sekretase in Endosomen und Lysosomen der SH-SY5Y colokalisieren. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die *asm*-Defizienz den Transport des APP oder der γ -Sekretasekomponenten zu den Endosomen und Lysosomen störte. Wie zuvor beschrieben wurden die Organellen aus SH-SY5Y *ct*-kd und *asm*-kd isoliert, mit Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und die Proteine Lamp1, APP, PS1, NCT, ASM, Calnexin und α -Tubulin im *western blot* immundetektiert (Abb. 19). Im Vergleich zwischen SH-SY5Y *ct*-kd und *asm*-kd fiel auf, dass die ASM nach *asm*-kd nur noch sehr schwach in der Fraktion mit der höchsten Dichte sichtbar war, während es beim *ct*-kd in den Fraktionen 10-12 (wie Wildtyp SH-SY5Y) auftauchte. Diese Verschiebung der ASM hatte weder einen Effekt auf die Menge noch auf die Verteilung der Proteine APP, PS1 und NCT. Das Ergebnis führte zu der Erkenntnis, dass ASM nicht an der Regulation des Transports von APP oder der γ -Sekretase in die hier angereicherte endo-/lysosomale Fraktionen beteiligt war.

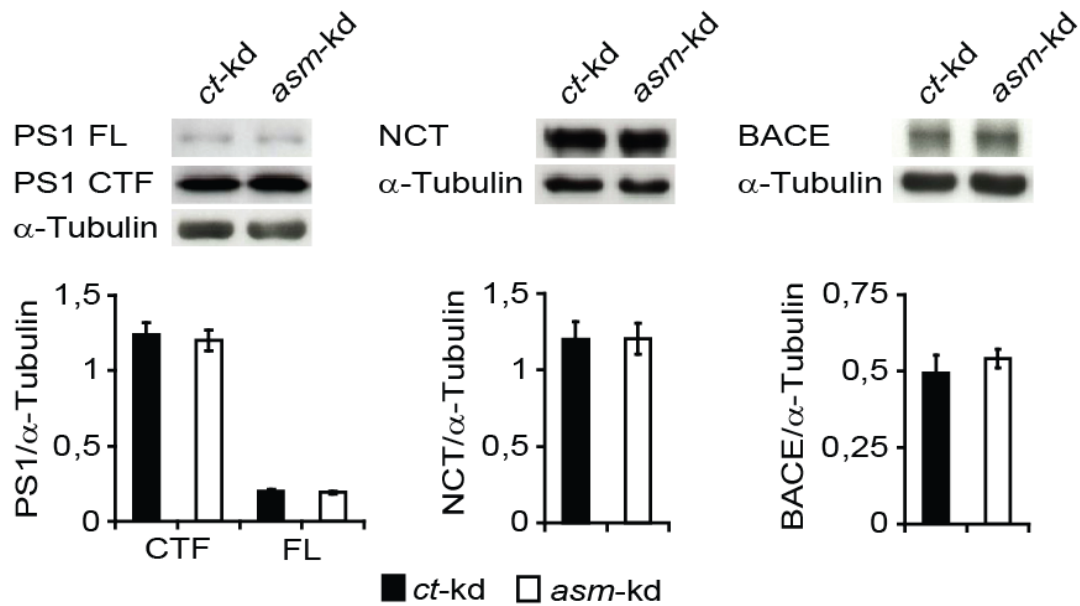


Abbildung 17: Analyse der Sekretasekomponenten in SH-SY5Y knock down Zellen

Die Proteinmengen der β -Sekretase (BACE) und der γ -Sekretasekomponenten Presenilin 1 (PS1) und Nicastrin (NCT) aus Lysaten von SH-SY5Y *ct-kd* und *asm-kd* Zellen wurden via *western blot* quantifiziert (n = 5).

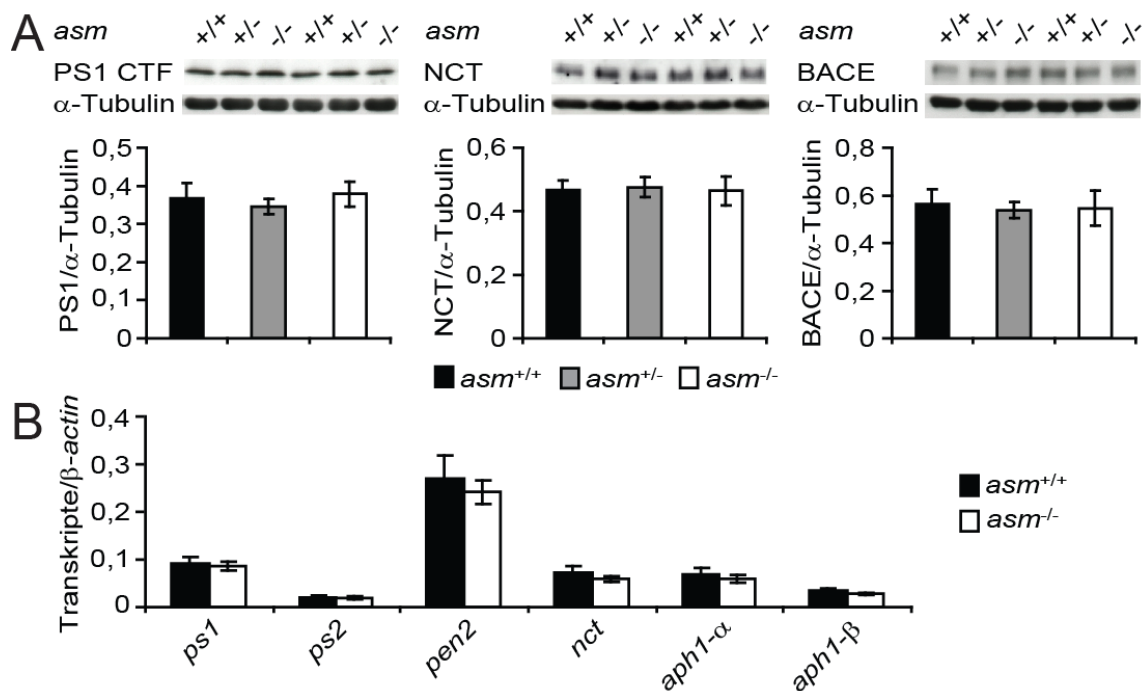


Abbildung 18: Analyse der Sekretasekomponenten in *asm*^{+/+}, *asm*^{+/-} und *asm*^{-/-} Mäusegehirnen

(A) Die Proteinmengen der β -Sekretase (BACE) und der γ -Sekretasekomponenten Presenilin 1 (PS1) und Nicastrin (NCT) aus Hirnhomogenaten von *asm*^{+/+}, *asm*^{+/-} und *asm*^{-/-} Mäusen wurden via *western blot* quantifiziert (n \geq 7 je Gruppe). (B) Expressionsanalyse der γ -Sekretasekomponenten *presenilin 1* (*ps1*), *presenilin 2* (*ps2*), *presenilin enhancer 2* (*pen2*), *nicastrin* (*nct*), *anterior pharynx defective 1- α* (*aph1- α*) und *anterior pharynx defective 1- β* (*aph1- β*) in *asm*^{+/+} und *asm*^{-/-} Mäusen (n = 4 je Gruppe).

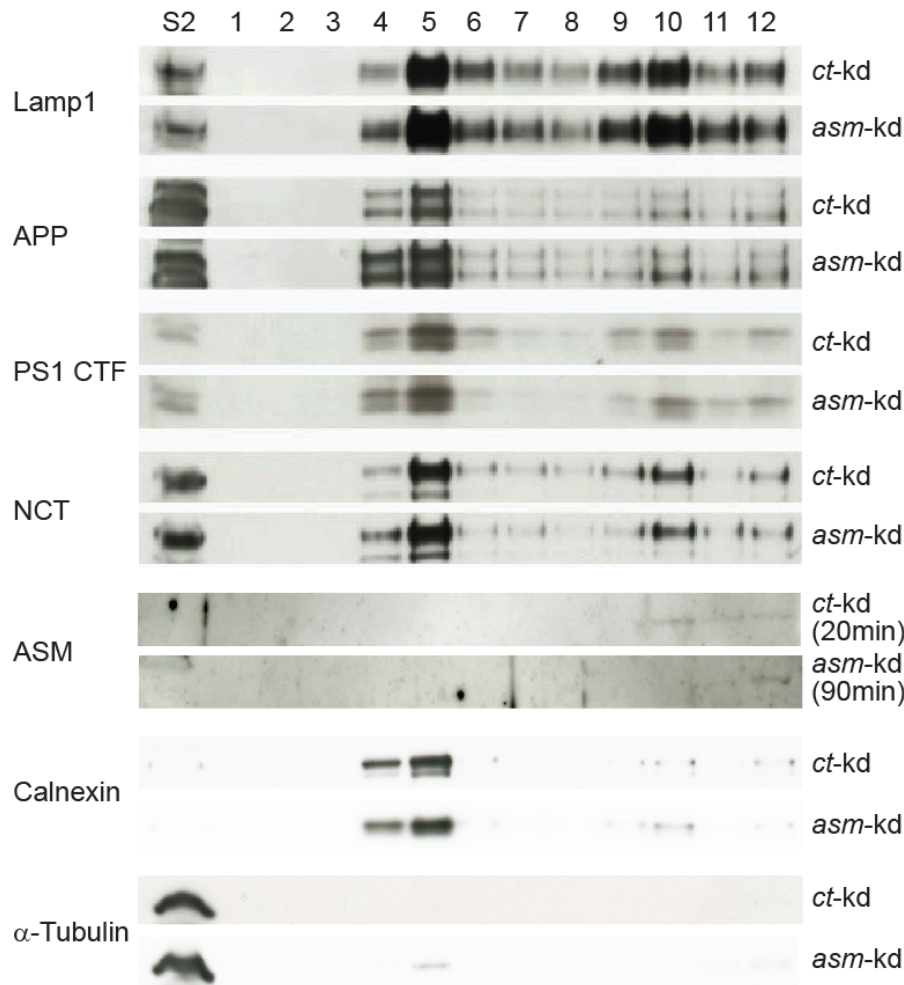


Abbildung 19: *Asm knock down* hat keinen Einfluss auf den Transport von APP und γ -Sekretase

Organellen wurden aus SH-SY5Y *ct-kd* und *asm-kd* Zellen isoliert und mittels Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation in 12 Fraktionen aufgeteilt. Gemeinsam mit der zytolischen Fraktion (S2) wurden sie im SDS-Page aufgetrennt und die Proteine *lysosomal associated membrane protein 1* (Lamp1), Amyloid-Vorläuferprotein (APP), Presenilin 1 (PS1), Nicastrin (NCT), β -Sekretase (BACE), saure Sphingomyelinase (ASM), Calnexin und α -Tubulin im *western blot* detektiert. Nach *asm-kd* war das ASM-Protein nach sehr langer Exposition nur in der Fraktion höchster Dichte sichtbar. Jedoch hatte die Verschiebung der ASM keine Auswirkung auf die Verteilung der anderen Proteine.

3.1.7 Aktivität der γ -Sekretase ist unabhängig vom Ceramidgehalt

Die zelluläre Funktion der ASM besteht darin, die Spaltung des Sphingomyelins zu Ceramid und Phosphorylcholin zu katalysieren. Ein *knock down* dieses Enzyms und die damit verbundene Reduktion der enzymatischen Aktivität führen unweigerlich zur Abnahme des Ceramidgehalts. Um eine mögliche Verbindung zwischen γ -Sekretaseaktivität und Ceramidgehalt zu überprüfen, wurde zunächst mit einem Ceramid-spezifischen Antikörper im *dot blot* getestet, ob sich die zelluläre Menge an Ceramiden nach *asm-kd* abwich. Tatsächlich resultierte der *asm-kd* in eine signifikante Verminderung des Ceramidgehalts ($\Delta 19,59\%$, $p = 0,03$) (Abb. 20 A).

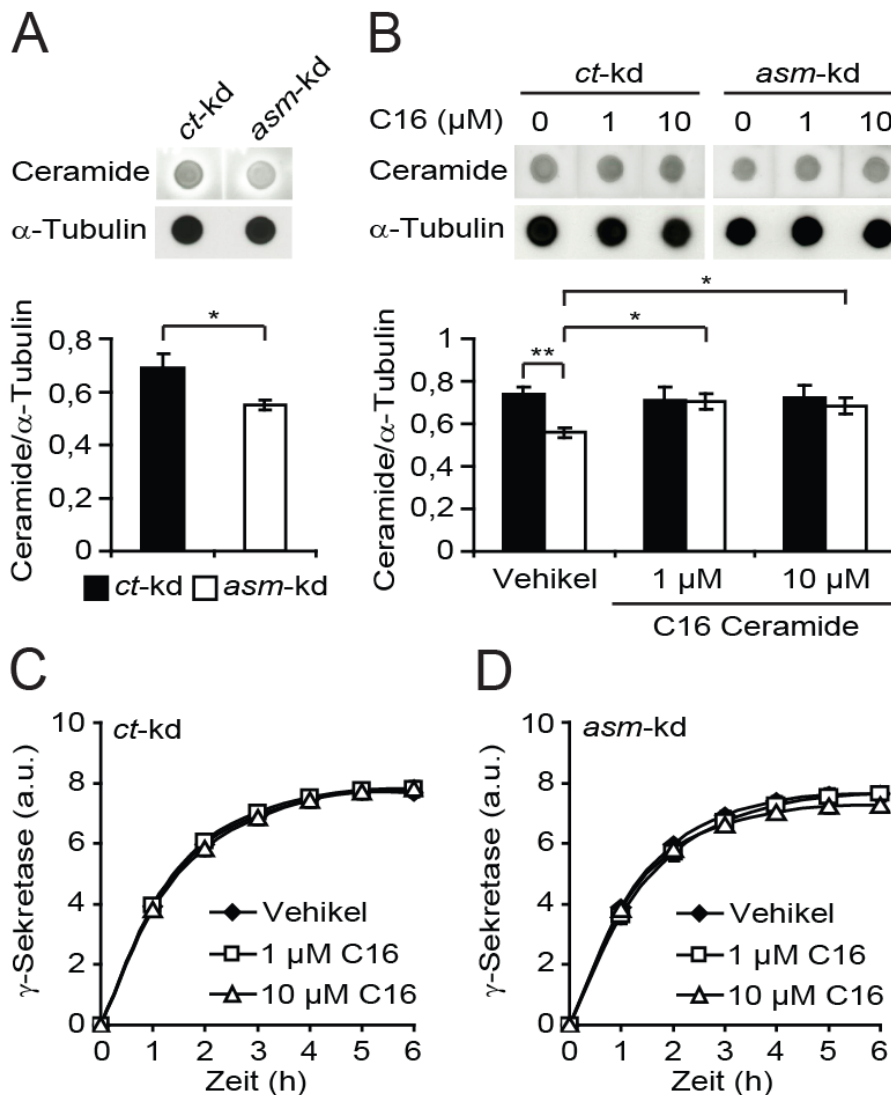


Abbildung 20: γ -Sekretase arbeitet unabhängig von Ceramiden

(A) *Dot blot* Analyse des zellulären Ceramidgehalts nach *asm-kd* in SH-SY5Y (n = 4; ohne Ceramidstandard). (B) SH-SY5Y *ct-kd* und *asm-kd* Zellen wurden für 24 h mit Vehikel, 1 μ M oder 10 μ M C16-Ceramiden supplementiert. C16-Supplementation füllt die fehlende Ceramidmenge in *asm-kd* Zellen vollständig auf, sodass sie das Niveau von *ct-kd* Zellen erreichte (n = 4; ohne Ceramidstandard). (C und D) Die Aktivitäten der β - und γ -Sekretasen nach C16-Supplementation wurden in SH-SY5Y *ct-kd* und *asm-kd* Zellen ermittelt (n = 4). a. u. = *arbitrary unit*, willkürliche Einheit. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Dann wurden SH-SY5Y *ct-kd* und *asm-kd* Zellen für 24 h mit 1 μ M oder 10 μ M C16-Ceramiden, welches den Hauptteil aller endogenen Ceramidspezies einnimmt, supplementiert. Interessanterweise konnte die fehlende Ceramidmenge in *asm-kd* Zellen durch die Supplementation wieder vollständig aufgefüllt werden, wobei beide C16-Konzentrationen wirksam schienen (*ct-kd*+Vehikel vs. *asm-kd*+Vehikel $\Delta 24,45\%$, $p = 0,009$; *ct-kd*+1 μ M C16 vs. *asm-kd*+1 μ M C16 $\Delta 0,68\%$; *ct-kd*+10 μ M C16 vs. *asm-kd*+10 μ M C16 $\Delta 2,73\%$). Die Ceramidmenge in den *ct-kd* Zellen nahm trotz Supplementation nicht zu (Abb. 20 B). Jedoch ergab die Analyse der γ -Sekretaseaktivität in den *asm-kd* Zellen, dass die Erhöhung des

Ceramidgehalts keineswegs eine Verstärkung der γ -Sekretaseaktivität nach sich zog (Abb. 20 D). Auch in den *ct-kd* Zellen wurden keine Veränderungen nach C16-Supplementation registriert (Abb. 20 C). Die γ -Sekretase arbeitet folglich Ceramid unabhängig.

3.1.8 *Asm knock down* führt zur Akkumulation von Sphingomyelin

Das Substrat der ASM, das Sphingomyelin, wird auch als Phosphosphingolipid klassifiziert, weil es aus dem Sphingosin, einer Fettsäure und einem Lipid wie Phosphorylcholin oder Phosphorylethanolamin besteht. Gemeinsam mit Cholesterin und Phosphoglyceride gehört das Sphingomyelin zu den wichtigsten Lipidklassen der Zellmembran. Zur Detektion des Sphingomyelins wurden Zelllysate auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen und mit Lysenin, einem Sphingomyelin spezifischen Bindeprotein, inkubiert. Nachdem das Lysenin sich ans Sphingomyelin angeheftet hatte, wurde es mit einem anti Lysenin Antikörper immundetektiert, um Rückschlüsse auf den Sphingomyelingehalt zu ziehen. Patienten, die unter der Niemann-Pick-Krankheit leiden, akkumulieren große Mengen an Sphingomyelin in Lysosomen (Levade et al., 1988; Maor et al., 1995). Ähnlich verhielten sich SH-SY5Y nach *asm-kd*. Die zelluläre Menge an Sphingomyelin war in SH-SY5Y *asm-kd* Zellen verglichen mit *ct-kd* Zellen wesentlich erhöht ($\Delta 83,19\%$, $p = 0,009$) (Abb. 21).

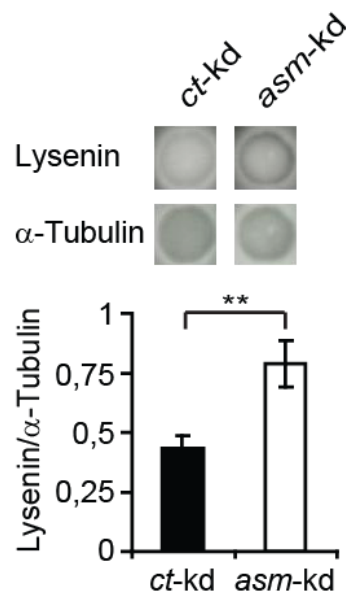


Abbildung 21: Akkumulation des Sphingomyelin in SH-SY5Y *asm-kd* Zellen

Für die Bestimmung des Sphingomyelingehalts wurden Lysate aus SH-SY5Y *ct-kd* und *asm-kd* Zellen auf eine Nitrozellulosemembran gespottet. Das applizierte Lysenin heftete sich spezifisch ans Sphingomyelin und wurde nachfolgend mit einem anti Lysenin Antikörper detektiert, um auf den Sphingomyelingehalt zurückzuschließen (n = 3; ohne Sphingomyelinstandard). ** $p \leq 0,01$.

3.1.9 Veränderungen an den *lipid rafts* in *asm*-defizienten Mäusen

Als *lipid rafts* werden kleine inselartige Mikrodomänen innerhalb der Zellmembran, die erhöhte Konzentrationen an Cholesterin und Phosphosphingolipiden aufweisen, bezeichnet (Alison Davis, 2005). Es ist bekannt, dass die aktive γ -Sekretase in den *lipid rafts* lokalisiert ist (Vetrivel et al., 2004; Hur et al., 2008). Die Akkumulation des Sphingomyelins, hervorgerufen durch die *asm*-Defizienz, warf die Frage auf, inwiefern eine Anreicherung dieses Bestandteils die Eigenschaften der *lipid rafts* beeinträchtigen würde und dadurch zu einer Inhibition der γ -Sekretaseaktivität führen könnte. Eine gängige Methode zur Untersuchung der *lipid rafts* stellt die Isolation Detergens resistenter Membranen (DRM) dar. Für die Isolation von DRM aus Maushirngewebe wurden Triton X-100 und Chapso supplementierte Pufferlösungen eingesetzt und die DRM mittels Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation von den restlichen Membranbestandteilen getrennt. Die Proteinkonzentration jeder Fraktion wurde gemessen und anschließend folgende Proteine im *western blot* immundetektiert: (1) Flotillin 1 (Flot1) als *lipid raft* Markerprotein; (2 und 3) PS1 und NCT als Komponenten der γ -Sekretase sowie (4) das Calnexin als Markerprotein des ER.

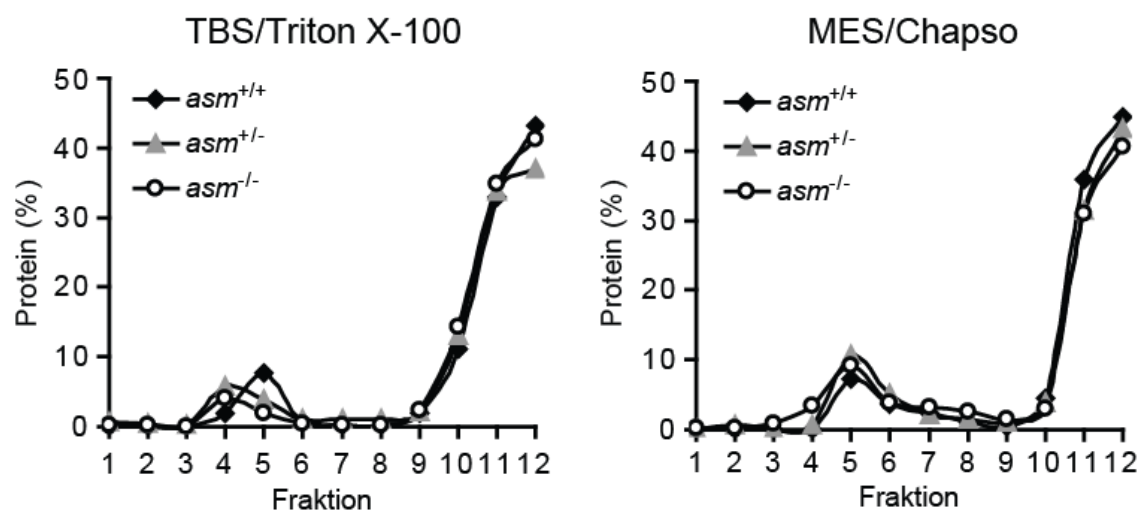


Abbildung 22: Proteinverteilung unterschiedlicher Isolationsverfahren

Die Isolation der Detergens resistenter Membranen mit Hilfe Detergentien supplementierten Pufferlösungen TBS/Triton X-100 und MES/Chapso ergab, dass ein geringe Menge der Proteine sich in den Fraktionen 4 und 5 (Triton X-100) bzw. Fraktion 4-6 (Chapso) befanden, während der Hauptteil sich in Fraktionen größerer Dichte konzentrierten. Die Proteinmenge der einzelnen Fraktionen wurde mit der Bradford-Methode kalkuliert.

Der Hauptteil der Proteine lag in Fraktionen größerer Dichte und ein kleiner Anteil sammelte sich in den Fraktionen 4 und 5 (Triton X-100) bzw. Fraktionen 4-6 (Chapso). Interessanterweise zeigte die Proteinverteilung aus der Isolation mit Triton X-100, dass sich

bei *asm*^{+/+} Mäusen mehr Proteine in der Fraktion 5 als Fraktion 4 befanden, während sich die Situation in den *asm*^{+/-} und *asm*^{-/-} Tieren umgekehrt darstellte (Abb. 22 links). Ansammlungen des Flot1 kennzeichneten die Fraktionen 4 und 5 (Triton X-100) bzw. 4-6 (Chapso) als *lipid rafts* enthaltend. Das Calnexin wurde bei beiden Isolationsvarianten ausschließlich in Fraktionen größerer Dichte (Fraktionen 10-12) gesichtet, wodurch eine erfolgreiche Trennung sichergestellt wurde. Bedingt durch die *asm*-Defizienz trat ein Shift des Flot1 von größerer zu geringerer Dichte auf, der von einer simultanen Verschiebung des PS1 begleitet wurde. Die Signale des NCT waren vergleichsweise schwach. Jedoch ist bei der Isolation mittels MBS/Chapso eine geringfügige Verschiebung des NCT von der Fraktion 5 in die Fraktion 4 nach *asm* ko zu erkennen.

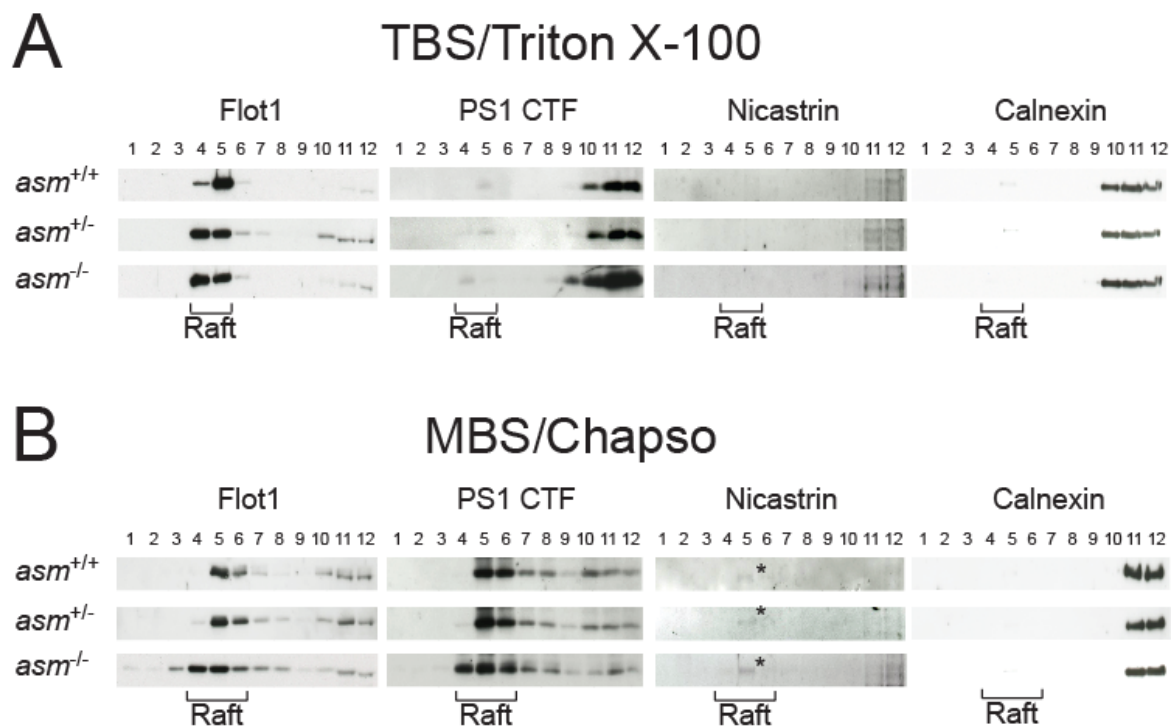


Abbildung 23: *Asm*-Defizienz vermindert die Dichte der *lipid rafts*

Detergens resistenter Membranen aus Mausgehirnen wurden mit Hilfe Detergentien supplementierten Pufferlösungen TBS/Triton X-100 (A) und MBS/Chapso (B) isoliert. Die Verteilung der Proteine Flotillin 1 (Flot1), Presenilin 1 (PS1), Nicastrin und Calnexin wurden im *western blot* überprüft. Die *asm*-Defizienz führte zu einer Verschiebung der Proteine Flot1 und PS1 zu Fraktionen geringerer Dichte. CTF = C-terminales Fragment. (Die Darstellung der Ergebnisse aus dieser Serie an Experimenten wurde auf den Abbildungen 23 und 28 aufgeteilt. Die in diesen beiden Abbildungen gezeigten Ergebnisse an Flot1 und Calnexin sind identisch).

3.1.10 *Asm*-Defizienz erhöht Resistenz der γ -Sekretase gegen Detergens

Die γ -Sekretase ist ein multimerer Proteinkomplex, dessen Aktivität von der Zusammensetzung der Membran und der Membranfluidität abhängt (Gamerding et al., 2008;

Osenkowski et al., 2008). Für Solubilisierungsexperimente wird meist das Chapso bevorzugt, weil Triton X-100 den Komplex auflöst und damit die Aktivität der γ -Sekretase inhibiert (Franberg et al., 2007). Dieser Effekt von Triton X-100 wurde ausgenutzt, um Reaktionen der γ -Sekretase von SH-SY5Y *ct-kd* und *asm-kd* Zellen in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen dieses Detergens zu testen. Die γ -Sekretaseaktivität beider Zellen ohne Zusatz von Detergens wurden gleich 100% gesetzt.

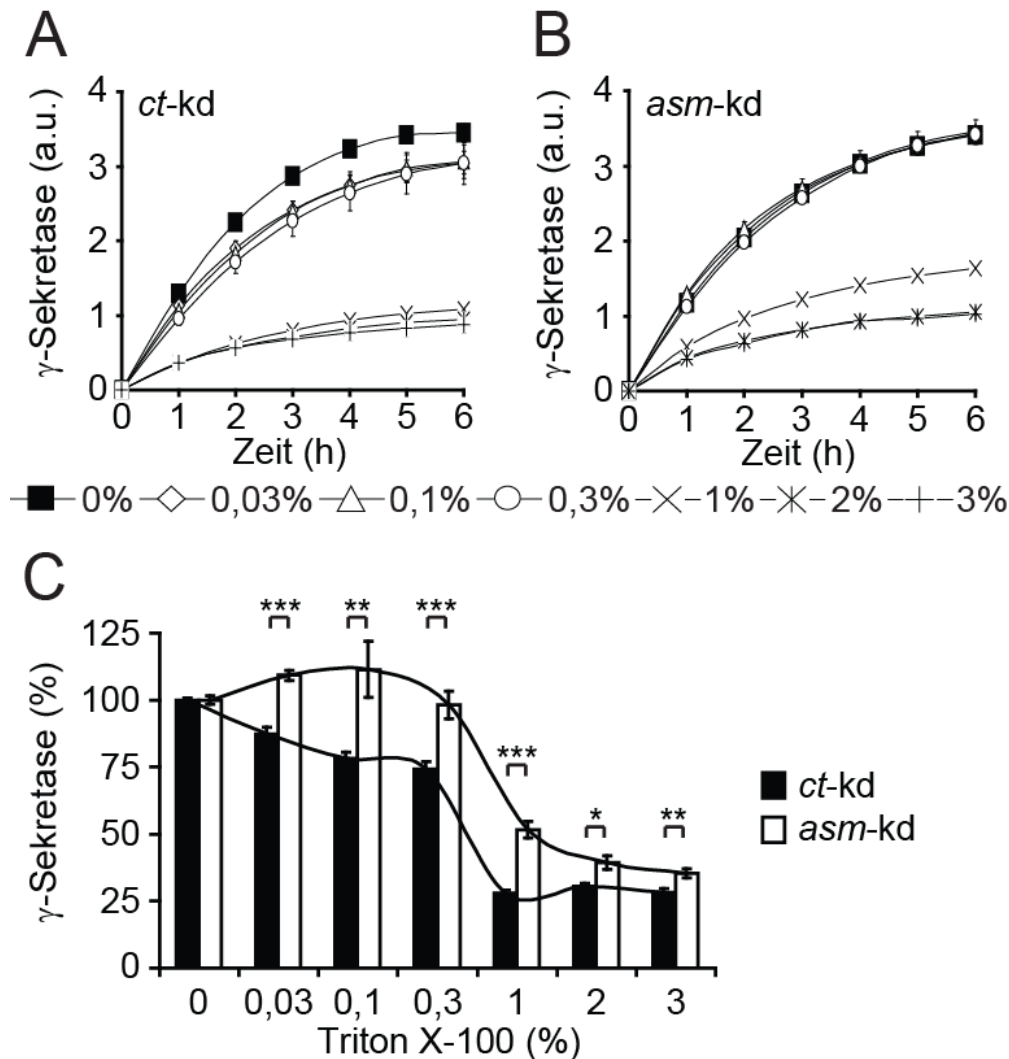


Abbildung 24: Asm-Defizienz erhöht den Widerstand der γ -Sekretase gegen Detergens

Bei der Isolation der Membranfraktion aus SH-SY5Y *ct-kd* und *asm-kd* Zellen wurde Triton X-100 in unterschiedlichen Konzentrationen (0%, 0,03%, 0,1%, 0,3%, 1%, 2% und 3%) hinzugefügt. (A) Die Behandlung mit dem Triton X-100 inhibierte die Aktivität der γ -Sekretase in den *ct-kd* Zellen auf einer dosisabhängigen Art und Weise (n = 4). (B) Hingegen zeigten *asm-kd* Zellen bei geringen Triton X-100 Konzentrationen ($\leq 0,3\%$) keine Reduktion der γ -Sekretaseaktivität (n = 4). (C) Vergleich zwischen SH-SY5Y *ct-kd* und *asm-kd* zum Zeitpunkt 1 h. Die γ -Sekretaseaktivität ohne Zusatz des Detergens wurde zweck eines günstigeren Vergleichs bei beiden Zelllinien gleich 100% gesetzt. Ab 1% Triton X-100 wurde die γ -Sekretaseaktivität in beiden Zelllinien stark verringert. Jedoch erwies sich die γ -Sekretase der *asm-kd* Zellen bei allen getesteten Triton X-100 Konzentrationen als widerstandsfähiger. a. u. = *arbitrary unit*, willkürliche Einheit. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Die Behandlung mit dem Detergens führte bei SH-SY5Y *ct*-kd zu einer dosisabhängigen Verringerung der γ -Sekretaseaktivität (Abb. 24 A). In SH-SY5Y *asm*-kd hingegen wurde sie bei geringen Triton X-100 Konzentrationen ($\leq 0,3\%$) nicht reduziert oder sogar leicht erhöht (Abb. 24 B). Sobald die Triton X-100 Konzentration 1% übersteigt, verlor die γ -Sekretase in beiden Zellarten den Großteil ihrer Aktivität. Aber in *asm*-kd Zellen lag bei allen getesteten Triton X-100 Konzentrationen eine signifikant höhere γ -Sekretaseaktivität vor (Abb. 24 C). Dieses Ergebnis liefert einen wichtigen Hinweis darauf, dass ein *knock down* der ASM die Resistenz der zellulären Membranen gegenüber Solubilisierung durch das Detergens Triton X-100 beeinflusst.

3.2 Die Rolle der ASM bei der Inflammation und Phagozytose

3.2.1 Etablierung von *asm knock down* THP-1

Neben den extrazellulären Ablagerungen des A β stellt die chronische Entzündung ein wesentliches Merkmal der Alzheimer-Krankheit (*Alzheimer's disease*, AD) dar. Für die funktionelle Analyse der ASM im Hinblick auf die Inflammation wurde die humane Monozytenzelllinie THP-1 als zelluläres Modellsystem ausgewählt und eine THP-1 *asm*-kd Zelllinie etabliert. Wie zuvor für die Herstellung von SH-SY5Y *asm*-kd beschrieben, wurden THP-1 Zellen mit einem pCEP4-*asm*-miRNA-Konstrukt oder dem dazugehörigen Kontrollplasmid stabil transfiziert. Positiv transfizierte Zellen emittierten unter geeigneter Anregung grünes Licht (Abb. 25 A). Für den Nachweis des *knock down* Effekts wurde aus THP-1 *ct*-kd und *asm*-kd Zellen RNA isoliert und Zelllysate angefertigt. Die Ergebnisse aus der Real-Time-quantitative-PCR und dem *western blot* belegten, dass sowohl die *asm*-Transkripte ($\Delta 58,52\%$, $p < 0,001$) als auch das ASM-Protein ($\Delta 59,21\%$, $p = 0,005$) nach Transfektion des pCEP4-*asm*-miRNA-Konstruktes erfolgreich vermindert werden konnten (Abb. 25 B und C).

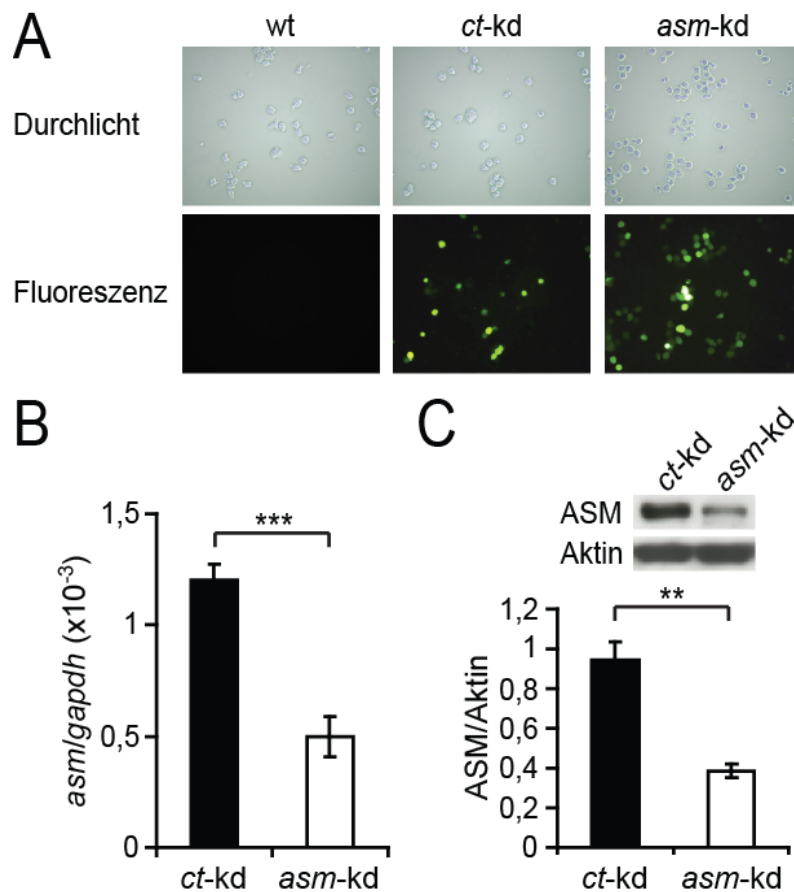


Abbildung 25: Etablierung der THP-1 *ct-kd* und *asm-kd* Zelllinien

(A) THP-1 wurden mit einem pCEP4-*asm*-miRNA-Konstrukt (*asm-kd*) oder einem pCEP4-Kontrollkonstrukt (*ct-kd*) stabil transfiziert, wodurch sie grünes Licht emittierten. Der *knock down* Effekt wurde anhand der *asm*-Transkripte (B) und der ASM-Proteinmenge (C) nachgewiesen (n = 3). ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3.2.2 *Asm knock out* verstärkt die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und *chemokine (C-C motif) ligand 2* (CCL-2, auch bekannt als *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1)) sind prominente Vertreter proinflammatorischer Zytokine. Die ASM gilt als negativer Regulator der Lipopolysaccharide (LPS)-induzierten TNF- α -Sekretion, indem sie die Aktivität der Metalloprotease *TNF- α converting enzyme* (TACE) supprimiert (Rozenova et al., 2010). Über einen möglichen Effekt der *asm*-Defizienz auf die CCL-2-Sekretion ist gegenwärtig nichts bekannt. Für die Überprüfung und Erweiterung der Ergebnisse aus der Literatur wurden primäre murine Makrophagen oder THP-1 Zellen mit dem TLR4-Ligand LPS, dem TLR1/2-Ligand Pam3CSK4 oder aggregiertem A β 2 stimuliert. Kommerzielle ELISA Kits wurden zur quantitativen Bestimmung der TNF- α - und CCL-2-Sekretion verwendet. Die Ausschüttung von TNF- α war in *asm*^{-/-} Makrophagen ($p < 0,001$ für alle getesteten Stimulanzen in zwei

Konzentrationen) nach Stimulation durch A β 42, LPS oder Pam3CSK4 signifikant verstärkt, während die Werte zwischen *asm*^{+/+} und *asm*^{+/-} Makrophagen vergleichbar waren (Abb. 26 A). ELISA mit Überständen LPS oder Pam3CSK4 stimulierter THP-1 *ct*-kd und *asm*-kd Zellen kam zum gleichen Resultat (*p* < 0,001 für beide Stimulanzen) (Abb. 26 C). Die Freisetzung von CCL-2 war in *asm*^{-/-} Makrophagen ebenfalls deutlich erhöht (5 und 10 μ M A β 42 *p* = 0,002; 1 ng/ml LPS *p* = 0,006; 10 ng/ml LPS *p* < 0,001; 1 ng/ml Pam3CSK *p* = 0,047; 10 ng/ml Pam3CSK *p* = 0,026) (Abb. 26 B). Lediglich nach Stimulation durch 10 ng/ml Pam3CSK4 konnte ein Unterschied zwischen *asm*^{+/+} und *asm*^{+/-} Makrophagen festgestellt werden (*p* = 0,008). Somit demonstrierten die ELISA Ergebnisse, dass die ASM nicht nur die LPS-induzierte TNF- α -Sekretion negativ reguliert, sondern auch die Stimulation weiterer Liganden wie Pam3CSK4 oder A β 42 blockiert. Darüber hinaus wurde der inhibitorische Effekt der ASM auf die CCL-2-Sekretion nachgewiesen.

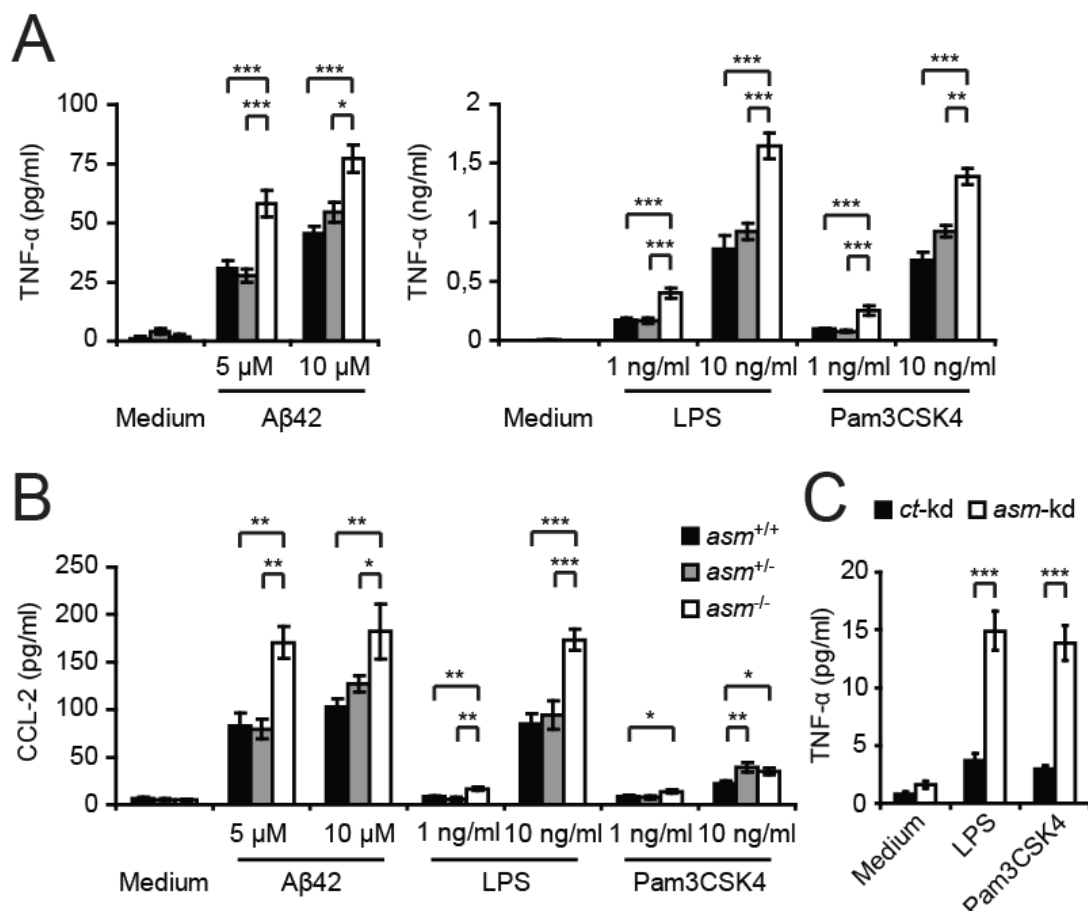


Abbildung 26: Asm-Defizienz verstärkt die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine

(A und B) Primäre murine Makrophagen wurden mit A β 42 (5 und 10 μ M), LPS (1 und 10 ng/ml) oder Pam3CSK4 (1 und 10 ng/ml) für 24 h stimuliert. (C) THP-1 *ct*-kd und *asm*-kd Zellen wurden mit 1 μ g/ml LPS oder Pam3CSK4 für 24 h stimuliert. Die Konzentration der freigesetzten Zytokine TNF- α und CCL-2 im Zellüberstand wurden mit ELISA Kits bestimmt (*n* \geq 5). * *p* \leq 0,05, ** *p* \leq 0,01, *** *p* \leq 0,001.

3.2.3 Inflammation und Aktivierung der MAP-Kinase-Wege

Die Familie der *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) umfasst eine Reihe kleiner Serin/Threonin-Kinasen, die unter anderem die Embryogenese, die Inflammation, die Proliferation, die Differenzierung und den Zelltod regulieren (Pearson et al., 2001). Als MAP-Kinase-Wege werden mehrstufige Signalkaskaden bezeichnet, in denen mindestens drei Kinasen seriell durch Phosphorylierungen aktiviert werden. Am Ende der Signaltransduktionsketten stehen drei prominente MAPKs: (1) p38 ($\alpha/\beta/\gamma/\delta$), (2) *c-Jun N-terminal kinases* (JNKs) und (3) *extracellular-signal-regulated kinases* (ERKs), deren Phosphorylierungsgrad in den *asm*^{+/+} und *asm*^{-/-} Makrophagen nach Stimulation mit LPS oder Pam3CSK4 betrachtet wurden. Zum Vergleich wurde der Phosphorylierungsgrad des Akt (auch als Proteinkinase B bekannt), das eine wichtige Rolle in den zellulären *survival pathways* durch Inhibition der Apoptose einnimmt, ermittelt. In den LPS-stimulierten *asm*^{-/-} Makrophagen wurden p38 und JNKs sowohl stärker als auch früher phosphoryliert (Abb. 27 A). Phosphorylierungen der ERKs wurden nicht festgestellt, weshalb sie nicht gezeigt wurden. Akt-Phosphorylierung unterschied sich in den *asm*^{+/+} und *asm*^{-/-} Makrophagen nicht.

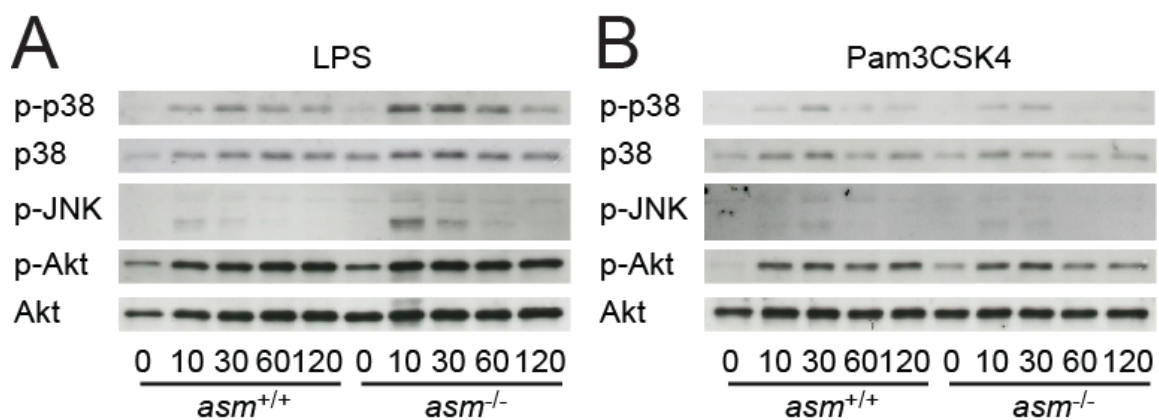


Abbildung 27: Aktivierungen der MAP-Kinase-Wege nach Stimulation mit LPS und Pam3CSK4

Western blot Analyse der MAPK-Phosphorylierungen von *asm*^{+/+} und *asm*^{-/-} Makrophagen, die mit 10 ng/ml LPS (A) oder 100 ng/ml Pam3CSK4 (B) für 10, 30, 60 und 120 min stimuliert wurden. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrollen.

3.2.4 Verschiebung des A β -Rezeptors CD14 innerhalb der *lipid rafts*

Lipid rafts stellen nicht nur einen Heimatort der β - und γ -Sekretasen, sondern auch Plattformen zellulärer Signalübertragungen dar. Das Glykoprotein *cluster of differentiation 14* (CD14) wurde unter anderem auch als Rezeptor des A β identifiziert und ist konstitutiv auf den *lipid rafts* vorzufinden (Triantafilou et al., 2002; Liu et al., 2005). Nachdem die

Veränderungen der *lipid rafts* hinsichtlich der Komponenten der γ -Sekretase im Abschnitt 3.1.9 erläutert wurden, wurde folglich die Lokalisation des A β -Rezeptors CD14 untersucht. Als Kontrolle wurde ein weiterer membranständiger A β -Rezeptor Toll-like Rezeptor 2 (TLR2), der nur nach Stimulation zu den *lipid rafts* rekrutiert wird, genutzt. Ergebnisse aus dem *western blot* belegten, dass CD14 mit Flot1 in den gleichen Fraktionen (4-6) colokalisierte und sich in *asm*-defizienten Tieren ähnlich wie Flot1 zu Fraktionen geringerer Dichte verschob (Abb. 28 A und B). Hingegen befand sich TLR2 unabhängig von der *asm*-Defizienz stets in den Fraktionen 11 und 12. Auch in THP-1 Zellen, einer humanen Monozytenzelllinie, wurde nach *asm*-kd eine Verschiebung des Flot1 festgestellt (Abb. 28 C).

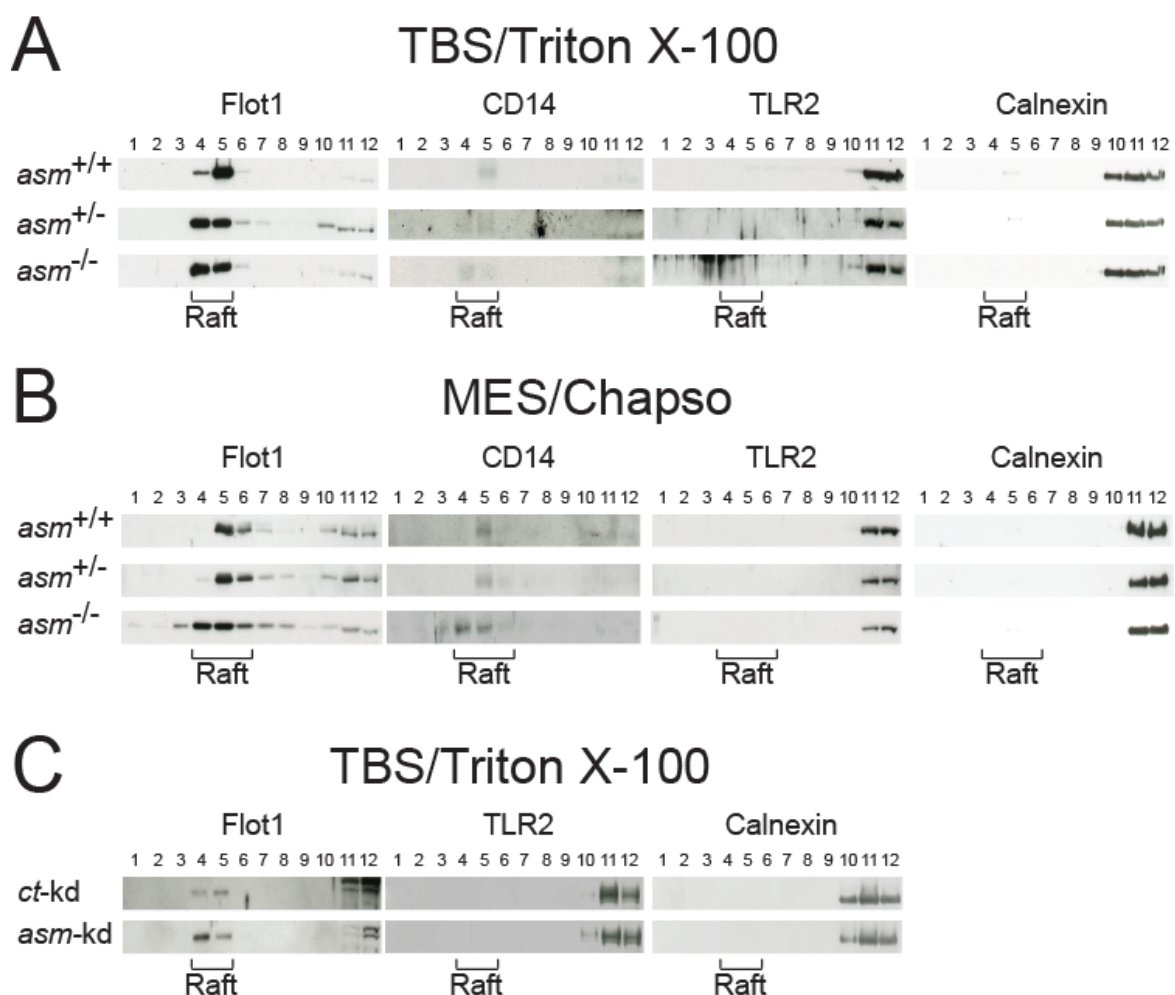


Abbildung 28: Verschiebung des A β -Rezeptors CD14 innerhalb der *lipid rafts*

Detergens resistenter Membranen aus Mausgehirnen wurden mit den Pufferlösungen TBS/Triton X-100 (A) und MES/Chapso (B) isoliert. Die Verteilung der Proteine Flotillin 1 (Flot1), *cluster of differentiation 14* (CD14), Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) und Calnexin wurden im *western blot* überprüft. Die *asm*-Defizienz führte zu einem Shift der Proteine Flot1 und CD14 zu Fraktionen geringerer Dichte, während TLR2 in den Fraktionen 11 und 12 verblieb. (Die Darstellung der Ergebnisse aus dieser Serie an Experimenten wurde auf den Abbildungen 23 und 28 aufgeteilt. Die in diesen beiden Abbildungen gezeigten Ergebnisse an Flot1 und Calnexin sind identisch.) (C) Verschiebung des *lipid raft* Markerproteins Flot1 nach *asm*-kd in THP-1 Zellen.

3.2.5 *Asm*-defiziente Makrophagen phagozytieren vermehrt A β

Obwohl Mikroglia die Basis der angeborenen Immunabwehr im menschlichen Gehirn darstellen, sind periphere Makrophagen, die aus dem Blutstrom infiltrieren, die treibende Kraft für die Phagozytose und Degradation von A β (Akiyama et al., 1995). Im Vergleich zu gesunden Kontrollen differenzieren sich Monozyten aus AD-Patienten seltener zu Makrophagen, zeigen ineffektivere A β -Phagozytose und sind Apoptose anfälliger (Fiala et al., 2005). Dadurch erlangt eine Verstärkung des phagozytischen Verhaltens peripherer Makrophagen in der AD-Therapie zunehmend an Bedeutung. Um das A β -Phagozytoseverhalten von *asm*^{+/+}, *asm*^{+/-} und *asm*^{-/-} Makrophagen zu studieren, wurden sie mit 0,5 μ M aggregiertem FITC-A β 42 für unterschiedliche Zeitdauer inkubiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der Anteil FITC-positiver Zellen erreichte nach 6 h das Maximum, wobei *asm*^{+/-} und *asm*^{-/-} Makrophagen eine stärkere Bereitschaft, A β 42 zu phagozytieren, aufwiesen (Abb. 29 A). Zusätzlich deuteten die ermittelten Durchschnittswerte der Fluoreszenz darauf hin, dass *asm*^{-/-} Makrophagen signifikant mehr A β 42 pro Zelle aufnahmen (Abb. 29 B). Nach 24 h wurde eine Annäherung der Messparameter beobachtet.

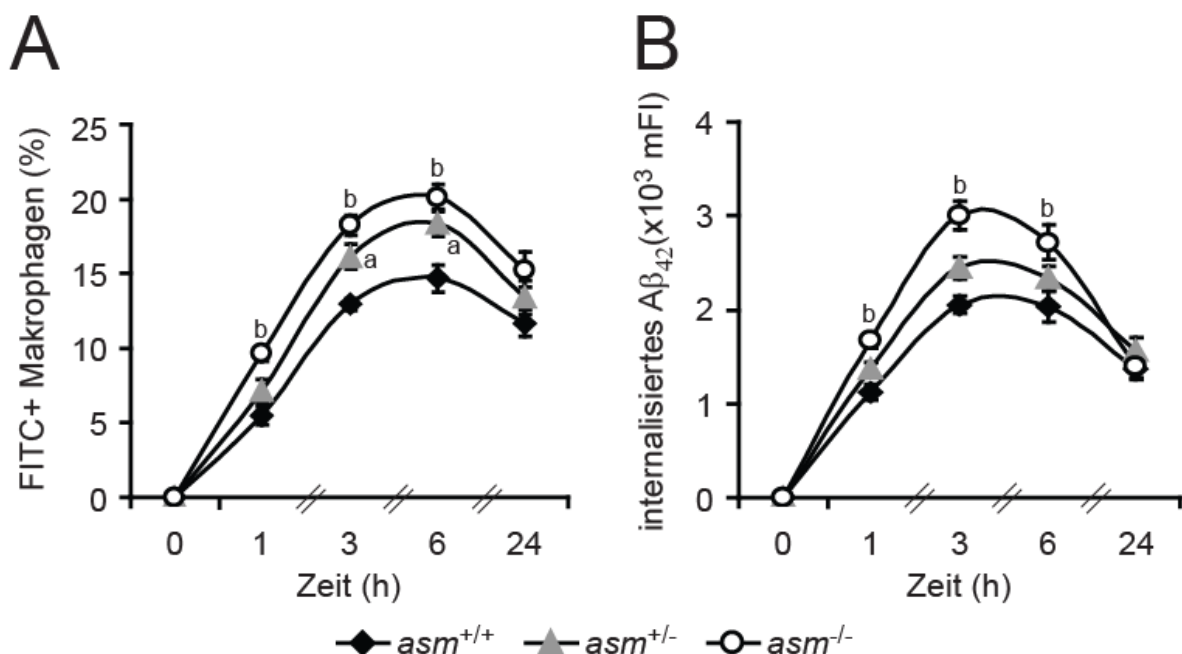


Abbildung 29: *Asm*-defiziente Makrophagen phagozytieren mehr A β 42 als Wildtyp-Makrophagen

Primäre murine Makrophagen wurden mit 0,5 μ M aggregiertem FITC-A β 42 für unterschiedliche Zeitdauer (0, 1, 3, 6 und 24 h) inkubiert. Der Anteil FITC-positiver Zellen und die mittlere Fluoreszenzintensität (mFI) wurden mittels Durchflusszytometrie ermittelt (n = 3). a: $p \leq 0,05$, b: $p \leq 0,01$.

In den Makrophagen wird die ASM für die effiziente Fusion von Phagosomen mit Lysosomen zur Bekämpfung einer bakteriellen Infektion benötigt (Schramm et al., 2008). Damit bestand die Wahrscheinlichkeit, dass das A β von *asm*-defizienten Makrophagen vermehrt aufgenommen, jedoch nicht abgebaut wurde. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein Verdauexperiment mit *asm*^{+/+} und *asm*^{-/-} Makrophagen durchgeführt und die aufgenommene A β 42-Menge unmittelbar nach dem Auswaschen als 100% definiert. Sowohl *asm*^{+/+} als auch *asm*^{-/-} Makrophagen zeigten sukzessive Verminderung des zellinternen A β , sodass ein Degradationsdefekt in *asm*^{-/-} Makrophagen ausgeschlossen werden konnte (Abb. 30).

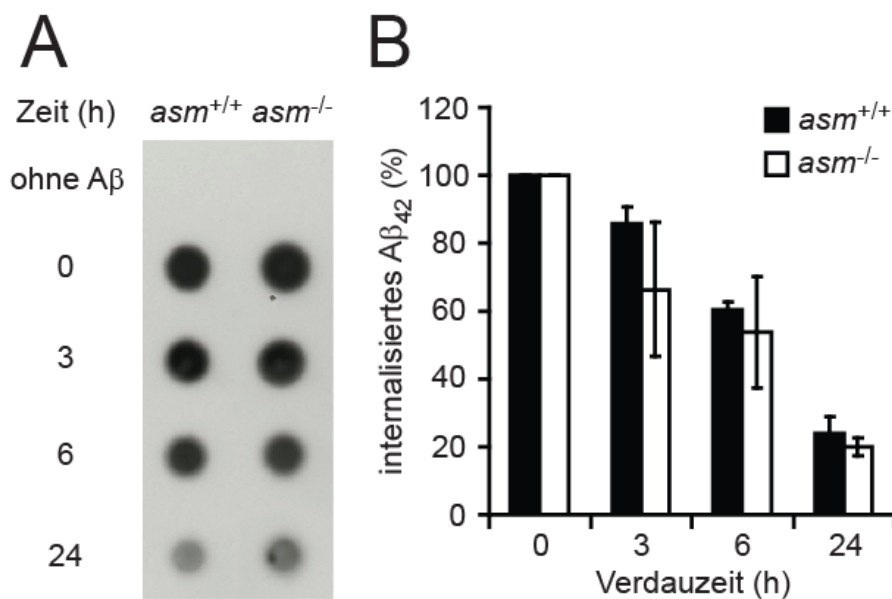


Abbildung 30: *Asm*^{-/-} Makrophagen weisen keinen Degradationsdefekt auf

Asm^{+/+} und *asm*^{-/-} Makrophagen wurden mit 0,5 μ M aggregiertem A β 42 für 3 h inkubiert. Anschließend wurde das A β 42 ausgewaschen, um deren Degradationsverhalten zu studieren. Zellysate wurden zu den Zeitpunkten 0, 3, 6 und 24 h nach dem Auswaschen angefertigt und das verbleibende A β 42 mit *dot blot* detektiert (n = 4). Obwohl *asm*^{-/-} Makrophagen mehr A β 42 phagozytierten, wurde zweck eines günstigeren Vergleichs die aufgenommene A β 42-Menge direkt nach dem Auswaschen in beiden Zelltypen gleich 100% gesetzt.

3.3 Auswirkungen der *asm*-Defizienz in Alzheimer-Mausmodellen

3.3.1 Verpaarungen Alzheimer-Mausmodell und *asm* ko Mäusen

Die bisher präsentierten Ergebnisse beruhen hauptsächlich auf Experimente *in vitro*. *Asm* knock out (*asm* ko) Mäuse wurden mit TgCRND8 und APP/PS1-21 Tieren verpaart, um die Auswirkungen der *asm*-Defizienz in Alzheimer-Mausmodellen *in vivo* zu untersuchen. Die Phänotypen beider Kreuzungen wurden bei einem Alter von 6 Monaten analysiert. Im Laufe jahrelanger Verpaarungshistorie wurde keine *app* tg/*asm*^{-/-} Maus aus der Kreuzung *asm* ko x

TgCRND8 (bei 24 Würfen und 218 Abkömmlingen) generiert (Abb. 31). Somit erhärtete sich der Verdacht, dass diese Kombination unter dem vorherrschenden Maushintergrund lethal sein könnte. Verpaarungen *asm* ko x APP/PS1-21 wurden bis zum Ende dieser Arbeit nicht abgeschlossen, sodass lediglich Phänotypen der *app* tg/*asm*^{+/+} und *app* tg/*asm*^{+/-} Mäuse miteinander verglichen werden konnten.

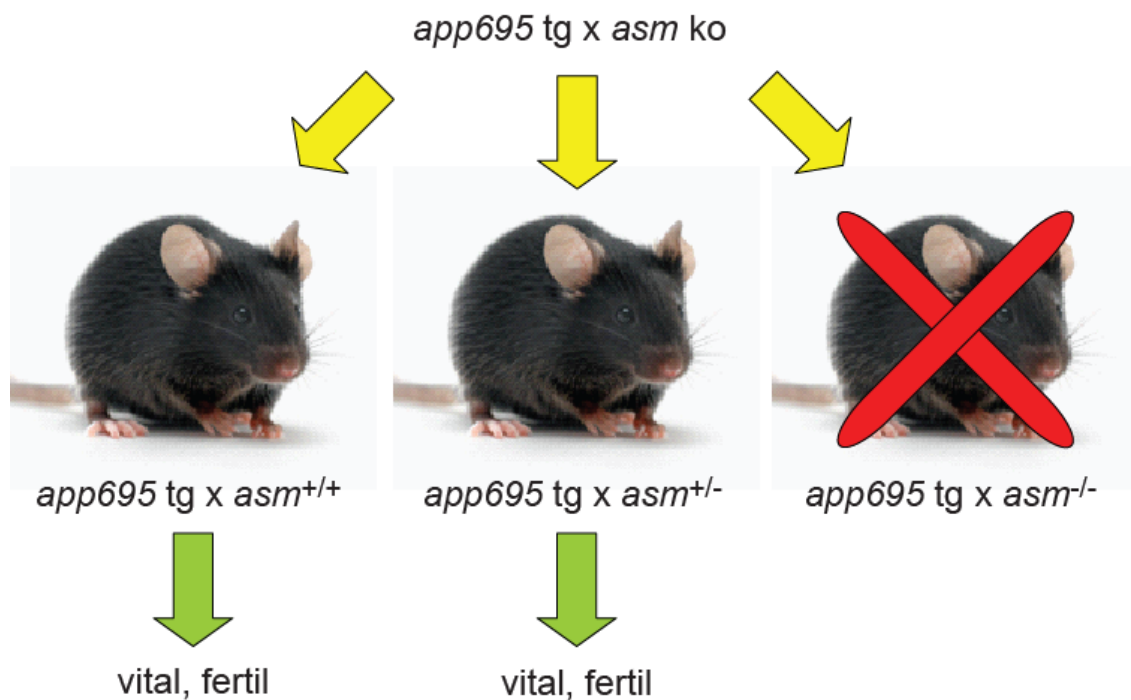


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Verpaarung TgCRND8 x *asm* ko

Um die Auswirkungen der *asm*-Defizienz im Alzheimer-Mausmodell zu untersuchen, wurden *asm* ko mit TgCRND8 Tieren verpaart. Daraus entstanden *app* tg/*asm*^{+/+} und *app* tg/*asm*^{+/-} Mäuse. Jedoch wurde bei 24 Würfen und 218 Abkömmlingen keine *app* tg/*asm*^{-/-} Maus generiert.

3.3.2 *Asm*-Defizienz reduziert cerebrale A β -Ablagerungen

Um den Nettoeffekt einer *asm*-Defizienz auf cerebrale A β -Ablagerungen in Alzheimer-Mausmodellen beurteilen zu können, wurden Proteine mit den Pufferlösungen TBS (= lösliche Fraktion), TBS+1% Triton X-100 (= membranassoziierte Fraktion) und Guanidinhydrochlorid (Guanidin-HCl, = unlösliche Fraktion) sequentiell aus Großhirnen 6 Monate alter Mäuse extrahiert. Die TBS+1% Triton X-100 Fraktion enthielt den Großteil membranassoziiierter Proteine und wurde dafür verwendet, den Gehalt an APP und C99 zwischen *app* tg/*asm*^{+/+} und *app* tg/*asm*^{+/-} Mäusen zu vergleichen. Wie in den SH-SY5Y *knock down* Zelllinien war weder die Expression des APP noch die Menge seines Spaltungsproduktes C99 verändert (Abb. 32).

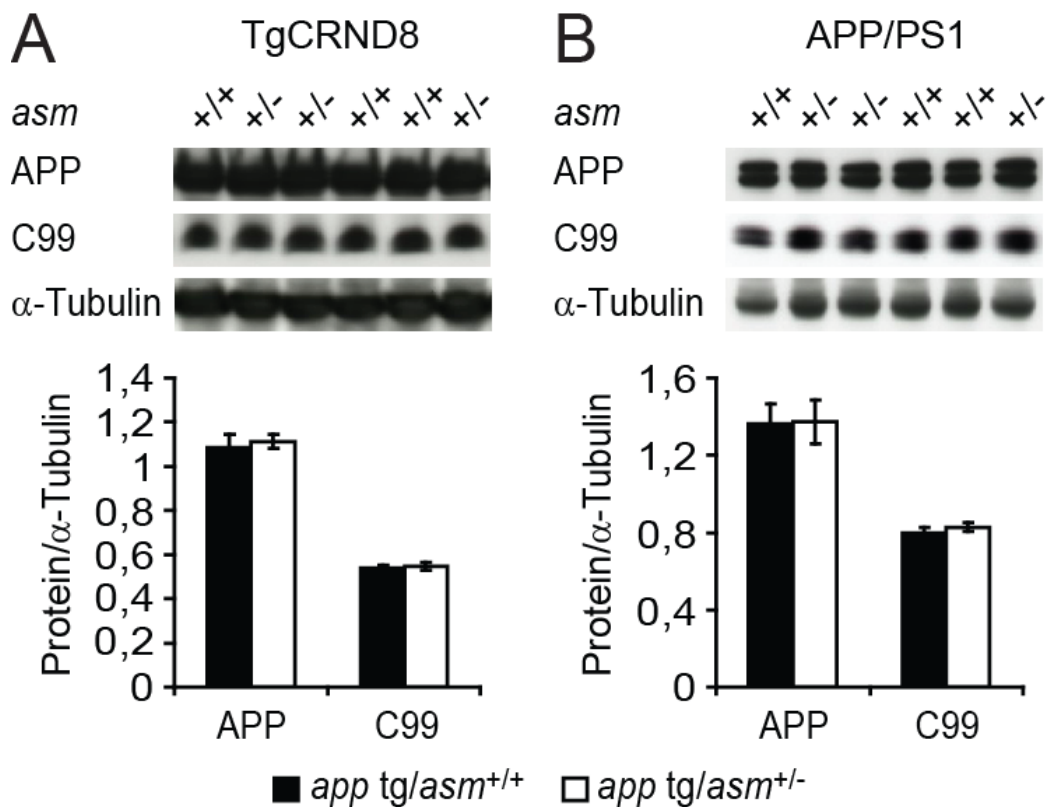


Abbildung 32: Expression von APP und C99 in *app tg/asm^{+/+}* und *app tg/asm^{+/-}* Mäusen

Western blot Analyse des Proteins APP und dessen Spaltprodukt C99 in *app tg/asm^{+/+}* und *app tg/asm^{+/-}* Mäusen, die aus den Verpaarungen *asm* ko mit TgCRND8 (A) oder APP/PS1-21 (B) stammen. Weder die Menge des APP noch die des C99 änderten sich in *asm^{+/-}* Tieren (n = 6 für beide Verpaarungen).

Die Aβ₄₀- und Aβ₄₂-Konzentrationen in den drei Extraktionen wurden mit Hilfe kommerzieller ELISA Kits quantifiziert. Der Hauptteil des Aβ konzentrierte sich in der Guanidin-HCl-Fraktion. Auffälligerweise generierten Mäuse aus der Kreuzung mit TgCRND8 ungefähr doppelt so viel Aβ₄₀ wie Aβ₄₂. In den Fraktionen TBS und Guanidin-HCl wurden Verringerungen des Aβ-Gehalts in Folge einer *asm*-Defizienz festgestellt (Abb. 33 A). So wurde in der TBS Fraktion eine signifikante Reduktion des Aβ₄₀ (Δ17,51%, *p* = 0,024) beobachtet, während in der Guanidin-HCl Fraktion sowohl Aβ₄₀ (Δ15,81%, *p* = 0,041) als auch Aβ₄₂ (Δ14,84%, *p* = 0,049) signifikant vermindert vorlagen. Im Gegensatz zu TgCRND8 bildeten APP/PS1-21 Mäuse wesentlich mehr Aβ₄₂ als Aβ₄₀. *App tg/asm^{+/-}* Tiere aus dieser Kreuzung zeigten ebenfalls Verringerungen des Aβ-Gehalts (Abb. 33 B). Ihr Aβ₄₀-Spiegel in der Guanidin-HCl-Fraktion wurde annähernd halbiert (Δ48,57%, *p* < 0,001) und auch ihr Aβ₄₂-Level ging in den Fraktionen TBS+1% Triton X-100 (Δ14,65%, *p* = 0,048) und Guanidin-HCl (Δ19,33%, *p* = 0,001) signifikant zurück.

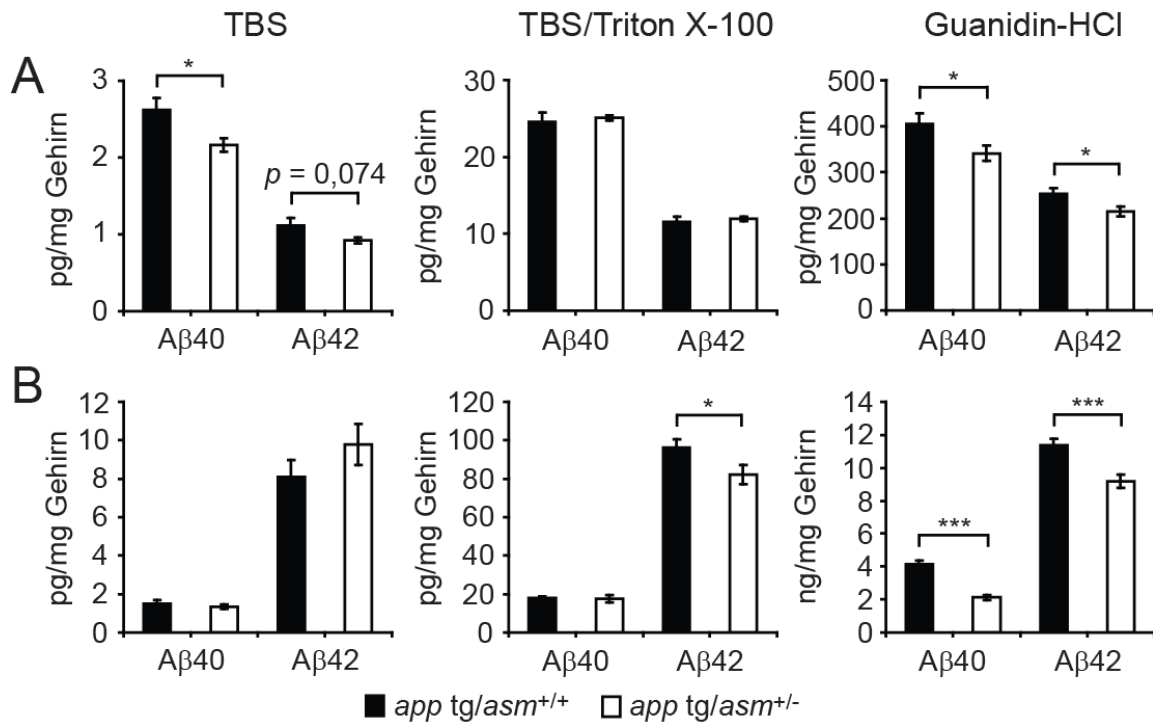


Abbildung 33: *Asm*-Defizienz reduziert cerebrale Aβ-Ablagerungen im Mausgehirn

Proteine des Mausgehirns wurden mit TBS (= lösliche Fraktion), TBS+1% Triton X-100 (= membranassoziierte Fraktion) und 5M Guanidinhydrochlorid (= unlösliche Fraktion) sequentiell extrahiert. Die Aβ40- und Aβ42-Peptide in den drei Fraktionen wurden mit ELISA quantifiziert und in Relation zur gemessenen Proteinkonzentration angegeben. (A) TgCRND8 (n ≥ 8). (B) APP/PS1-21 (n = 8). * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$.

3.3.3 Verhaltensanalyse mit *barnes maze* und *morris water maze*

Tests mit *barnes maze* und *morris water maze* stellen weitverbreitete Verfahren zur Verhaltensanalyse von Alzheimer-Mausmodellen in der gegenwärtigen Forschung dar (O'Leary und Brown, 2009; Bromley-Britis et al., 2011). Die ausgeführten *barnes maze* und *water maze* Tests mit einer Dauer von jeweils 5 Tagen beinhalteten die Messung der Distanz, Latenzzeit und Lauf- bzw. Schwimgeschwindigkeit. Unter beiden Testmethoden adaptierten sich die Tiere an die gegebenen Bedingungen und erreichten die Zuflucht mit zunehmender Testdauer stetig schneller, sodass sich ein Lerneffekt bei allen Testteilnehmern vermuten ließ. Dennoch erreichten *asm^{+/-}* Tiere aus der Kreuzung mit TgCRND8 beim *barnes maze* Test die dunkle Zufluchtsbox wesentlich schneller (*two way Anova*, $p < 0,001$) und legten dabei im Durchschnitt eine signifikant geringere Strecke (*two way Anova*, $p < 0,001$) als ihre *asm^{+/+}* Geschwister zurück, wobei sie sich nicht in der Laufgeschwindigkeit unterschieden (Abb. 34 A). Beim *morris water maze* Test erreichten *asm^{+/+}* und *asm^{+/-}* Mäuse aus der Kreuzung mit TgCRND8 an allen Testtagen nach ähnlicher Schwimmstrecke und Latenzzeit bei gleichbleibender Geschwindigkeit die Plattform (Abb. 34 B).

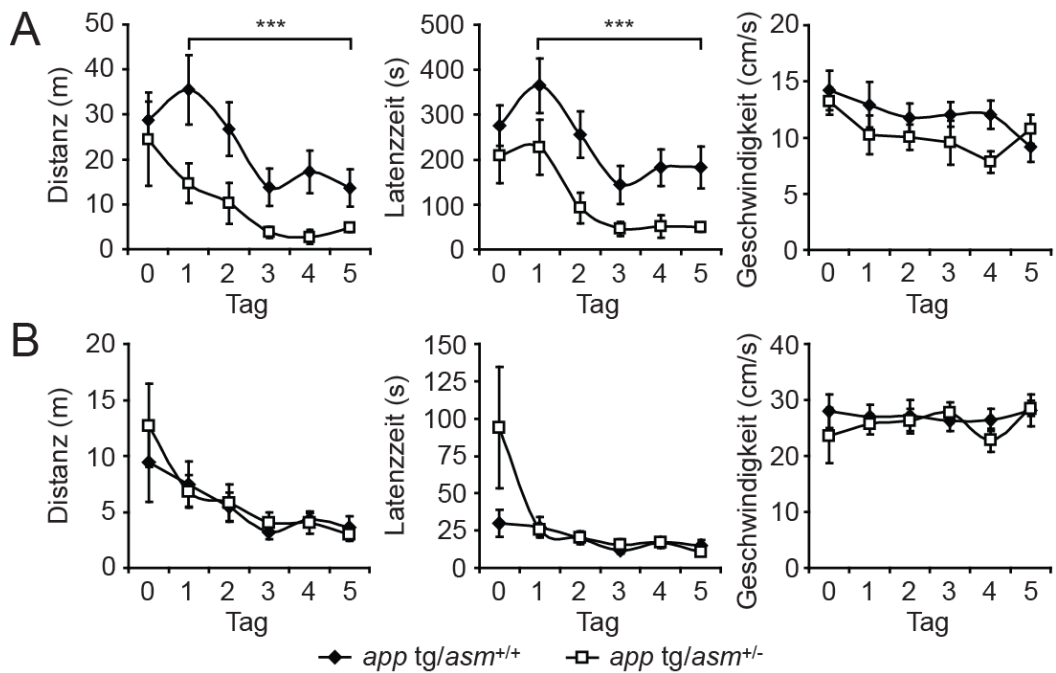


Abbildung 34: Verhaltensanalyse der TgCRND8 $app\ tg/asm^{+/+}$ und $app\ tg/asm^{+/-}$ Mäuse

Beim *barnes maze* (A) und *morris water maze* Test (B) wurden die zurückgelegte Distanz, die benötigte Latenzzeit und die Laufgeschwindigkeit bis zum Erreichen der Zuflucht aufgezeichnet und zwischen $app\ tg/asm^{+/+}$ und $app\ tg/asm^{+/-}$ Mäusen verglichen (*barnes maze* $n \geq 6$; *morris water maze* $n = 3$). *** $p \leq 0,001$.

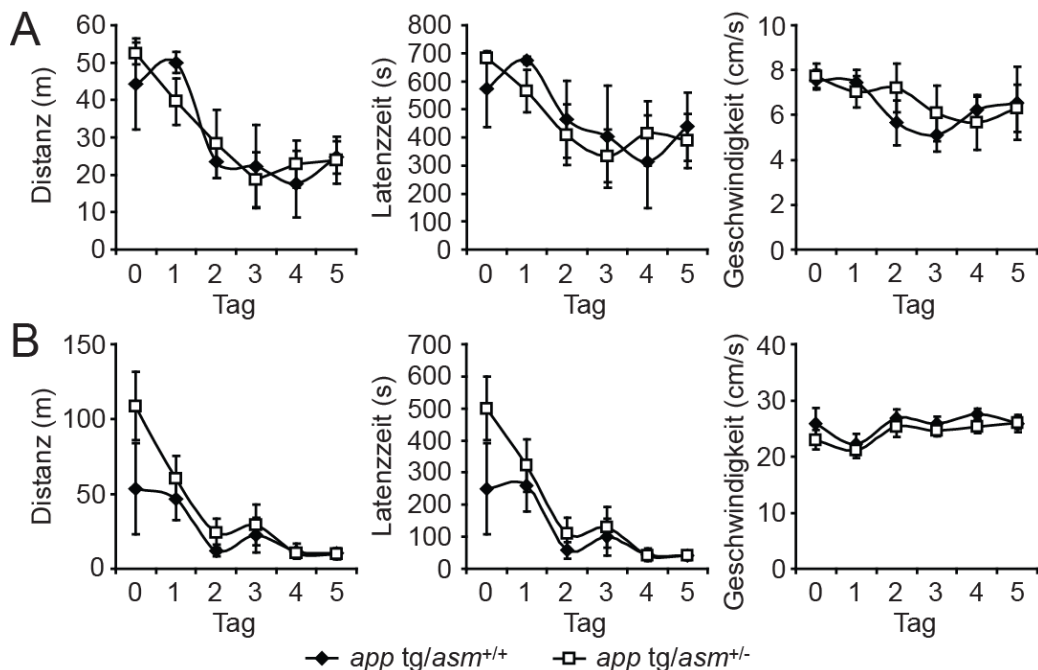


Abbildung 35: Verhaltensanalyse der APP/PS1-21 $app\ tg/asm^{+/+}$ und $app\ tg/asm^{+/-}$ Mäuse

Beim *barnes maze* (A) und *morris water maze* Test (B) wurden die zurückgelegte Distanz, die benötigte Latenzzeit und die Laufgeschwindigkeit bis zum Erreichen der Zuflucht aufgezeichnet und zwischen $app\ tg/asm^{+/+}$ und $app\ tg/asm^{+/-}$ Mäusen verglichen (*barnes maze* $n \geq 3$; *morris water maze* $n \geq 3$).

Im Vergleich zu TgCRND8 legten die Mäuse aus der Kreuzung mit APP/PS1-21 bei beiden Testverfahren eine längere Strecke zurück und benötigten mehr Zeit, um ans Ziel anzukommen. Zudem liefen sie beim *barnes maze* Test deutlich langsamer (TgCRND8 $11,11 \pm 0,39$ cm/s vs. APP/PS1-21 $6,34 \pm 0,27$ cm/s). Im Hinblick auf die getesteten Parameter jedoch brachten *asm*^{+/+} und *asm*^{+/-} Mäuse ähnliche Werte in beiden Tests hervor (Abb. 35).

3.3.4 Untersuchung der synaptischen Markerproteine

Das typische Krankheitsbild eines AD-Patienten zeichnet sich durch kurzzeitige Fehlfunktion des Erinnerungsvermögens, Verlust an Synapsen sowie Neurodegeneration aus. Lange bevor ausgeprägte Neurodegeneration auftritt, können A β -Aggregate die Plastizität und strukturelle Funktionalität der Synapsen empfindlich beeinträchtigen (Klyubin et al., 2012). Weiterhin ist aus der Literatur bekannt, dass Alzheimer-Modellmäuse signifikant geringere Mengen synaptischer Proteine, beispielsweise das *postsynaptic density protein 95* (PSD95), als ihre Wildtyp-Geschwister besitzen (Liu et al., 2012). Deshalb wurde mittels *western blot* der Proteingehalt von vier Vertretern der prä- und postsynaptischen Membranen zur Überprüfung der synaptischen Integrität quantifiziert: (1) PSD95, (2) *synaptophysin* (SYN), (3) *mammalian uncoordinated 18-1* (Munc18-1) und (4) *synaptosomal-associated protein 25* (SNAP25). Im Mausmodell TgCRND8 traten keine Veränderungen von PSD95 und SYN auf (Abb. 36).

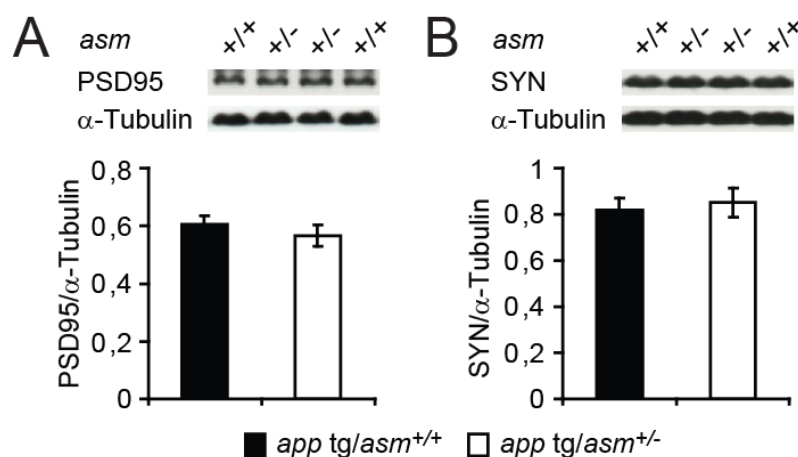


Abbildung 36: Untersuchung der synaptischen Markerproteine in TgCRND8 x *asm* ko Mäusen

Aus *app tg/asm*^{+/+} und *app tg/asm*^{+/-} Maushirnhomogenaten wurden die synaptischen Markerproteine PSD95 (A) und Synaptophysin (B) im *western blot* detektiert (n = 6).

Sowohl *app tg* als auch nicht *app tg* Tiere aus der Kreuzung APP/PS1-21 x *asm* ko wurden in den gleichen Experimenten analysiert. Im Vergleich zu Wildtyp waren die Mengen

synaptischer Proteine in Mäusen dieses Alzheimer-Modells keineswegs erniedrigt. Bezüglich PSD95, SYN und SNAP25 ließen sich auch bei diesen Mäusen keine Veränderungen in Folge einer *asm*-Defizienz feststellen (Abb. 37 A, B und D). Interessanterweise war das Munc18-1 in *asm*^{+/-} (vs. *asm*^{+/+} Δ39,66%, *p* = 0,195) und *app tg/asm*^{+/-} (vs. *app tg/asm*^{+/+}, Δ26,41%, *p* = 0,012) Tieren erhöht (Abb. 37 C).

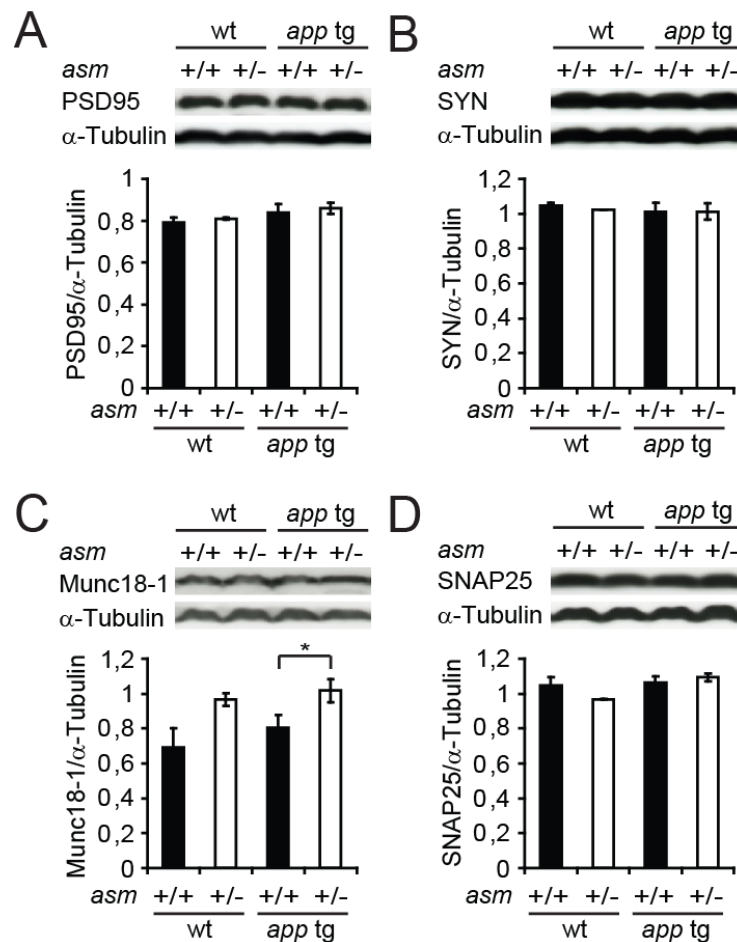


Abbildung 37: Untersuchung der synaptischen Markerproteine in APP/PS1-21 x *asm* ko Mäusen

Aus *app tg/asm*^{+/+} und *app tg/asm*^{+/-} Maushirnhomogenaten wurden die synaptischen Markerproteine PSD95 (A), Synaptophysin (B), Munc18-1 (C) und SNAP25 (D) im *western blot* detektiert (*asm*^{+/+} n = 5, *asm*^{+/-} n = 2, *app tg/asm*^{+/+} n = 8, *app tg/asm*^{+/-} n = 9). * *p* ≤ 0,05.

3.3.5 *Asm*-Defizienz und Inflammation in Alzheimer-Mausmodellen

Aus *in vitro* Experimenten ging hervor, dass *asm*^{-/-} Makrophagen stärker auf Stimuli wie LPS, Pam3CSK4 oder Aβ42 reagierten, indem sie vermehrt proinflammatorische Zytokine wie TNF-α oder CCL-2 ausschütteten. Jedoch gab es kaum Unterschiede zwischen *asm*^{+/+} und *asm*^{+/-} Makrophagen hinsichtlich ihrer Immunantwort. Zur Verifizierung wurde die RNA aus *app tg/asm*^{+/+} und *app tg/asm*^{+/-} Mausgehirnen (*asm*^{+/+} und *asm*^{+/-} zusätzlich bei APP/PS1-21)

isoliert, revers transkribiert und die Transkripte inflammatorisch relevanter Gene mittels Real-Time-quantitative-PCR miteinander verglichen. Im Mausmodell TgCRND8 war lediglich die Expression von *il-1 β* in den *app tg/asm^{+/-}* Mäusen um 46,31% ($p = 0,157$) erhöht (Abb. 38 A). Im Mausmodell APP/PS1-21 äußerte sich die Überexpression des humanen APP695-Proteins in eine verstärkte Transkription der proinflammatorischen Gene *tnf- α* (*asm^{+/+}* vs. *app tg/asm^{+/+}* $p < 0,001$) und *il-1 β* (*asm^{+/+}* vs. *app tg/asm^{+/+}* $p = 0,034$) im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern. Wie bei TgCRND8 wurden Tendenzen, aber keine signifikante Veränderungen der Transkripte in den *app tg/asm^{+/-}* Tieren beobachtet (Abb. 38 B).

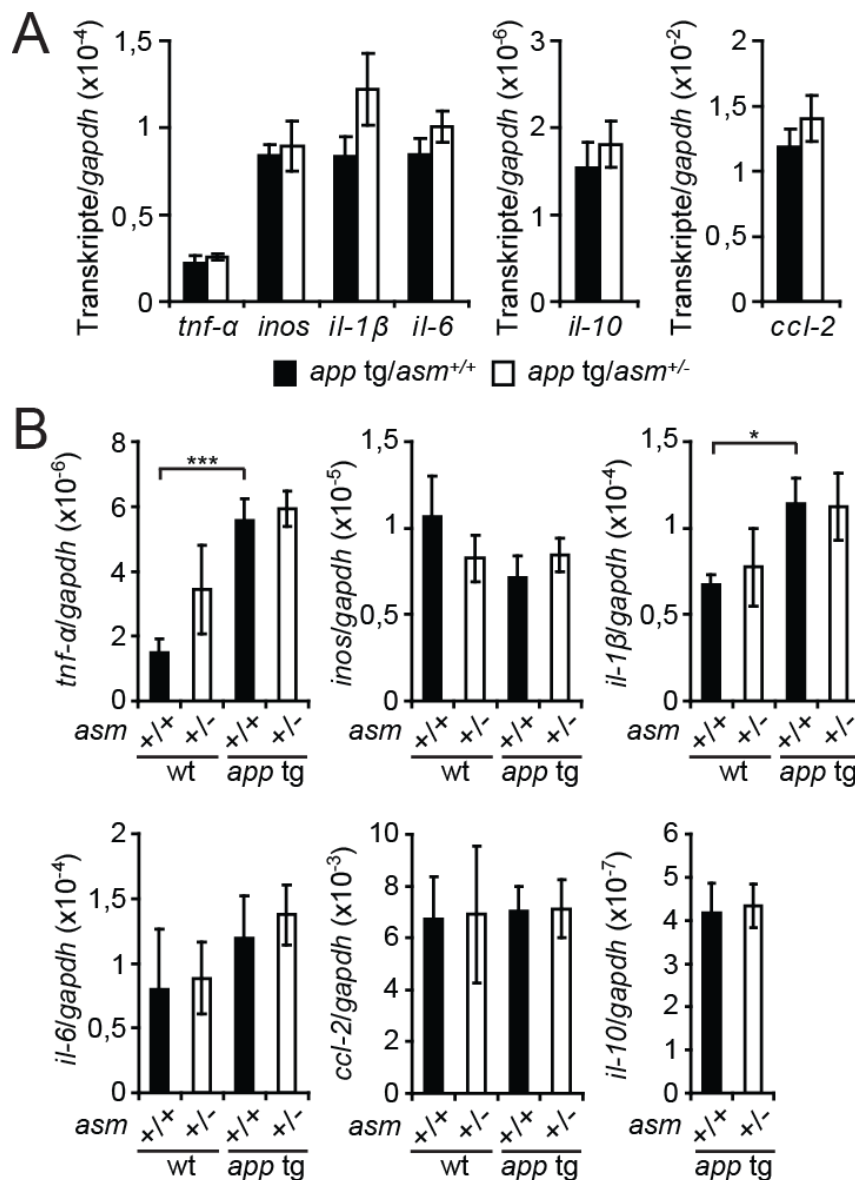


Abbildung 38: Analyse der Expression entzündungsrelevanter Gene

Transkripte der Gene *tnf- α* , *inos*, *il-1 β* , *il-6*, *il-10* und *ccl-2* in *app tg/asm^{+/+}* und *app tg/asm^{+/-}* Mäusen wurden mittels Real-Time-quantitative-PCR quantifiziert. (A) TgCRND8 x *asm* ko ($n = 6$), (B) APP/PS1-21 x *asm* ko (*asm^{+/+}* $n = 5$, *asm^{+/-}* $n = 2$, *app tg/asm^{+/+}* $n = 8$, *app tg/asm^{+/-}* $n = 9$). * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$.

3.4 Behandlung der Alzheimer-Krankheit mit Amitriptylin

3.4.1 Behandlung mit Amitriptylin reduziert A β 42-Ablagerungen

Das Amitriptylin aus der Gruppe der trizyklischen Antidepressiva gilt als funktionaler Inhibitor der ASM (Kornhuber et al., 2005). Um auf Amitriptylin basierte Ansätze zur Behandlung der AD zu entwickeln, wurden TgCRND8 Mäusen 100 mg/l Amitriptylin im Trinkwasser für eine Dauer von 3 Monaten verabreicht. Im Anschluss wurden die Proteine wie zuvor beschrieben extrahiert und die A β 40- und A β 42-Konzentrationen in der jeweiligen Fraktion mit ELISA bestimmt. Tatsächlich resultierte die Behandlung mit Amitriptylin in eine Abnahme des A β 42-Gehalts (Abb. 39). In der Guanidin-HCl-Fraktion wurde die A β 42-Menge signifikant reduziert ($\Delta 41,53\%$, $p = 0,039$). Des Weiteren verringerte sich das A β 42 in der TBS+1% Triton X-100 Fraktion um 61,79%, verfehlte jedoch aufgrund großer Schwankungen zwischen einzelnen Proben die Signifikanzgrenze ($p = 0,179$). Veränderungen der A β 40-Konzentration wurden nicht registriert.

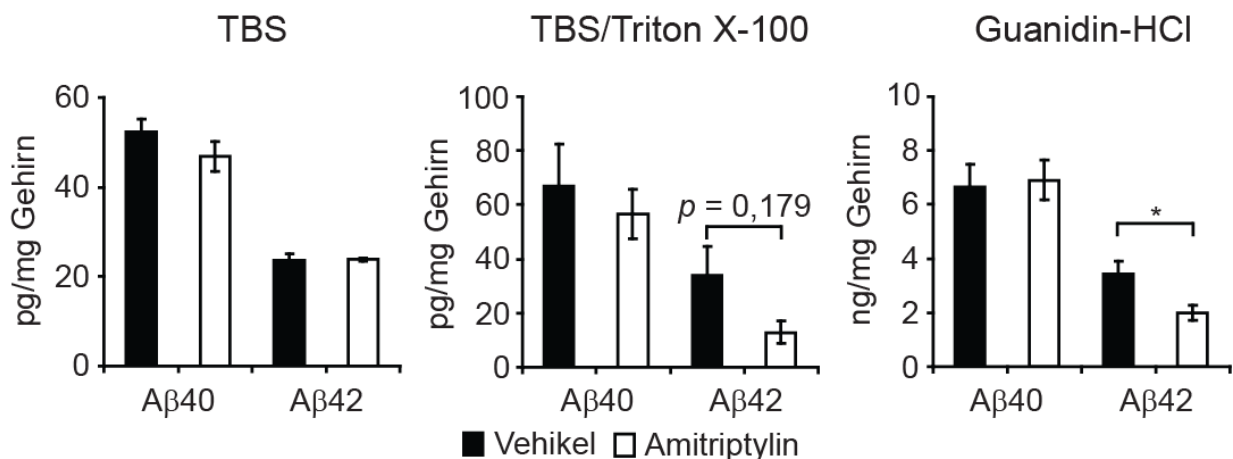


Abbildung 39: Behandlung mit Amitriptylin verringert cerebrale A β 42-Ablagerungen

TgCRND8 Mäuse wurden mit 100 mg/l Amitriptylin im Trinkwasser für eine Dauer von 3 Monaten behandelt. Im Anschluss wurden Proteine des Mausgehirns mit TBS (= lösliche Fraktion), TBS+1% Triton X-100 (= membranassoziierte Fraktion) und 5M Guanidinhydrochlorid (= unlösliche Fraktion) sequentiell extrahiert. Die A β 40- und A β 42-Mengen in den drei Fraktionen wurden via ELISA quantifiziert und in Relation zur gemessenen Proteinkonzentrationen angegeben ($n \geq 6$). * $p \leq 0,05$.

3.4.2 Amitriptylin unterdrückt die Aktivitäten von β - und γ -Sekretasen

Die Wirkung von Amitriptylin auf die Aktivitäten der Sekretasen wurde auf ähnlicher Weise wie bei den SH-SY5Y *knock down* Zellen untersucht. Das Kulturmedium von SH-SY5Y Zellen wurde mit Vehikel, 1 μ M oder 10 μ M Amitriptylinhydrochlorid für 24 h

supplementiert. sAPP α aus dem Zellüberstand und C99 aus dem Zelllysat wurden im *western blot* detektiert, um auf die Aktivitäten der α - und β -Sekretasen zurückzuschließen. Für die Evaluation der β - und γ -Sekretasenaktivitäten in fluorometrischen Assays wurde die Membranfraktion mit Sucrosepuffer isoliert. Die *western blot* Ergebnisse verdeutlichten, dass das Amitriptylin keinen Einfluss auf die Aktivität der α -Sekretase nahm (Abb. 40 A). Aber die Behandlung mit 10 μ M Amitriptylin führte zu einer signifikanten Reduktion des β -Spaltproduktes C99 ($\Delta 28,74\%$, $p = 0,01$) (Abb. 40 B). Der inhibitorische Effekt des Amitriptylin auf die β -Sekretase wurde im fluorometrischen Assay bestätigt. Obwohl 1 μ M Amitriptylin die Aktivitäten der β - und γ -Sekretasen nicht entscheidend änderte, verringerte die Supplementierung mit 10 μ M Amitriptylin die β -Sekretaseaktivität durchschnittlich um 27,55% ($p \leq 0,001$) und die γ -Sekretaseaktivität um 11,6% ($p < 0,05$) (Abb. 40 C und D).

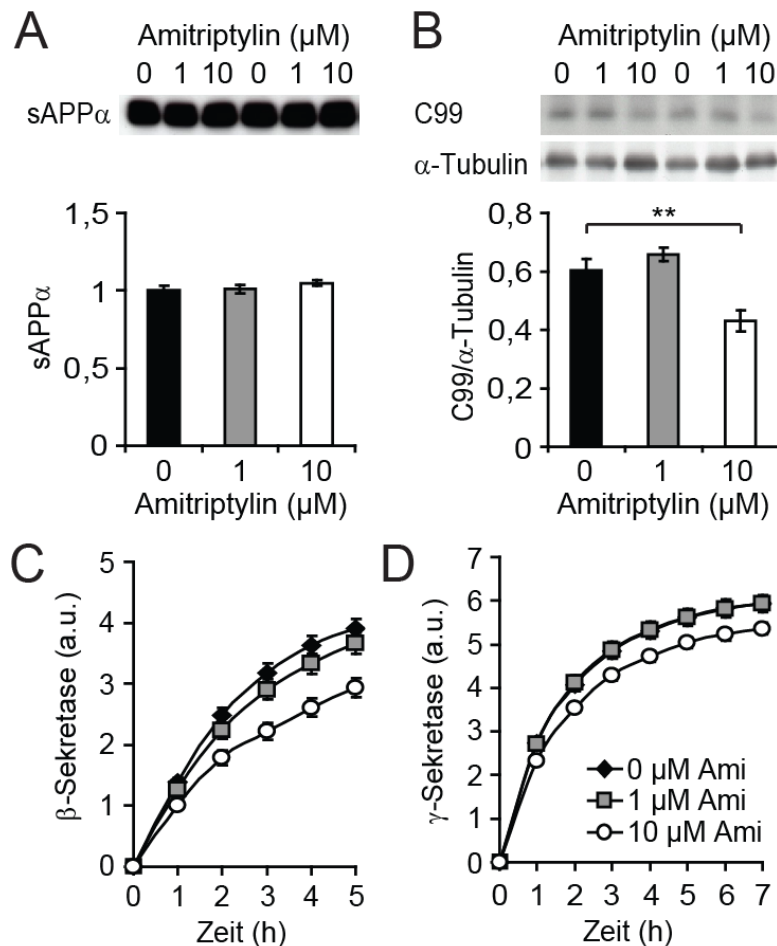


Abbildung 40: Amitriptylin inhibiert die Aktivitäten der β - und γ -Sekretasen

SH-SY5Y wurden mit Vehikel, 1 μ M oder 10 μ M Amitriptylinhydrochlorid (Ami) für 24 h supplementiert. Die Mengen der APP-Spaltprodukte sAPP α (A) aus dem Überstand und C99 (B) aus dem Zelllysat wurden im *western blot* analysiert ($n = 4$). 10 μ M Amitriptylin verringert sowohl die Aktivität der β -Sekretase (C, $p \leq 0,001$) als auch die der γ -Sekretase (D, $p < 0,05$) ($n = 5$). a. u. = *arbitrary unit*, willkürliche Einheit.

4 Diskussion

4.1 Diskussion von Material und Methoden

4.1.1 Auswahl der zellulären Systeme SH-SY5Y und THP1

SH-SY5Y Neuroblastoma Zellen wurden in zahlreichen Arbeiten als zelluläres System verwendet, um den Einfluss einer natürlichen oder einer pharmakologischen Substanz auf die A β -Produktion *in vitro* zu untersuchen (Grimm et al., 2011; Grimm et al., 2012; Meng et al., 2012; Shen et al., 2013). Außerdem werden sie häufig genutzt, um Mechanismen der A β -vermittelten Toxizität *in vitro* aufzuklären und präventive Maßnahmen zu entwickeln (Bang et al., 2004; Hossain et al., 2009; Hashimoto et al., 2011; Wang et al., 2011; Rushworth et al., 2013). Für die Analyse der A β -Produktion wird gewöhnlich eine APP695 transgene Zelllinie hergestellt, weil die Mengen der natürlich sezernierten A β 40 und A β 42 relativ gering sind. In der Tat wurden im Überstand von SH-SY5Y Wildtyp-Zellen lediglich 19 pg/ml A β 40 sowie 5 pg/ml A β 42 gemessen. Besonders das A β 42-Level war dermaßen niedrig, dass der Wert nahe am Detektionslimit des verwendeten ELISA Kits lag. Nach APP695-Überexpression steigerte sich die Konzentration des A β 40 auf ca. 140 pg/ml und die des A β 42 auf 13 pg/ml. Somit setzten die APP695 transfizierten SH-SY5Y Zellen in dieser Arbeit A β 42:A β 40 im Verhältnis von ungefähr 1:10 frei. Unter physiologischen Bedingungen beträgt das Verhältnis von A β 42:A β 40 in einem normalen menschlichen Gehirn 1:9 (Pauwels et al., 2012). Auch daran ist deutlich zu erkennen, dass sich SH-SY5Y Neuroblastoma Zellen als zelluläres System zur Untersuchung der A β -Produktion *in vitro* eignen.

THP-1 Zellen haben sich in der Vergangenheit als *in vitro* Modell zur Untersuchung der inflammatorischen Aktivierung durch die Liganden LPS, Pam3CSK4 (TLR2/TLR2-Ligand) oder A β -Aggregate bewährt (Lorton et al., 1996; Klegeris et al., 1997; Combs et al., 2001; Udan et al., 2008). Ähnlich wie primäre Mikroglia aus der Maus reagieren sie in Folge einer Stimulation durch A β mit signifikanter Freisetzung von TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, *macrophage inflammatory protein 1- α* und *1- β* (Yates et al., 2000). In dieser Arbeit wurde eine *asm*-knock down THP-1 Zelllinie durch stabile Transfektion hergestellt, um einerseits den Effekt einer *asm*-Defizienz auf die Freisetzung von TNF- α nach A β -Stimulation zu ermitteln und einen Vergleich mit den Daten aus primären Mausmakrophagen zu ermöglichen. Andererseits sollen mögliche Veränderungen der biophysikalischen Eigenschaften an den *lipid rafts*, beschränkt auf einem Zelltyp, untersucht werden.

4.1.2 Auswahl der AD-Mausmodelle TgCRND8 und APP/PS1-21

Nach Literatur sollte das ideale AD-Mausmodell unter anderem folgende Eigenschaften besitzen: (1) extrazelluläre A β -Ablagerungen in Form von Plaques, (2) intrazelluläre neurofibrilläre Tangles, (3) kognitive Defizite und Verhaltensstörungen, (4) Verlust an Synapsen und Neuronen sowie (5) Untergang der Axonen (Hall und Roberson, 2012). Zu den essentiellen Aspekten zählt auch die Aktivierung der Neuroinflammation, die oftmals vor dem Einsetzen der Demenz auftritt und anschließend die gesamte Progression der Krankheit begleitet (Lue et al., 1996). A β -Ablagerungen mit steigendem Alter und Veränderungen der Neuroplastizität bilden die herausragenden Merkmale der heute gängigen AD-Mausmodelle, die mutierte Formen des menschlichen APP695 allein oder in Kombination mit mutiertem PS1 exprimieren. Einige, jedoch nicht alle AD-Mausmodelle weisen kognitive Defizite und Verhaltensstörungen auf (Hsiao et al., 1996). Selten wird ein markanter Verlust an Neuronen beobachtet (Hall und Roberson, 2012).

Zwei Mausmodelle wurden in diesem Projekt verwendet: TgCRND8 und APP/PS1-21. TgCRND8 Tiere überexprimieren eine zweifach mutierte Form des menschlichen APP695 (KM670/671NL und V717F) unter der Kontrolle des Prion-Protein (PrP)-Promotors (Chishti et al., 2001). A β -Ablagerungen werden ab einem Alter von drei Monaten beobachtet, wobei gewöhnlich mehr A β 42 als A β 40 im Gehirn dieser Mäuse generiert wird. Ab dem gleichen Zeitpunkt werden signifikante Beeinträchtigungen des Verhaltens, beispielweise im *morris water maze*, festgestellt. Die Produktion der A β -Peptide kann zusätzlich durch die Expression eines mutierten Presenilin 1 (PS1)-Proteins (M146L und L286V) derart verstärkt werden, sodass sich das A β bereits ab dem Alter von einem Monat im Mausgehirn ablagert. Interessanterweise sind die Plaques in diesem AD-Mausmodell überwiegend im Neocortex, Hippocampus und Bulbus olfactorius verteilt, ab 6 Monate auch vereinzelt im Striatum und ab 8 Monate geringfügig im Cerebellum und Hirnstamm. Immunhistologische Färbungen belegten, dass in TgCRND8 das Voranschreiten der A β -Ablagerungen mit der Aktivierung umgebender Mikroglia positiv korreliert. Des Weiteren ist aus Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe bekannt, dass die Expression proinflammatorischer Markergene wie *tnf- α* , *il-1 β* , *il-6*, *inos* oder *ccl-2* zum Testzeitpunkt (6 Monate) hochreguliert wird und gleichzeitig kognitive Defizite vorliegen (Hao et al., 2011). Zusammenfassend sind die wesentlichen Gründe für die Verwendung dieses Mausmodells: (1) frühes Einsetzen der A β -Ablagerung, (2) Aktivierung der Neuroinflammation und (3) messbare kognitive Defizite.

APP/PS1-21 Mäuse ist eine neuartige Variante des gängigen APP/PS1-Mausmodells und wurde 2006 erstmals vorgestellt (Radde et al., 2006). Diese Tiere coexprimieren mutiertes menschliches APP695 (KM670/671NL) und mutiertes PS1 (L166P) unter der Kontrolle des neuronenspezifischen Thy1-Promotors. Cerebrale Ablagerung der gebildeten A β fängt durchschnittlich mit 6-8 Wochen an, wobei auch hier mehr A β 42 als A β 40 produziert wird. Im Gegensatz zu TgCRND8 sind A β -Plaques annähernd in allen Bereichen des Mausgehirns gleichermaßen präsent, angefangen beim Neocortex (6 Wochen) bis hin zum Striatum, Thalamus und Hirnstamm (3-5 Monate). Anzeichen der Neuinflammation werden bei jungen Tieren im Alter von einem Monat nicht beobachtet. Jedoch erhöht sich die Anzahl der Mikroglia im Neocortex ab einem Alter von 8 Monaten begleitend zur A β -Ablagerung bis zu dreifach. Markanter Verlust an Neuronen ist nicht im Neocortex, jedoch im Gyrus dentatus im höheren Alter festzustellen. Veränderungen des Verhaltens sowie Beeinträchtigungen des Lernvermögens, getestet im *open field* Test oder *radial arm maze*, treten ebenfalls erst mit 8 Monaten auf. Im Wesentlichen dienen die APP/PS1-21 Tiere als Vergleich zum TgCRND8-Stamm. Der grundlegende Vorteil dieser Mauslinie ist die reichhaltige Produktion und Ablagerung des A β ab einem vergleichsweise sehr jungen Alter. Allerdings sind zum gewählten Testzeitpunkt keine Veränderungen der Kognition bisher bekannt. Informationen über Expression pro- und antiinflammatorischer Markergene liegen nicht vor.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 *Asm*-Defizienz senkt die A β -Produktion durch Inhibition der γ -Sekretase

Das A β , welches in der Amyloid-Hypothese als das ausschlaggebende Molekül zur Auslösung der AD-Pathologien erachtet wird, entsteht durch sequentielle Prozessierung seines Vorläuferproteins APP. Schlüsselfiguren dieses sogenannten amyloidogenen Prozessierungsweges sind zwei Enzyme, nämlich die β - und γ -Sekretasen. Zwei wichtige Erkenntnisse kennzeichnen die Neuronen als wesentliche Produktionsstätte des cerebralen A β : (1) das in Neuronen exprimierte APP695 ist die Hauptisofom des APP und (2) die ausgeprägte Expression und Aktivität von BACE1 (β -Sekretase) in den Neuronen (Kogel et al., 2011; Rajendran und Annaert, 2012).

Die ASM, die intrazellulär in Endosomen und Lysosomen lokalisiert ist, hydrolysiert Sphingomyeline zu Ceramiden und Phosphorylcholin. In AD-Patienten sind die Aktivitäten von ASM und der sauren Ceramidase erhöht, sodass vermehrt Ceramide und Sphingosin

gebildet werden. Die entstandenen Ceramide beschleunigen die Generation des A β , indem sie die β -Sekretase stabilisieren (Puglielli et al., 2003). Das Sphingosin wird durch die Sphingosinkinase zu Sphingosin-1-phosphat phosphoryliert, das seinerseits mit der β -Sekretase interagiert und die A β -Produktion fördert (Takasugi et al., 2011). Im Rahmen dieser Arbeit sollen mögliche Effekte einer *asm*-Defizienz auf die A β -Generation und die zugrundeliegenden Mechanismen unter Verwendung der SH-SY5Y Neuroblastoma Zelllinie und *asm*-defizienten Mäusen detailliert untersucht und später in AD-Mausmodellen verifiziert werden.

Zunächst wurden die Organellen aus SH-SY5Y Wildtyp-Zellen mit Hilfe der Sucrose-Gradientenzentrifugation ihrer jeweiligen Dichte entsprechend aufgetrennt, um die intrazelluläre Verteilung von Lamp1 (Endosom/Lysosom-Markerprotein), APP, BACE, PS1, NCT und ASM zu ermitteln. α -Tubulin als Markerprotein der zytosolischen Fraktion sowie Calnexin als ER-Markerprotein wurden als Kontrollen verwendet, um eine erfolgreiche Trennung zu überprüfen. Lamp1, APP, PS1, NCT und ASM colokalisierten in der Fraktion 10, die weder Verunreinigung durch α -Tubulin noch Calnexin aufwies. Damit wurden die Resultate von Pasternak und Kollegen bestätigt, die eine Colokalisation von APP, PS1 und NCT in der lysosomalen Membran beobachteten (Pasternak et al., 2003). Gleichzeitig wurde eine räumliche Trennung von BACE und ASM suggeriert. Die verwendeten Isolationsmethoden sind insofern nicht vergleichbar, weil Pasternak und Kollegen zur Isolation der Lysosomen Tyloxapol, ein nichtionisches Detergens, einsetzten. Der hier durchgeführte Aufschluss der Zellen basierte auf einem rein mechanischen Prinzip.

Nach erfolgreicher Etablierung der *app695 tg/asm-kd* SH-SY5Y Zelllinie wurden die Auswirkungen der *asm*-Defizienz auf die A β -Generation *in vitro* evaluiert, indem die sezernierten A β -Peptide im Kulturüberstand mittels *western blot* und ELISA quantifiziert wurden. Im *western blot* resultierte der *asm-kd* in eine Verringerung des Gesamt-A β -Levels um ca. 40%. Aufschluss über spezifische Effekte auf einzelne A β -Spezies gaben die ELISA-Daten. Die Freisetzung der prädominanten Spezies A β 40 und A β 42 ging um 45% bzw. 28% zurück. Aufgrund dessen, dass A β 40 weitaus zahlreicher als A β 42 gebildet wurden, stimmten die Relationen mit dem Ergebnis aus *western blot* überein. Allerdings war an der Stelle unklar, ob die Effekte auf eine verminderte A β -Produktion oder auf Defekte der Sezernierungsmaschinerie zurückzuführen war. Denn in zytotoxischen CD8-positiven T-Lymphozyten führt die *asm*-Defizienz zur fehlerhaften Kontraktion der sekretorischen Granulae, sodass der Ausstoß zytotoxischer Effektormoleküle stark beeinträchtigt wird (Herz et al., 2009). Deshalb wurde ergänzend der intrazelluläre Gehalt an A β 40 und A β 42 detektiert.

Der intrazelluläre Konzentration beider A β -Spezies war sehr gering und wurde nach *asm-kd* jeweils um einen Drittel erniedrigt. Bezogen auf die Gesamtmenge verbleibt sowohl in *ct-kd* als auch in *asm-kd* nur ein Bruchteil des gebildeten A β zurück (*ct-kd* 0,04% vs. *asm-kd* 0,06%). Diese Resultate wiesen darauf hin, dass die ASM die Produktion, aber nicht die Sekretion des A β reguliert.

Die Suche nach der molekularen Ursache schloss unweigerlich eine Analyse der Sekretasen mit ein, da ihre Aktivitäten für die Entstehung des A β maßgebend sind. *Western blot* und Aktivitätstest mit fluorogenen Substraten demonstrierten, dass eine *asm*-Defizienz weder die Aktivität der α -Sekretase noch die der β -Sekretase veränderte. Jedoch wurde die Aktivität der γ -Sekretase in *asm-kd* SH-SY5Y Zellen und *asm*-defizienten Maushirngewebe signifikant geschwächt. In vielen Fällen wird eine Modulation der Sekretasenaktivität, obgleich in einem zellulären System oder einem AD-Mausmodell, durch Regulation der Expression erzielt (Zhang et al., 2009; McAllister et al., 2010; Grimm et al., 2011; Grimm et al., 2012). Interessanterweise belegten weiterführende Experimente im *western blot* und Real-Time-quantitative-PCR eindeutig, dass die Inhibition der γ -Sekretase im Rahmen der *asm*-Defizienz nicht durch verminderte Expression der Komponenten hervorgerufen wurde.

Neben der Aktivität der Sekretasen ist intrazelluläres *trafficking* ein wesentlicher Einflussfaktor auf die korrekte Prozessierung des APP. Beispielsweise reguliert das Retromer, ein heteropentamer Protein bestehend aus einem Nexin-Dimer und einem *vacuolar protein sorting* (*vps26/29/35*)-Trimer, den Verkehr zwischen Endosomen und dem trans Golgi-Netzwerk (Seaman et al., 2004). Verlust von Retromer-assoziierten Proteinen wie sorLa stört den Transport des APP von Endosomen zum trans Golgi-Netzwerk, sodass die A β -Produktion verstärkt und das Risiko, an AD zu erkranken, erhöht wird (Anderson et al., 2005, Vieira et al., 2010). Daher wurde im nächsten Schritt mittels Isolation der Lysosomen überprüft, inwiefern sich der *asm-kd* auf das intrazelluläre *trafficking* von APP und Komponenten der γ -Sekretase zum endo-/lysosomalen System auswirkt. Nach *asm-kd* war das ASM-Protein schwer detektierbar und befand sich ausschließlich in der Fraktion der höchsten Dichte. Aber die Verschiebung der ASM hatte keinen Einfluss auf das Profil der weiteren getesteten Proteine, sodass angenommen wurde, dass die ASM sich nicht am intrazellulären Transport von APP und γ -Sekretase beteiligte.

Die Aktivität der γ -Sekretase ist im höchsten Maße von der Lipidzusammensetzung der Membran und der damit verbundenen strukturellen Integrität abhängig (Osenkowski et al., 2008; Zhou et al., 2010; Holmes et al., 2012). Eine Inhibition oder Defizienz der ASM reduziert die Menge der zellulären Ceramide, führt zur Akkumulation der Sphingomyeline

innerhalb der Zellmembran und moduliert die Membranfluidität, sodass erhöhte Mengen an Detergentien benötigt werden, um *lipid rafts* zu separieren (Scandroglio et al., 2008).

Eine semiquantitative Bestimmung des Ceramidgehaltes im *dot blot* unter Verwendung eines Ceramid-spezifischen Antikörpers offenbarte, dass die Menge der zellulären Ceramide nach *asm-kd* tatsächlich signifikant reduziert wurde. Ceramide setzen sich aus einem Sphingosin und einer Fettsäure zusammen. Die Kohlenstoffketten der Fettsäuren in natürlich vorkommenden Ceramiden reichen von C16 bis hin zu C34 (Bouwstra et al., 1998). Mit Hilfe der Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) fanden Gu und Kollegen heraus, dass das C16-Ceramid den Hauptanteil zellulärer Ceramide einnimmt (Gu et al., 1997). Eine erste direkte Verbindung zwischen Ceramiden und AD stellten Han und Kollegen her, die im AD-Gehirn ein signifikant höheres Level an C24:1-Ceramid detektierten (Han et al., 2002). Ein kürzlich veröffentlichter Bericht weitete das Spektrum der AD-relevanten Ceramidspezies auf C16, C18, C20 und C24 hinaus (Filippov et al., 2012). Zur Überprüfung inwiefern eine Abweichung des zellulären Ceramidgehaltes die Aktivität der γ -Sekretase beeinflusst, wurden SH-SY5Y *ct-kd* und *asm-kd* mit C16-Ceramiden im Kulturmedium für 24 h supplementiert. Interessanterweise konnte der zelluläre Ceramidpool in *asm-kd* Zellen durch C16-Supplementation wieder vollständig aufgefüllt werden. Eine Veränderung des Ceramidlevels in *ct-kd* Zellen wurde nicht registriert. Nachfolgende Experimente zeigten jedoch, dass das C16-Ceramid keinen Einfluss auf die Aktivität der γ -Sekretase ausübte. Ergänzende Supplementationsexperimente mit C6- und C24:1-Ceramiden wurden durchgeführt. Wie C16 hatten diese Ceramidspezies ebenfalls keinen sichtbaren Effekt auf die γ -Sekretase. Die Daten wurden nicht gezeigt, da bis zum Abschluss dieser Arbeit unklar war, ob C6- bzw. C24:1-Ceramide den endogenen Ceramidpool der *asm-kd* Zellen vollständig wiederherstellen können. Dadurch dass die saure Ceramidase Ceramide zu Sphingosin prozessiert und folglich Sphingosin-1-phosphat entsteht, sind diese Metabolite höchstwahrscheinlich nicht in der Inhibition der γ -Sekretase involviert. Ein entsprechender Nachweis *in vivo* erfordert die Generation weiterer Mausstämme. Mit Neuronen-spezifischen *asm tg* oder *asah1* (Gen für saure Ceramidase) ko Mäusen könnten diesbezüglich weitere Erkenntnisse gewonnen werden. Denn in *asm tg* und *asah1* ko Tieren werden Ceramide akkumuliert, indem entweder die Generation der Ceramide verstärkt oder der Abbau gehemmt wird. Im Vergleich zu *asm ko* Mäusen stellen sie somit gegensätzliche Plattformen zur Untersuchung der Auswirkungen cerebraler Ceramide bereit. Die Auswertung der Sekretasenaktivitäten dieser beiden Mausstämme wurde bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht beendet. Ergebnisse aus Pilotversuchen stimmten mit den Resultaten der *in vitro*

Experimente überein. Beide Mausstämme wiesen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen keinerlei Veränderung der Sekretasenaktivitäten auf, womit die zuvor von Puglielli und Kollegen berichtete Verstärkung der β -Sekretaseaktivität durch Ansammlung an Ceramiden nicht bestätigt werden konnte (Puglielli et al., 2003).

Die Akkumulation der Sphingomyeline in der Zellmembran ist eine weitere direkte Konsequenz der *asm*-Defizienz, die möglicherweise eine Neuordnung der Membranstruktur und -integrität herbeiführt. Im Gehirn von 7 Monate alten *asm*-ko Mäusen wurde eine fünffach erhöhte Menge an Sphingomyelinen festgestellt, während Cholesterol und Phosphoglyceride unverändert blieben (Scandroglio et al., 2008). Ähnlich verhielten sich SH-SY5Y nach *asm*-kd. Verglichen mit *ct*-kd Zellen steigerte sich der zelluläre Sphingomyelingehalt um mehr als 80%.

Sphingomyeline bilden ein wesentlicher Bestandteil der *lipid rafts*. Diese heterogenen Mikrodomänen der Membran beheimaten die aktiven β - und γ -Sekretasen. Folglich wurden *lipid rafts* aus *asm*-defizienten Mausgehirnen mit Detergens versetzten Puffern (TBS/Triton X-100 und MBS/Chapso) präpariert, um sie hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften zu analysieren. Die verwendeten Detergentien Triton X-100 und Chapso ergänzten sich hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Isolation der *lipid rafts*. Denn Triton X-100 solubilisiert *lipid rafts* zwar gründlich, jedoch werden die Interaktionen mit *raft*-assoziierten Proteinen größtenteils aufgehoben, sodass sie in Fraktionen höherer Dichte auftauchen (Vetrivel et al., 2004; Hur et al., 2008). Hingegen bleiben die Komponenten der γ -Sekretase nach Behandlung mit Chapso weiterhin *raft*-assoziiert. Bedingt durch die *asm*-Defizienz verschob sich das *lipid raft*-Markerprotein Flot1 von Fraktionen größerer in Fraktionen geringerer Dichte, die von einer ähnlichen Verlagerung der γ -Sekretasekomponenten PS1 und NCT begleitet wurde. Der Einsatz von Detergentien wird oft als artifiziell kritisiert, weshalb stets bemüht wird, Detergens-freie Methoden zu etablieren (Persaud-Sawin et al., 2009). Aber eine Detergens-freie Separation der *lipid rafts* gestaltet sich technisch schwierig und führt selten zum Erfolg. Eine rein mechanische Zerkleinerung des Maushirngewebes mit *dounce* Homogenisatoren und anschließender Ultraschallbehandlung resultierte in unzureichender Trennung der *lipid rafts* von den restlichen Membranbestandteile, sodass sich die Verteilung des ER-Markerproteins Calnexin mit der des *lipid raft*-Markerproteins Flot1 komplett überlappten (Daten nicht gezeigt). Ein direkter Nachweis für die essentielle Bedeutung der Sphingomyeline zur Modulation der biophysikalischen Charakteristika von *lipid rafts* fehlt, da eine entsprechende Analyse ihrer Lipidkomposition spezifische Methoden zur Isolation

Sphingomyelin-angereicherter Membrandomänen voraussetzt und eine Auswertung einzelner Sphingomyelinspezies den Einsatz eines Massenspektrometers bedarf.

Die Untersuchung der Membranfluidität bietet eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung der Membranstruktur und -integrität. Eine Akkumulation der Sphingomyeline in *asm*-ko Mäusen wurde in Verbindung mit erhöhter Resistenz gegenüber Detergentien gebracht (Scandroglio et al., 2008). Triton X-100 dissoziiert den aktiven γ -Sekretasekomplex und unterdrückt ihre Aktivität in einer dosisabhängigen Art und Weise (Franberg et al., 2007). Diese Eigenschaft wurde ausgenutzt, um die Aktivität der γ -Sekretase aus SH-SY5Y *ct*-kd und *asm*-kd Zellen in Abhängigkeit der Triton X-100 Konzentrationen zu testen. In der Tat verringerte sich die γ -Sekretaseaktivität der *ct*-kd Zellen kontinuierlich mit steigenden Triton X-100 Konzentrationen. Im Unterschied dazu wurde in *asm*-kd Zellen ein leichter Anstieg der Aktivität bis zu 0,1% Triton X-100 beobachtet. Erst in höheren Triton X-100 Konzentrationen fällt die γ -Sekretaseaktivität auf einem *ct*-kd ähnlichen Niveau. Folglich entwickelten SH-SY5Y nach *asm*-kd eine signifikante Resistenz. Als Alternative wurde die Wirkung von Chapsos ebenfalls begutachtet. Wie zuvor von Franberg und Kollegen berichtet, begünstigten niedrige Chapsomengen (bis 0,3%) die Aktivität der γ -Sekretase (Franberg et al., 2007). Jedoch profitierten *asm*-kd Zellen (+30% Aktivität) stärker als *ct*-kd (+10% Aktivität) (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend vermindert eine *asm*-Defizienz die A β -Produktion durch Inhibition der γ -Sekretase. Dieser Effekt ist weder auf verringerte Expression der γ -Sekretasekomponenten noch auf Umstellung des Proteintransports zurückzuführen, sondern steht vermutlich in direktem Zusammenhang mit Veränderungen der Membranstruktur und -fluidität. Der Ceramidgehalt beeinflusst die Aktivität der γ -Sekretase nicht. Aber die Akkumulation des Sphingomyelins reduziert die Dichte der *lipid rafts* und führt möglicherweise zur Aktivitätsverlust der raft-ständigen γ -Sekretase.

4.2.2 Die Rolle der ASM als Inhibitor der inflammatorischen Aktivierung

Die Entzündungsreaktion eines Gewebes beschreibt eine spezifische Immunantwort auf einen schädlichen Reiz, dessen Ursache einem endogenen oder exogenen Ursprung entspringt. Die eigentliche Funktion der Entzündung besteht darin, das potentielle Pathogen zu neutralisieren, eine Ausbreitung zu unterbinden und eventuell geschädigtes Gewebe zu reparieren. Die Neuroinflammation, ein vergleichsweise frühes Ereignis in der AD-Pathologie, hat den Charakter eines zweiseitigen Schwertes (Wyss-Coray und Mucke, 2002). Der jeweilige

Phänotyp der mikroglialen Aktivierung bestimmt darüber, ob sie Neuronen durch Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren schaden (M1-Phänotyp) oder die Regeneration geschädigter Gewebe durch Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine fördern (M2-Phänotyp). In AD-Mausmodellen wurde mehrfach gezeigt, dass eine Inhibition des M1-Phänotyps die Progression der A β -Pathologie verlangsamt und den Verlust prä- und postsynaptischer Markerproteine einschränkt (Lim et al., 2000; Hao et al., 2011; Liu et al., 2012).

Rozenova und Kollegen berichteten, dass *asm*-defiziente Makrophagen nach LPS-Stimulation verstärkt TNF- α produzieren, indem die Aktivität von *TNF- α converting enzyme* (TACE, ADAM17) hochreguliert wird (Rozenova et al., 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels primären Makrophagen aus dem Mausknochenmark und *asm*-kd THP-1 Zellen überprüft, ob neben LPS weitere Stimuli einen ähnlichen Effekt hervorrufen und außer TNF- α noch weitere Zytokine und Chemokine betroffen sind. Als Stimuli wurden LPS, Pam3CSK4 und A β 42 ausgewählt, weil sie zwar gleichermaßen eine Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α oder CCL-2 bewirken, die Stimulation jedoch durch Bindung an unterschiedlichen Rezeptoren zustande kommt. Als Ergebnis wurde festgehalten, dass *asm*^{-/-} Makrophagen unabhängig vom verwendeten Stimulus signifikant mehr TNF- α und CCL-2 sezernierten, während *asm*^{+/-} Makrophagen sich wie Wildtyp-Makrophagen verhielten. Übereinstimmend resultierte der *asm*-kd in THP-1 Zellen ebenfalls in eine Produktionssteigerung der getesteten proinflammatorischen Mediatoren nach Stimulation durch LPS und Pam3CSK4. Durch diese Experimente wurde einleuchtend demonstriert, dass der von Rozenova und Kollegen beobachtete Effekt nicht LPS-spezifisch ist. Weiterhin wurde klargestellt, dass die ASM neben der Generation von TNF- α noch weitere Zytokine oder Chemokine entscheidend beeinflussen kann. Die Charakterisierung der ASM als Inhibitor des M1-Phänotyps prognostiziert aber, dass in *app tg/asm*^{-/-} Mausgehirn ein höheres Maß an proinflammatorischer Aktivität vorherrschen könnte.

Zur Ermittlung des möglichen Mechanismus wurde anschließend der Phosphorylierungsstatus der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK1/2 in einer Zeitreihe von 0 bis 120 Minuten analysiert. Denn MAP-Kinasen werden nach Stimulation durch LPS oder A β phosphoryliert, translozieren in den Zellkern und starten dort die Transkription inflammatorisch relevanter Gene (Schumann et al., 1996; Chen und Wang, 1999; Chan und Riches, 2001; Koistinaho und Koistinaho, 2002). In *asm*^{-/-} Makrophagen wurden p38 und JNK nach LPS-Stimulation wesentlich stärker und früher phosphoryliert. Stimulation mit Pam3CSK4 hingegen brachten keine Unterschiede hervor. Phosphorylierung von ERK1/2 wurde in beiden Fällen nicht festgestellt, wobei nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Signalstärke unterhalb des

Detektionslimits des verwendeten Antikörpers lag. Eine Auflösung der Diskrepanz zwischen LPS- und Pam3CSK4-Stimulation erfordert Untersuchungen weiterer Signalwege, wie beispielsweise der NF- κ B-Signalweg.

4.2.3 *Asm knock out* verstärkt die A β -Phagozytose *in vitro*

Mikroglia und Makrophagen entstammen einem gemeinsamen Ursprung, nämlich hämatopoetischen Stammzellen. Sie teilen eine Reihe an Oberflächenrezeptoren, über denen sie endo- oder exogene Pathogene wie A β , Bakterien oder Viren detektieren und eliminieren. Veränderungen in der A β -Phagozytose spiegeln sich in Mikroglia und Makrophagen gleichermaßen wieder (Liu et al., 2012). Dadurch ist es legitim, über die phagozytische Aktivität der Makrophagen Rückschlüsse auf die der hirnresidenten Mikroglia oder vice versa zu ziehen. Der wesentliche Grund, weshalb experimentell Makrophagen den Mikroglia vorgezogen werden, liegt darin, dass die Proliferation der Mikroglia aus adulten Mäusen sehr langsam verläuft. Im Vergleich zu den Makrophagen werden erfahrungsgemäß fünffach mehr Tiere und ungefähr eine zehnfach längere Kultivierungsdauer benötigt, um letztlich eine ähnliche Zellzahl zu erhalten.

Daher wurden Makrophagen aus Mausknochenmark isoliert und mit aggregiertem A β 42 für unterschiedliche Zeitdauer inkubiert, um ihre phagozytische Aktivität mittels Durchflusszytometrie zu überprüfen. In diesem *in vitro* Experiment wurde verdeutlicht, dass *asm*-defiziente Makrophagen nicht nur mehr A β pro Zelle aufnehmen, sondern auch eine höhere Phagozytose-Bereitschaft aufwiesen. Für eine detaillierte Beurteilung der A β -Phagozytose wären Expressionsanalysen der Rezeptoren CD14, CD36 oder MSR1 hilfreich. Eine mögliche Erklärung für das abweichende Phagozytoseverhalten lieferten Ergebnisse aus der *lipid raft*-Isolation. Infolge des *lipid raft*-Shifts verschob sich auch der *raft*-ständige A β -Rezeptor CD14 in Fraktionen geringerer Dichte. Inwiefern diese Verschiebung sich auf die Bindeaffinität zwischen CD14 und A β auswirkt, ist unklar. Ferner sollte getestet werden, ob die transiente Rekrutierung weiterer A β -Rezeptoren wie TLR2 oder TLR4 zu den *lipid rafts* durch die *asm*-Defizienz beeinträchtigt wird.

Um auszuschließen, dass die erhöhte A β -Menge in den *asm*-defiziente Makrophagen auf ein mögliches Degradationsdefizit zurückzuführen war, wurde nachfolgend die Kinetik des A β -Abbaus untersucht. *Asm*^{-/-} Makrophagen zeigten einen vergleichbaren sukzessiven Abbau des aufgenommenen A β wie Zellen aus Wildtyp-Tieren. Eine Evaluation der Proteasen IDE und NEP würde zusätzliche Informationen über den A β -Abbau liefern.

4.2.4 *Asm*-Defizienz verringert die A β -Ablagerung in AD-Mausmodellen

Zur Verifikation der Resultate aus den *in vitro* Experimenten wurden *asm*^{ko} Tiere mit den AD-Mausmodellen TgCRND8 und APP/PS1-21 gekreuzt, um die Auswirkungen einer *asm*-Defizienz auf die AD-Pathologie *in vivo* zu untersuchen. Überraschenderweise konnte keine *app* tg/*asm*^{-/-} Maus aus der Kreuzung *asm*^{ko} x TgCRND8 generiert werden. Aus welchem Grund diese Kombination lethal ist, bleibt unbekannt. *App* tg/*asm*^{-/-} Tiere aus der Kreuzung *asm*^{ko} x APP/PS1-21 mit reinem C57BL/6-Hintergrund scheinen zwar lebensfähig zu sein, ihre Anzahl bleibt jedoch äußerst gering. Bis zum Ende dieser Arbeit stand keine Maus dieses Genotyps zur Verfügung, da das vorgesehene Testalter von 6 Monaten nicht erreicht wurde. Bedingt durch diese Einschränkung konnten lediglich *app* tg/*asm*^{+/+} und *app* tg/*asm*^{+/-} Mäuse miteinander verglichen werden. Die AD-Pathologie der Tiere aus beiden Kreuzungen wurde nach folgenden Kriterien ausgewertet: (1) A β -Load, (2) Performance in kognitiven Tests, (3) Menge der prä- und postsynaptischen Markerproteine und (4) Neuroinflammation.

In Übereinstimmung mit den *in vitro* Daten ist weder die Expression des APP noch die Generation des C99 in *app* tg Mäusen verändert. Aber die Menge an A β 40 und A β 42 in der Guanidin-HCl-Fraktion, die die unlöslichen A β -Aggregate repräsentiert und den überwiegenden Teil des cerebralen A β einnimmt, ist in *app* tg/*asm*^{+/-} Tieren aus beiden Kreuzungen signifikant verringert. Während sich die *asm*-Defizienz in TgCRND8 gleichmäßig auf A β 40 und A β 42 auswirkt, scheint der Effekt im APP/PS1-21-Mausmodell auf A β 40 wesentlich größer zu sein. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz liefert der genetische Hintergrund dieser beiden AD-Mausmodelle. Denn das APP/PS1-21-Mausmodell überexprimiert nicht nur eine andere Version des mutierten menschlichen APP695, sondern auch mutiertes PS1, sodass vorzugsweise A β 42 gebildet wird. Bei der Betrachtung des cerebralen A β -Loads muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass das Gesamtbild durch verschiedene Einflussfaktoren wie A β -Produktion, A β -Clearance und A β -Degradation geprägt wird. *Asm*-Defizienz vermindert nicht nur die A β -Produktion, sondern stärkt gleichzeitig die A β -Phagozytose. Der jeweilige Beitrag kann beispielsweise unter Verwendung des Cre-loxP-Systems ermittelt werden, indem das *smpd1*-Gen zelltypspezifisch deletiert wird.

Eine Verringerung des cerebralen A β -Gehalts ist in vielen Fällen mit einer Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten im AD-Mausmodell assoziiert (Arendash et al., 2006; Wang et al., 2007; Hao et al., 2011; Liu et al., 2012; Vom Berg et al., 2012). Die in dieser Arbeit verwendeten *barnes maze* und *morris water maze* sind bewährte Systeme zur Beurteilung der

räumlichen Orientierung und der Gedächtnisfunktion. APP/PS1-21-Mäuse zeigten in beiden Testansätzen ein einheitliches Lernverhalten, sodass keine Verbesserung in den *app tg/asm^{+/-}* Mäusen festgestellt wurde. Das Ergebnis stimmte mit den Beobachtungen der ursprünglichen Entwickler überein, die in diesem AD-Mausmodell erst ab einem Alter von 8 Monaten kognitive Defizite fanden. TgCRND8 *app tg/asm^{+/-}* Tiere zeigten zwar eine signifikant bessere Performance im *barnes maze* Test, verhielten sich jedoch ähnlich wie *app tg/asm^{+/+}* Tiere im *morris water maze* Test. Derartige Szenarien sind nicht ungewöhnlich und wurden auch in anderen Arbeiten berichtet (Arendash et al., 2006; Vom Berg et al., 2012). Schließlich sind die Abläufe im jeweiligen Verfahren äußerst unterschiedlich, wodurch die Resultate je nach eingesetztem Instrument und Protokoll stark voneinander abweichen können. Zur völligen Aufklärung dieses Sachverhalts können weitere gängige Instrumente zur Analyse des Lernverhaltens und des Erinnerungsvermögens wie *radial arm maze* oder *novel object recognition test* herangezogen werden.

Die Progression von AD korreliert mit dem Verlust von Synapsen und geht Hand in Hand mit der Reduktion des präsynaptischen Synaptophysins (Terry et al., 1991; Masliah et al. 2001). Auch in AD-Mausmodellen werden kognitive Defizite auf Verminderung des Synaptophysins oder des postsynaptischen PSD95 zurückgeführt (Hao et al., 2011; Liu et al., 2012). Deshalb dienen die prä- und postsynaptischen Markerproteine als wichtige Anhaltspunkte zur Beurteilung der synaptischen Integrität und Funktionalität aus molekularer Basis. In *app tg/asm^{+/+}* und *app tg/asm^{+/-}* Mäusen wurden vergleichbare Mengen an Synaptophysin, PSD95, sowie SNAP25 via *western blot* detektiert. Unabhängig vom AD-Modell wird Munc18-1 in *asm^{+/-}* Tieren angereichert. Falls in *app tg/asm^{+/-}* Tiere tatsächlich eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten vorliegt, bleibt die molekulare Ursache weiterhin verborgen und muss in künftigen Experimenten aufgeklärt werden. Bezüglich der synaptischen Funktionalität können möglicherweise elektrophysiologische Messungen der Langzeit-Potenzierung (*long-term potentiation*, LTP) Licht ins Dunkel bringen. Schließlich sind Übertragungen einzelner Impulse und LTP in AD-Mausmodellen entschieden gestört (Gengler et al., 2006).

Als weiterer Aspekt der AD-Pathologie wurde die Neuroinflammation untersucht. In den *in vitro* Versuchen wurde eine Zunahme der proinflammatorischen Aktivität nur in *asm^{-/-}* Makrophagen gefunden, aber nicht in den *asm^{+/-}* Zellen. Expressionsanalysen entzündungsrelevanter Gene (*tnf- α* , *inos*, *il-1 β* , *il-6*, *il-10* und *ccl-2*) bestätigten, dass das Profil der Neuroinflammation im *app tg/asm^{+/-}* Mausgehirn im Vergleich zu den *app tg/asm^{+/+}* Geschwistern unverändert blieb.

Zusammenfassend führt das Entfernen eines *asm*-Allels in AD-Mausmodellen zu signifikant reduzierten A β -Ablagerungen, wobei die Mengen beider prädominanten A β -Spezies, A β 40 und A β 42, verringert wurden. Mittels *barnes maze* Test wurde festgestellt, dass die Kognition der TgCRND8 *app tg/asm*^{+/-} Tiere im Vergleich zu den *app tg/asm*^{+/+} Geschwistern signifikant verbessert wurde. Die zugrundeliegende molekulare Ursache bleibt unklar. In Übereinstimmung mit den Resultaten aus den *in vitro* Experimenten hat der *asm*^{+/-}-Genotyp keine Auswirkung auf das Profil der Neuroinflammation. Diese Ergebnisse kennzeichnen ASM als ein neues mögliches Target zur Behandlung oder Prävention von AD. Eine gänzliche Inhibition der ASM-Aktivität ist aus therapeutischer Sicht ohnehin unerwünscht, damit im menschlichen Organismus keine Niemann-Pick-Krankheit ähnliche Symptome eingeleitet werden.

4.2.5 Verabreichen von Amitriptylin reduziert die Ablagerung von A β 42

Das Arzneimittel Amitriptylin wird vorwiegend als Antidepressiva und zur Schmerzbehandlung verwendet. Ferner gilt es als funktionaler Inhibitor der ASM und beschleunigt den Abbau dieses Proteins (Kornhuber et al., 2005; Teichgräber et al., 2008). Im Rahmen eines Pilotversuchs wurden TgCRND8 Mäuse mit 100 mg/l Amitriptylin im Trinkwasser über einen Zeitraum von 3 Monaten behandelt. Die A β 42-Menge sank signifikant, während der A β 40-Level konstant blieb. Der markante Unterschied zum genetischen ko Modell ist vielleicht dadurch zu erklären, dass das oral verabreichte Amitriptylin in der Leber zum lipophilen Nortriptylin verstoffwechselt werden muss, um die Blut-Hirn-Schranke passieren zu können. In *in vitro* Experimenten wurde der molekulare Wirkmechanismus des Amitriptylins näher untersucht. Wie im *asm*-kd Zellmodell blieb die Aktivität der α -Sekretase unangetastet. Allerdings wurden sowohl die Aktivität der β -Sekretase als auch die der γ -Sekretase nach Amitriptylin-Supplementation signifikant geschwächt. Somit ist davon auszugehen, dass das Amitriptylin und dessen Metabolite keine spezifische Inhibition der ASM bewirkt und wahrscheinlich mehrere Targets ansteuern.

**Teil II: Defizienz von Tenascin C mildert
Alzheimer-ähnliche Pathologien in einem
Mausmodell**

1 Einleitung

Einleitung zur Alzheimer-Krankheit siehe Teil I.

1.1 Nomenklatur der Tenascins

Tenascins sind Glykoproteine der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM), die in Vertebraten hochkonserviert sind (Chiquet-Ehrismann, 2004). Obwohl Proteine wie *ten-m/Odz* aus *drosophila melanogaster* aufgrund ähnlicher Motive in der Vergangenheit als mögliche Orthologe gehandelt wurden, sind sich die Forscher heute einig, dass die Familie der Tenascinproteine in Vertebraten einzigartig ist (Rubin et al., 1999). Derzeit sind vier Tenascins in Säugetieren identifiziert worden: Tenascin-C (TNC), Tenascin-R (TNR), Tenascin-W (TNW, auch bekannt als Tenascin-N, TNN) und Tenascin-X (TNX), die jeweils eine distinkte Expression in unterschiedlichen Geweben aufweisen (Hsia und Schwarzbauer, 2005). Im Gegensatz zu vielen anderen Vertretern der ECM wird die Zellausbreitung überhaupt nicht und die Zelladhäsion nur begrenzt von Tenascins begünstigt, wodurch sie als adhäsionsmodulierende ECM-Proteine eingestuft wurden (Mackie und Tucker, 1999; Chiquet-Ehrismann, 2004). Dass die Tenascins, die hauptsächlich von Zellen des Bindegewebes synthetisiert werden, eine tragende Rolle in den Entwicklungsphasen und bei pathologischen Ereignissen wie Verletzungen oder Tumorgenese einnehmen, gilt als unbestritten (Tucker, 1994; Hsia und Schwarzbauer, 2005). Jedoch bleiben die genauen Funktionen jedes einzelnen Moleküls bislang weitestgehend unentschlüsselt.

1.2 Struktur der Tenascins

Wie in der Abbildung 41 gezeigt, besitzen alle Tenascins ein ähnliches Grundgerüst. Der grundlegende Aufbau jedes Tenascins besteht aus N-terminalen *heptad*-Wiederholungen, epidermaler Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) -ähnlichen Wiederholungen, Wiederholungen aus Fibronectin Typ III Domänen (FTD) sowie einer Fibronectin-ähnlichen globulären Domäne am C-Terminus (Chiquet-Ehrismann, 2004; Hsia und Schwarzbauer, 2005). Die *heptad*-Wiederholungen stellen eine hochkonservierte Region des N-Terminus dar, die die Oligomerisierung der einzelnen Untereinheiten ermöglicht. Während TNC und TNW bevorzugt Hexamere bilden, lagern sich TNR-Untereinheiten meist zu Trimeren zusammen (Chiquet-Ehrismann, 2004). Verschiedene Isoformen, besonders ausgeprägt bei TNC, entstehen durch alternatives Splicen.

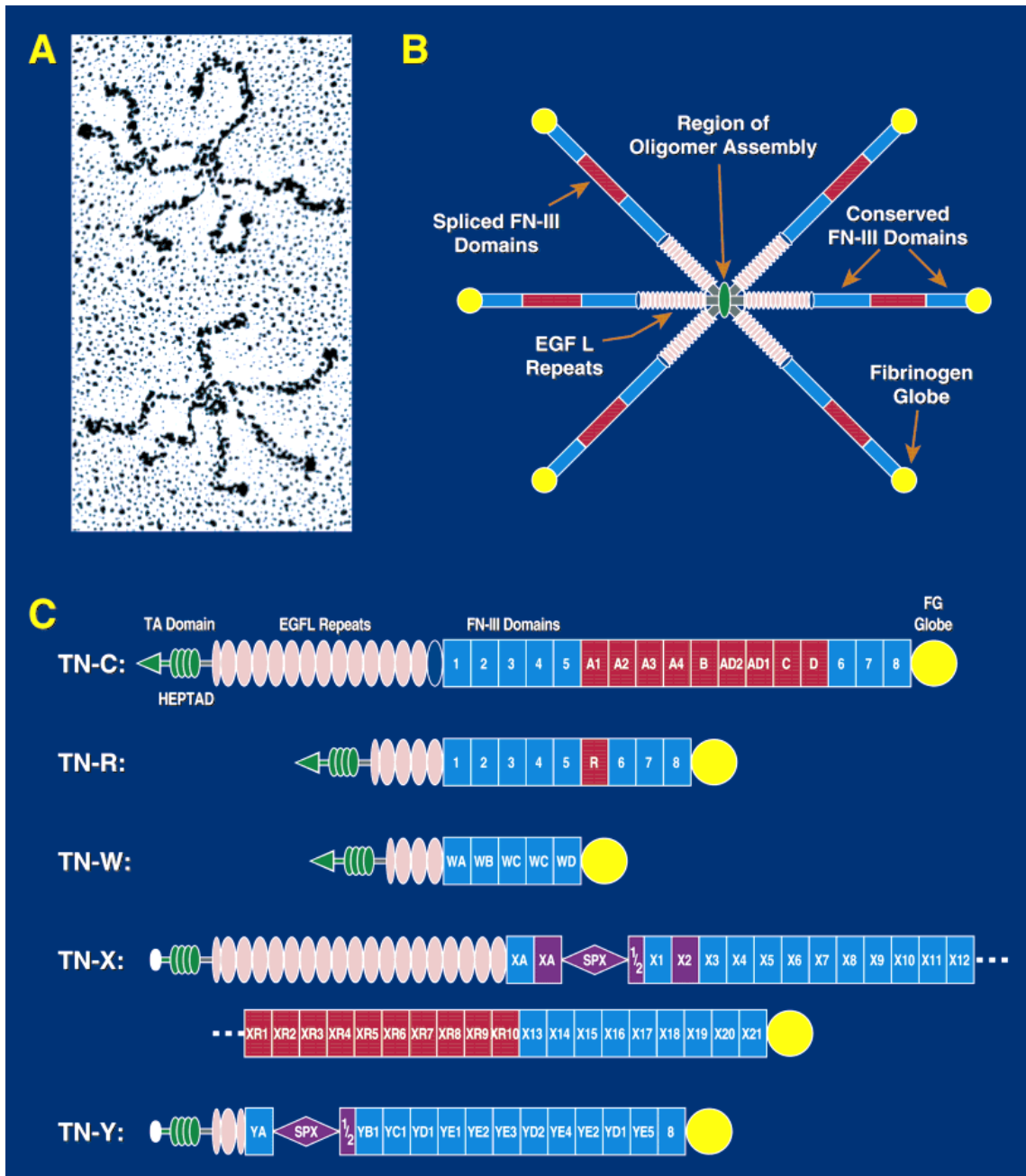


Abbildung 41: Struktur der Tenascins

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme zweier TNC-Hexamere. Jeder Arm hat eine Länge von etwa 100 nm. (B) Modell eines TNC-Hexamers. Die TNC-Untereinheiten sind zentral über *heptad*-Wiederholungen miteinander verbunden. Weiter in Richtung des C-Terminus sind EGF-ähnliche Wiederholungen, Wiederholungen aus Fibronectin Typ III Domänen (FTD) sowie eine Fibronectin-ähnliche globuläre Domäne angeordnet. FTD-Wiederholungen, die dem alternativen Splicevorgang unterliegen, sind rot gekennzeichnet. (C) Schematische Darstellung der fünf bislang bekannten Tenascins. TNC besitzt 13,5-14,5 EGF-ähnliche Wiederholungen und mindestens 8 FTD-Wiederholungen in Vertebraten. Weitere 9 FTD-Wiederholungen, die dem alternativen Splicevorgang unterliegen, sind rot gekennzeichnet. TNR hat 4,5 EGF-ähnliche Wiederholungen und 8 oder 9 FTD-Wiederholungen. TNW (bzw. TNN) setzt sich aus 3,5 EGF-ähnliche Wiederholungen und 5 FTD-Wiederholungen zusammen. TNX und TNY sind eng miteinander verwandt. Während eine TNX-Untereinheit 18,5 EGF-ähnliche Wiederholungen und mindestens 33 FTD-Wiederholungen beinhaltet, sind EGF-ähnliche sowie FTD-Wiederholungen bei TNY wesentlich kürzer. Außerdem ist eine ungewöhnliche Serin-Prolin-reiche Domäne (SPX) in TNX und TNY vertreten. (Abbildung stammt aus Jones und Jones, *Developmental Dynamics*, 2000)

1.3 Tenascin-C

Vor ungefähr 30 Jahren wurde ein oligomeres Glykoprotein, welches heute die Bezeichnung Tenascin-C (TNC) trägt, als *glia/mesenchymal extracellular matrix protein* (GMEM) erstmalig beschrieben (Bourdon et al., 1983). Unabhängig davon entdeckten und charakterisierten weitere Laboratorien in der Folgezeit das gleiche Molekül, sodass es viele Namen erhielt: *myotendinous antigen*, *hexabrachion*, *cytotactin*, *J1220/200*, *tenascin* und *neuronectin* (Chiquet und Fambrough, 1984; Erickson und Iglesias, 1984; Grumet et al., 1985; Kruse et al., 1985; Chiquet-Ehrismann et al., 1986; Rettig et al., 1989). Bedingt durch alternative Splicevorgänge reicht das Molekulargewicht der TNC-Untereinheiten von 190-300 kDa (Jones und Jones, 2000; Joester und Faissner, 2001). Das typische TNC von Säugern setzt sich aus N-terminale *heptad*-Wiederholungen, 14,5 EGF-ähnliche Wiederholungen und 8 FTD-Wiederholungen sowie einer Fibronektin-ähnlichen globulären Domäne am C-Terminus zusammen (Saga et al., 1992). Jedoch können 9 zusätzliche FTD-Wiederholungen individuell ein- oder ausgeschlossen werden, sodass eine maximale Diversität von 27 mRNA-Varianten im Mausgehirn entsteht (Joester und Faissner, 1999).

Das Expressionsprofil des TNC ist zeitlich strikt reguliert und unterscheidet sich gänzlich von anderen Proteinen der ECM wie Fibronektin oder Laminin. Im zentralen und peripheren Nervensystem wird TNC während der Embryogenese stark, während der Organogenese transient und im adulten Stadium nicht oder nur sehr eingeschränkt exprimiert (Jones und Jones, 2000; Chiquet-Ehrismann und Chiquet, 2003). Dabei wird TNC im zentralen Nervensystem (ZNS) hauptsächlich von unreifen und reaktiven Astrozyten sowie Radialgliazellen sezerniert und kann bereits am Tag 10 der Embryogenese detektiert werden (Brodkey et al., 1995; Kawano et al., 1995). Im peripheren Nervensystem exprimieren Schwann-Zellen TNC während der Myelinisierung peripherer Nerven (Jones und Jones, 2000). Obgleich der reife Organismus die Bildung des TNC annähernd einstellt, wird sie infolge pathologischer Ereignisse wie Verletzung, Infektion, Entzündung oder Tumorentwicklung wieder stark hochreguliert (Saga et al., 1992; Mackie, 1997; Chiquet-Ehrismann, 2004). Weiterhin ist bekannt, dass eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie *transforming growth factor-β* (TGF-β), *fibroblast growth factor-2* (FGF-2) oder der Phorbol-ester 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) die TNC-Bildung induzieren (Pearson et al., 1988; Erickson und Bourdon, 1989).

Aufgrund dreier grundlegenden Eigenschaften weckte TNC breites Interesse in der Wissenschaftswelt: (1) strikte Expression im sich entwickelnden Nervensystem, (2) ständige Präsenz in vielen Tumoren und (3) verstärkte Ausschüttung in der Nähe von Wunden

(Chiquet-Ehrismann et al., 1986; Erickson 1993; Tucker, 1994; Mackie, 1997). Aber die genaue Funktion bleibt weiterhin ungeklärt, da die Ergebnisse kontrovers diskutiert werden. Auf Zellkultur basierende *in vitro* Studien belegten, dass TNC sowohl adhäsionsfördernd als auch adhäsionsinhibierend wirken kann. Einerseits adhären Zellen schwach auf TNC-beschichteten Oberflächen, erschienen dabei rund und waren beweglich, wenn TNC als einziges Substrat angeboten wurde (Halfter et al; 1989; Lotz et al., 1989). Andererseits unterband TNC die Integrin-vermittelte Adhäsion von Fibroblasten aus Hühner und Ratten auf Fibronectin-beschichteten Oberflächen (Chiquet-Ehrismann et al., 1988). *In vivo* wurde anhand Mikroinjektion sowie Elektroporation von TNC *morpholino antisense* Oligonukleotiden in das Lumen des Neuralrohrs bzw. in die Neuralleiste bei Hühnerembryonen nachgewiesen, dass TNC die korrekte Migration der neuralen Vorläuferzellen gewährleisten (Tucker, 2001). Dabei wird das Wachstum der Neuriten von TNC unterstützt, die Verzweigung neu gebildeter Axone jedoch unterdrückt.

Das erste *tnc knock out (tnc ko)* Mausmodell, welches Anfang der 90er erschien, überraschte auf breiter Linie. Denn *tnc^{-/-}* Mäuse waren von ihren Wildtyp-Geschwistern nicht zu unterscheiden. Sie waren vital, fertil und ähnlich groß im Vergleich zu den Kontrolltieren. Selbst histologische Untersuchungen konnten weder Defekte im neuralen System noch in den sonstigen Organen entdecken (Saga et al., 1992). Diese Resultate wurden kurze Zeit später angezweifelt. Mitrovic und Schachner berichteten, dass das erste *tnc ko* Mausmodell weiterhin bestimmte TNC-Isoformen exprimiert und dass TNR und TNX in diesem Modell hochreguliert wurde und somit den Ausfall von TNC kompensiert (Mitrovic und Schachner, 1995). Zur vollkommenen Aufklärung dieser kontroversen Situation konstruierte Forsberg et al. eine weitere *tnc ko* Mauslinie, die wie das erste Modell phänotypisch normal erschien (Forsberg et al., 1996). Auch die Theorie der Kompensation des *tnc ko* durch Hochregulation von TNR oder TNX gilt mehr als fraglich, da mehrere Studien sowohl in Zellkulturexperimenten als auch im *tnc*-defizienten Mausmodell keine Veränderungen registrierten (Saga et al., 1992; Steindler et al., 1995; Sakai et al., 1996).

Obwohl *tnc ko* sich nicht dramatisch auf die Vitalität, Fertilität und die Entwicklung des neuralen Systems im Mausmodell auswirkt, konnten Abnormalitäten im Nervensystem auf den Verlust des TNC zurückgeführt werden. Abnormales Verhalten im *tnc ko* Modell zeichnete sich beispielsweise dadurch aus, dass viele *tnc*-defiziente Mäuse beim Schwimmen vor dem Ertrinken gerettet werden mussten (Fukamauchi et al., 1996). Eine detaillierte Studie des Ischiasnerv zeigte, dass die Anzahl nicht myelinisierten Nervenfasern in *tnc*-defizienten Tieren zunahm und dass die Fibrillen anstatt mit Schwann-Zellen vermehrt miteinander in

Kontakt traten (Cifuentes-Ciaz et al., 1998). Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Übertragungsgeschwindigkeit der Axone im ZNS und die synaptische Plastizität im Hippocampus der *tnc* ko Tiere beeinträchtigt wurden (Weber et al., 1999; Evers et al., 2002). Bezüglich möglicher Defekte in den Regenerationsprozessen herrscht Uneinigkeit. Während die Heilung der Haut sowie Erneuerung zerquetschter motorischer Endplatten nicht durch *tnc*-Defizienz beeinflusst wird, konnten Matsuda et al. nachweisen, dass TNC eine bedeutende Rolle in der Migration oder Überleben von Keratozyten bei der Wundheilung der Cornea einnimmt, weil Keratozyten in den Wunden von *tnc* ko Tieren fehlten (Forsberg et al., 1996; Moscoso et al., 1998; Matsuda et al., 1999). Eine präzise Funktion des TNC in der Tumorgenese wurde bislang nicht ermittelt. Eine Kreuzung von *tnc*-defizienten Mäusen mit einer Linie, die spontan Brustkrebs entwickelt, zeigte keinen Unterschied in der Entwicklungsgeschwindigkeit der primären Tumore und Metastasen, obwohl in Tumoren der *tnc* ko Mäusen eine stärkere Infiltration von Monozyten und Makrophagen beobachtet wurde (Talts et al., 1999).

Eine Assoziation von TNC mit Entzündungsprozessen rückte in jüngster Vergangenheit verstärkt in den Fokus. Sowohl proinflammatorische (beispielsweise Interleukin (IL)-1 β , *tumor necrosis factor* (TNF)- α oder Interferon (IFN)- γ) als auch antiinflammatorische Zytokine (beispielsweise IL-4 oder IL-13) können die Expression von TNC direkt einleiten (Chevalier et al., 1996; Chiquet-Ehrismann und Chiquet, 2003). Außerdem wurde neulich bekannt, dass Liganden der Toll-like Rezeptoren (TLR)-2, -4 und -5 die Bildung des TNC in Makrophagen und dendritischen Zellen fördern (Goh et al., 2010; Piccinini et al., 2012). Noch interessanter war die Erkenntnis, dass TNC die Inflammation in Makrophagen über den TLR4-*myeloid differentiation factor-88* (MyD88) Signalweg aktiviert (Midwood et al., 2009). Daher erschien es weniger überraschend, dass TNC bei Autoimmun-Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis oder Multiple Sklerose, die durch persistente Entzündungsreaktionen charakterisiert werden, in erheblichen Mengen ausgeschüttet wird (Gutowski et al., 1999; Midwood et al., 2009).

1.4 Tenascin-R, -W (bzw. -N) und -X

Im Gegensatz zu TNC sind die anderen Vertreter der Tenascin-Proteinfamilie, nämlich TNR, TNW (bzw. TNN) und TNX, weniger gut untersucht. TNR hat ein Molekulargewicht von 160-180 kDa und wird ausschließlich im ZNS synthetisiert (Schachner et al., 1994). Typischerweise besitzt dieses Molekül 4,5 EGF-ähnliche Wiederholungen und 8-9 FTD-

Wiederholungen. Während die 160 kDa-Isoform zur Dimerisierung neigt, lagern sich 180 kDa-Untereinheiten bevorzugt zu Trimeren zusammen. Ähnlich wie TNC wird TNR von Gliazellen des ZNS sezerniert. Jedoch erfolgt die Expression durch Oligodendrozyten zeitlich gesehen später als TNC (Schachner et al., 1994; Jones und Jones, 2000). *In vitro* und *in vivo* Studien belegten, dass TNR einerseits die neuronale Zelladhäsion begünstigt, aber andererseits abstoßend auf Neuriten wirkt (Zacharias et al., 2002; Becker et al., 2003). *Tnr* ko Mäuse sind zwar vital und fertil, weisen aber schwere kognitive und motorische Defizite auf (Weber et al., 1999; Montag-Sallaz und Montag, 2003).

TNX ist der größte Vertreter dieser Proteinfamilie. Mit 18,5 EGF-ähnliche Wiederholungen und 29 oder mehr FTD-Wiederholungen liegt dessen Molekulargewicht über 400 kDa. Wie andere Tenascins vermittelt auch TNX die Zelladhäsion, jedoch keine Zellausbreitung (Elefteriou et al., 1999). Es ist mit TNY im Huhn eng verwandt, wobei TNY lediglich eine komplette EGF-ähnliche Wiederholung besitzt (Bristow et al., 1993). Fibroblasten sezernieren TNX und TNY in der ECM des Muskelgewebes (Scherberich et al., 2000). *Tnx* ko Mäuse stellen das einzige Tenascin-Modell dar, das mit einer Krankheit des Menschen direkt assoziiert ist. Die hyperelastische Haut der *tnx* ko Tiere ist mit dem Phänotyp der Patienten, die unter dem Ehlers Danlos Syndrom leiden, vergleichbar (Mao et al., 2002). In beiden Fällen ist der Phänotyp auf Defekten des fibrillären Kollagens zurückzuführen.

TNW (oder TNN) wurde erstmals in Zebrafisch identifiziert (Weber et al., 1998). Die Untereinheiten des TNW setzen sich aus 3,5 EGF-ähnliche Wiederholungen und 5 FTD-Wiederholungen zusammen, sind ungefähr 130 kDa groß und formen Trimere. Die Expression von TNW wurde im Skelett, der Knochenhaut, der Niere und einigen Muskeln nachgewiesen (Scherberich et al., 2000).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Alzheimer-Krankheit (*Alzheimer's Disease*, AD) ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, die pathologisch durch extrazelluläre Amyloid-Ablagerungen bestehend aus Amyloid β (A β) Peptiden sowie chronische Inflammation im Gehirn gekennzeichnet ist. Das extrazelluläre Matrixprotein TNC, dessen Expression sowohl durch proinflammatorische als auch antiinflammatorische Mediatoren eingeleitet wird, agiert als ein Ligand des Immunrezeptors TLR4. Folglich gilt es herauszufinden, inwiefern TNC ein endogener Aktivator der chronischen Entzündungsprozesse in AD darstellt. In dieser Arbeit wurden *tnc*^{-/-}

Mäuse mit dem Alzheimer-Mausmodell TgCRND8 verpaart, um mögliche Effekte einer *tnc*-Defizienz in AD unter folgenden Aspekten zu untersuchen:

1. Wie wirkt sich die *tnc*-Defizienz auf die Neuroinflammation aus?
2. Wird die extrazelluläre A β -Ablagerung infolge des *tnc* ko verstärkt oder verringert?
3. Können Schäden an den neuronalen Synapsen nach *tnc* ko vermindert werden?

2 Material und Methoden

Falls nicht in den unteren Abschnitten beschrieben, gleichen Material und Methoden den Angaben im Teil I.

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Herkunft
Entwässerungsautomat TP1020	Leica Microsystems (Nussloch Deutschland)
Kühlplatte EG1150C	Leica Microsystems (Nussloch Deutschland)
Mikrowelle R-204 (W)	Sharp Electronics (Hamburg, Deutschland)
Objekträger-Streichtisch OTS 40	Melite (Burgdorf, Deutschland)
Paraffineinbettungsmaschine	Leica Microsystems (Nussloch Deutschland)
Schlittenmikrotom SM 2000 R	Leica Microsystems (Nussloch Deutschland)
Veri-Shaker Schüttelgerät	Dynatech (Denkendorf, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Herkunft
Einbettkassetten für Paraffin	Labonord (Templemars, Frankreich)
Färbeküvette aus Kunststoff	A. Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Mikroskopische Deckgläser 24x32 mm	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Mikrotomklingen Typ A35	PFM (Köln, Deutschland)

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Herkunft
(3-Aminopropyl) triethoxysilane	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Casein	Fluka (Buchs, Schweiz)
Citrat	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Diaminobenzidin-Hydrochlorid (DAB)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Entellan	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
HCl	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Mayer's Hämalaunlösung	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Poly-L-Lysin Hydrobromid (PLL) mol wt 30-70k	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Wasserstoffperoxid	Otto Fischar (Saarbrücken, Deutschland)
Xylol	Otto Fischar (Saarbrücken, Deutschland)

2.1.4 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Tabelle 10: Primerpaare für die Real-Time-quantitative-PCR mit SYBR® Green

Gen	Primer forward 5' - 3'	Primer reverse 5' - 3'
<i>human β-actin</i>	CACTCTTCCAGCCTTCCTTC	TGATCTCCTTCTGCATCCTG
<i>human tnc</i>	CGGGAACACAGTGGAGTATG	TGATGGTTGAGCTCTTCTGG
<i>human tnn</i>	CATCTTCAGGCACAACATCC	CTTCCTCCAGCTTCTTCACC
<i>human tnr</i>	TACAAGGGAGCATGGTGGTA	GAACTCATGGCCTTTCCAAT
<i>human tnxb</i>	CGAGTTTGACTCCTTCGTGA	TTCTTGCCAACAAACCCATA
<i>mouse cd14</i>	ACGGTACAGCTGCAAGGACT	CTTCAGCCCAGTGAAAGACA
<i>mouse myd88</i>	AAGCAGCAGAACCAGGAGTC	CCTTTGTTTGTGGGACACTG
<i>mouse tlr1</i>	GGACCTACCCTTGCAAACAA	GGTGGCACAAGATCACCTTT
<i>mouse tlr2</i>	TTCTGATGGTGAAGGTTGGA	GATGCTCCAGAGATGAACGA
<i>mouse tlr3</i>	TTGTCTTCTGCACGAACCTG	GGCAACGCAAGGATTTTATT
<i>mouse tlr4</i>	ACCTGGCTGGTTTACACGTC	GTGCCAGAGACATTGCACAA
<i>mouse tlr5</i>	GCCACATGATTTCCACTCCT	ACAGCCGAAGTTCCAAGAGA
<i>mouse tlr6</i>	CCAAGAACAAAAGCCCTGAG	TGTTTTGCAACCGATTGTGT
<i>mouse tlr7</i>	GGAAATTGCCCTCGATGTTA	CAAAAATTTGGCCTCCTCAA
<i>mouse tlr8</i>	GAAGCATTTTCGAGCATCTCC	GAAGACGATTTTCGCAAGAG
<i>mouse tlr9</i>	ACTGAGCACCCCTGCTTCTA	AGATTAGTCAGCGGCAGGAA
<i>mouse tlr11</i>	TCTCCTGCTGTTGTTTCTGG	CAGCATTCCTGCAGTCCTTA
<i>mouse tlr12</i>	TATCTCAGGAGGCTCTGGCT	TGACACATCTCCCGTCTCAT
<i>mouse tlr13</i>	TCACAAAGACGCCTTCACTC	GGTGGGTCAGAGAAACCACT
<i>mouse tnc</i>	CAGTGGAGTACGAGCTGCAT	TAAACTTGGTGGCGATGGTA
<i>mouse tnn</i>	TTTCTGCTTGCTTCTGTGCT	TTGAACCAGAGCAGACTTGG
<i>mouse tnr</i>	ACCCTCACAGATCTGGTTCC	GGAGGCTGTTACCATGAGGT
<i>mouse tnxb</i>	ACAACCGACAAACAACCAGA	TATCCACGAGAGGCTCACAG

2.1.5 Antikörper

Tabelle 11: Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Herkunft
<i>mouse monoclonal anti amyloid beta</i>	Dako (Hamburg, Deutschland)
<i>rabbit polyclonal anti amyloid fibrils OC</i>	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
<i>rabbit polyclonal anti oligomer A11</i>	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
<i>rabbit polyclonal anti Iba1</i>	Wako Chemicals (Neuss, Deutschland)
<i>goat anti rabbit biotin conjugate</i>	Jackson ImmunoResearch (Surfolk, UK)

2.1.6 Kits

Das DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit wurde von Thermo Scientific (Bonn, Deutschland) bezogen. Das VECTASTAIN Elite ABC Kit stammte von Vector Laboratories (Peterborough, UK).

2.1.7 Mäuse

Tnc ko Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Melitta Schachner (Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg, Universität Hamburg, Deutschland) bereitgestellt. Wildtyp C57BL/6 Mäuse stammten aus der eigenen Tierhaltung nach SPF-Standard.

Um die Auswirkungen des *tnc* ko im Alzheimer-Mausmodell zu untersuchen, wurde die Linie *tnc* ko mit TgCRND8 gekreuzt. Der Phänotyp der Tiere aus beiden Kreuzungen wurde bei einem Alter von 4 Monaten analysiert.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung muriner Mikroglia

Primäre murine Mikroglia wurden auf Poly-L-Lysin Hydrobromid (PLL, Molekulargewicht 30,000-70,000) beschichtete 75 cm² Kulturflaschen kultiviert. Als Vorbereitung wurden Kulturflaschen mit 100 µg/ml PLL in *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS, ohne Phenolrot) für mindestens 3 h bei 37 °C beschichtet. Vor dem Gebrauch wurden sie 2x mit 15 ml PBS gewaschen.

Für die Isolation muriner Mikroglia wurden neugeborene Mäuse, die nicht älter als 3 Tage waren, geopfert. Der Kopf wurde mit einer Schere abgetrennt, der Schädel aufgeschnitten und das Gehirn freipräpariert. Nachdem die Hirnhäute und der Plexus entfernt wurden, wurde das restliche Gewebe bestmöglich zerkleinert und in 5 ml HBSS überführt. Mit 1 ml und 200 µl Pipetten wurden die Zellen vereinzelt und anschließend bei 300 xg, 8 min, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 12 ml DMEM+10% FCS resuspendiert und in die PLL-beschichteten Kulturflaschen übertragen. Nach 2 Wochen konnten die Zellen experimentell verwendet werden. Mikroglia aus dieser Astrozyten/Mikroglia-Mischkultur wurden gesammelt, indem die Flaschen in einem auf 37 °C vorgewärmten Veri-Shaker Schüttelgerät (Dynamech) für 30 min, 200 rpm geschüttelt wurden.

2.2.2 Stimulation muriner Mikroglia mit A β

Primäre Mikroglia (2×10^5 Zellen/Well) wurden in DMEM+10% FCS auf 48-Well Platte gesät. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden für 1 h, 3 h, 6 h oder 24 h mit 200 μ l DMEM+10% FCS+10 μ M aggregiertem A β 42 inkubiert. Mikroglia ohne Kontakt zum A β 42 wurden als Kontrollen verwendet. Nach der geplanten Inkubationsdauer wurde das A β 42 entfernt und die Zellen 2x mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 0,05% Trypsin/EDTA (1x) vom Boden der Wells abgelöst und bei 300 xg, 8 min, 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml TRIzol[®] (Invitrogen) aufgenommen und die RNA nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.3 Durchführung der Real-Time-quantitative-PCR mit TaqMan[®] Probe

Isolation der RNA sowie reverse Transkription entsprachen den Durchführungen im Teil I. TaqMan[®] Probes wurden von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Für die Detektion der Transkripte *arginase 1 (arg1)*, *C-type mannose receptor 1 (mcr1)*, *chitinase-3-like protein 3 (chi3l3)*, *cd36*, *insulin-degrading enzyme (ide)*, *low density lipoprotein-receptor related protein 1 (lrp1)*, *macrophage scavenger receptor 1 (msr1)*, *neprilysin (nep)* und *receptor for advanced glycation endproducts (rage)* (alle Maus) wurde das DyNAmo[™] Flash Probe qPCR Kit (Thermo Scientific, Bonn, Deutschland) verwendet. Als Haushaltsgen wurde *18S rRNA* genutzt.

Ein Reaktionsmix mit 20 μ l Volumen setzte sich folgendermaßen zusammen:

Komponenten	Menge	Endkonzentrationen
2x DyNAmo [™] Flash Probe Master Mix	10 μ l	1x
Primer Mix inklusive Probe	1 μ l	500 nM Primer, 250 nM TaqMan [®] Probe
50x ROX Referenz-Farbstoff	0,4 μ l	1x
cDNA	1 μ l	max. 150 ng
ddH ₂ O	7,6 μ l	-

Das Cycling-Protokoll beinhaltet folgende Reaktionsschritte:

Schritt	Wirkung	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Initial-Denaturierung	95 °C	7 min	1
2	Denaturierung	95 °C	5 s	45
	Annealing+Elongation	60 °C	30 s	

Nach dem Amplifikationsvorgang wurden die Schwellenwerte (Ct) jedes Testgens innerhalb des exponentiellen Bereichs ermittelt. Δ Ct-Werte berechnete sich aus Ct (*18S rRNA*) - Ct (Testgen) der gleichen Probe. Das Verhältnis der Transkripte wurde mit $2^{(\Delta Ct)}$ dargestellt.

2.2.4 Immunhistochemie

2.2.4.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Für histologische Untersuchungen wurde Maushirngewebe, nachdem sie für mindestens 48 h in 4% PFA eingelegt wurden, in Paraffin eingebettet. Dabei wurde das Gewebe in die entsprechenden Einbettkassetten gelegt und über eine ansteigende Ethanolreihe entwässert. Danach wurde das Gewebe in flüssiges Paraffin eingebettet und auf einer Kühlplatte bei -18 °C für 1 h aufbewahrt, bevor das Paraffin aushärtete und seriell 100x 2 µM Schnitte von jedem Präparat angefertigt wurde. Die Paraffinschnitte wurden auf Silan-beschichtete Objektträger geladen und für 16 h bei 60 °C aufbewahrt, um das Paraffin zum Schmelzen zu bringen.

2.2.4.2 Immunhistochemische Färbung von A β

Vor der immunhistochemischen Färbung wurden die Paraffinschnitte in einer absteigender Alkoholreihe (Reihenfolge: 2x 5 min Xylol, 2x 3 min 100% Ethanol, 3 min 96% Ethanol, 3 min 70% Ethanol, 3 min 50% Ethanol, dest. Wasser) entparaffiniert. Im Anschluss wurden die Schnitte in eine Kunststoffküvette platziert, welche mit 2 mM HCl komplett gefüllt war. Um Epitope der Antigene zu demaskieren, wurde die Lösung zunächst mit einem herkömmlichen Mikrowellengerät bei 580 W für 5x 3 min erhitzt und dann mit dest. Wasser rasch abgekühlt. Als weiterer Schritt der Antigendemaskierung wurden die Schnitte 1 min in 100% Ameisensäure getaucht, bevor sie 2x 5 min in TBS und 5 min in TBS+0,1% Tween 20 für die weitere immunhistologische Detektion äquilibriert wurden. Zur Absättigung gewebeeigener Peroxidasen wurden die Schnitte in bidest. Wasser+3% H₂O₂+17% Methanol für 30 min inkubiert und anschließend 2x 5 min in TBS und 5 min in TBS+0,1% Tween 20 gewaschen. Um unspezifische Bindestellen zu blockieren, wurden die Schnitte in eine feuchte Kammer transferiert und mit PBS+0,1% Tween 20+0,2% Casein (w/v) für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS und TBS+0,1% Tween 20 wurde der Primärantikörper Maus monoklonal anti human Amyloid β (Dako, Klon 6F/3D) in PBS+0,02% Casein (w/v) 1:100 verdünnt und auf die Schnitte gleichmäßig verteilt. Die Inkubation des Primärantikörpers fand

in einer feuchten Kammer bei 4 °C statt und die Inkubationsdauer betrug 16 h. Die Schnitte wurden wieder gewaschen und mit dem Sekundärantikörper Ziege anti Maus HRP (Dako) 1:100 in PBS+0,02% Casein (w/v) für 1,5 h bei RT inkubiert. Nach dem letzten Waschgängen 2x 5 min in TBS und 5 min in TBS+0,1% Tween 20 wurden die Schnitte mit 1 mg/ml 3,3'-Diaminobenzidin-Hydrochlorid (50 mg 3,3'-Diaminobenzidin-Hydrochlorid in 50 ml TBS+17 µl 30% H₂O₂) für 3 min bei RT entwickelt. Für die Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Präparate für 30 s in Mayer's Hämalaunlösung getaucht und anschließend 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Als letzter Arbeitsschritt durchliefen die Schnitte zur Entwässerung eine aufsteigende Alkoholreihe (Reihenfolge: dest. Wasser, 3 min 50% Ethanol, 3 min 70% Ethanol, 3 min 96% Ethanol, 2x 3 min 100% Ethanol, 2x 5 min Xylol), bevor sie jeweils mit 2 Tropfen des Einschlussmittels Entellan[®] eindeckt wurden.

2.2.4.3 Immunhistochemische Färbung der amyloiden Fibrillen

Die Durchführung der Entparaffinierung entsprach den Angaben im Abschnitt 2.2.4.2. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte 3x 5 min in 1 mM Zitratpuffer [pH6,0] in einem Mikrowellengerät aufgeköcht und 30 min bei RT langsam abgekühlt. Die Schnitte wurden 2x 5 min in TBS und 5 min in TBS+0,1% Tween 20 gewaschen und zur Absättigung gewebeeigener Peroxidasen in bidest. Wasser+3% H₂O₂+17% Methanol für 30 min inkubiert. Nach erneuten Waschgängen wurden unspezifische Bindestellen mit PBS+0,1% Tween 20+0,2% Casein (w/v)+0,1% Triton X-100 für 1 h bei RT blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper Hase polyklonal anti amyloid Fibrillen OC (Millipore) 1:500 in PBS+0,01% Tween 20+0,02% Casein (w/v)+0,1% Triton X-100 dauerte 16 h bei 4 °C. Nicht gebundene Antikörper wurden mit TBS (2x 5 min) und TBS+0,1% Tween 20 (5 min) abgewaschen. Der Sekundärantikörper Ziege anti Hase Biotin (Jackson ImmunoResearch) wurde mit PBS+0,01% Tween 20+0,02% Casein (w/v)+0,1% Triton X-100 1:500 verdünnt und mit den Schnitten 1 h bei RT inkubiert. Wieder wurden die Schnitte mit TBS (2x 5 min) und TBS+0,1% Tween 20 (5 min) gewaschen und anschließend das Biotin mit 80 µl ABC Arbeitslösung (VECTASTAIN Elite ABC Kit) für 1 h bei RT detektiert. Nachfolgende Arbeitsschritte bezüglich der Entwicklung mit DAB, Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaunlösung sowie Entwässerung glichen den Angaben im Abschnitt 2.2.4.2.

2.2.4.4 Immunhistochemische Färbung von Mikroglia

Der Primärantikörper Hase polyklonal anti Iba1 (Wako) wurde 1:500 in PBS+0,01% Tween 20+0,01% Triton X-100 verwendet. Der Ziege anti Hase Biotin konjugierte Sekundärantikörper (Jackson ImmunoResearch) wurde 1:250 in PBS+0,01% Tween 20 appliziert. Weitere Arbeitsschritte glichen den Angaben im Abschnitt 2.2.4.2 und 2.2.4.3.

2.2.4.5 Auswertung immunhistochemischer Färbungen

Vom Hirngewebe jeder Maus wurden 4 äquidistante Schnitte mit 60 µm Interval mit dem entsprechenden Antikörper angefärbt und mit dem Nikon Eclipse E600 Mikroskop fotografiert. Für die Bestimmung der Anzahl an Mikroglia im Hippocampus wurden nur die immunpositive Zellen, deren Zellkerne eindeutig durch das Hämatoxylin gefärbt wurden, gezählt und als Verhältnis zur Gesamtfläche des Hippocampus (Zellzahl/mm²) berechnet. Zur Quantifizierung der Aβ-Ablagerungen oder Aβ-Fibrillen im Mausgehirn wurden stellvertretend der gesamte Hippocampus und der kortikale Bereich dorsal zum Hippocampus ausgewählt. Flächen immunpositiver Regionen aus dem Hippocampus oder Cortex wurden mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware NIS-Elements BR (Nikon, Version 2.2) bestimmt und als prozentualer Anteil der entsprechenden Gesamtfläche angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Das Alzheimer-Mausmodell TgCRND8 und Inflammation

Die Alzheimer-Krankheit (*Alzheimer's Disease, AD*) ist eine fortschreitende, neurodegenerative Erkrankung, die durch chronische Entzündung begleitet wird. Das Alzheimer-Mausmodell TgCRND8 zeichnet sich durch diffuse und kompakte A β -Ablagerungen in Form von neuritischen Plaques ab einem Alter von 3 Monaten aus (Dudal et al., 2004). Dieser Vorgang wird als Ursache für die zeitgleich auftretende Entzündung betrachtet.

Um die Expression inflammatorisch relevanter Gene *tnf- α* , *ccl-2*, *il-1 β* , *il-6* und *il-10* nach dem Einsetzen der A β -Plauebildung zwischen TgCRND8 und C3H Wildtyp-Mäusen zu vergleichen, wurde die RNA aus dem Großhirn 4 Monate alter Tiere isoliert und revers transkribiert. Die Quantifizierung der Gentranskripte erfolgte mittels Real-Time-quantitative-PCR. Als Ergebnis wurde festgehalten, dass TgCRND8 Mäuse bereits in dieser frühen Phase der Krankheitsentwicklung signifikant verstärkte Expression der proinflammatorischen Gene *tnf- α* ($p = 0,013$), *ccl-2* ($p = 0,003$) und *il-6* ($p = 0,044$) aufwiesen (Abb. 42 links). Jedoch legten die detektierten Mengen an *il-10*-Transkripten nahe, dass die Expression der antiinflammatorischen Gene in diesem Alzheimer-Mausmodell simultan erhöht war ($p = 0,044$) (Abb. 42 rechts).

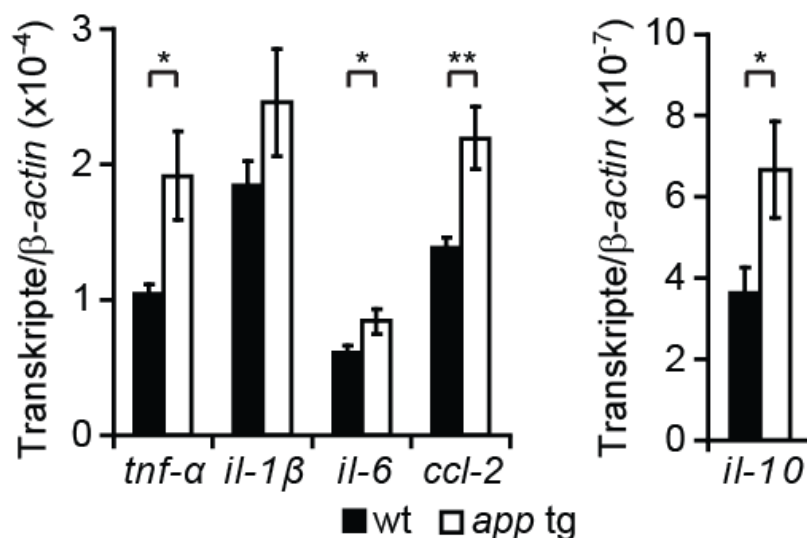


Abbildung 42: Inflammation im Gehirn von Wildtyp-Mäusen und Alzheimer-Mausmodell

RNA wurde aus den Gehirnen 4 Monate alter C3H Wildtyp (wt) und TgCRND8 *app695 tg* Mäuse isoliert. Transkripte inflammatorisch relevanter Gene *tnf- α* , *il-1 β* , *il-6*, *il-10* und *ccl-2* wurden mittels Real-Time-quantitative-PCR ermittelt (n = 6 je Gruppe). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

3.2 Expression der Tenascin-Genfamilie in Wildtyp und TgCRND8 Mäuse

Die murine Tenascin-Genfamilie setzt sich aus den Genen *tnc*, *tnr*, *tnn* und *tnxb* zusammen. Sie kodieren für extrazelluläre Matrixproteine, deren Basisstruktur aus EGF ähnliche Wiederholungen und Fibronectin-III Domänen bestehen. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Tenascin-Genfamilie und AD zu erschließen, wurden die Mengen der Tenascin-Gentranskripte in TgCRND8 und C3H Wildtyp-Mäusen durch Real-Time-quantitative-PCR ermittelt. Im Vergleich zu Wildtyp-Tieren war nur die Expression von *tnc* in TgCRND8 Mäusen signifikant erhöht ($p = 0,001$). Die *tnr*- und *tnn*-Transkripte zeigten keine Unterschiede, während die mRNA von *tnxb* in *app695* transgenen Tieren reduziert wurde ($p = 0,001$). Aus diesen Ergebnissen ging hervor, dass das Expressionsprofil der Tenascin-Genfamilie sich im Alzheimer-Mausmodell spezifisch veränderte und dass das *tnc*-Gen in Verbindung zur AD-Pathophysiologie steht.

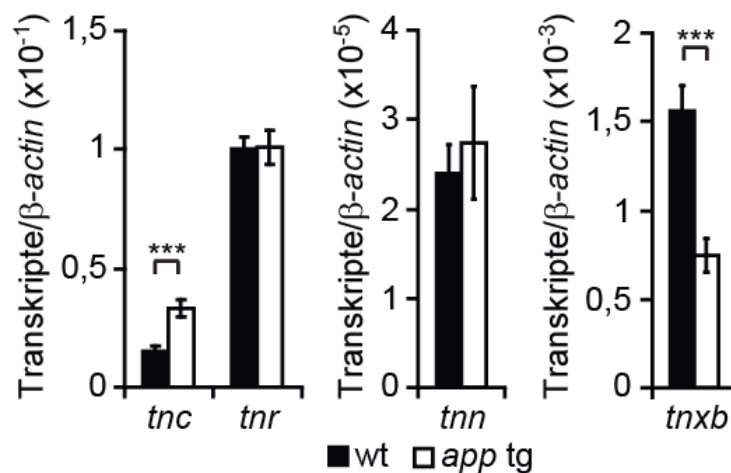


Abbildung 43: Expression der Tenascin-Genfamilie in Wildtyp-Mäusen und Alzheimer-Mausmodell

RNA wurde aus den Gehirnen 4 Monate alter C3H Wildtyp (wt) und TgCRND8 *app695* tg Mäuse isoliert. Transkripte muriner Tenascin-Gene *tnc*, *tnr*, *tnn* und *tnxb* wurden mittels Real-Time-quantitative-PCR ermittelt (n = 6 je Gruppe). *** $p \leq 0,001$.

3.3 Aggregiertes A β 42 verstärkt *tnc*-Expression in Mikroglia

Nachdem die Überexpression des *tnc* im Gehirn des Alzheimer-Mausmodells festgestellt wurde, galt es aufzuklären, aus welchem zellulären Ursprung die überhöhte Menge an *tnc*-Transkripten stammen könnte. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden murine Mikroglia aus Neugeborenen für 1 h, 3 h, 6 h oder 24 h mit 10 μ M aggregiertem A β 42 inkubiert und die RNA im Anschluss extrahiert, um die Bildung der Tenascin-Transkripte in einer zeitabhängigen Auflösung mittels Real-Time-quantitative-PCR zu bestimmen. Die

Stimulation mit aggregiertem A β 242 resultierte in einer signifikant ansteigenden Expression des *tnc*-Gens (Abb. 44). Bereits nach einer Stunde wurden etwa doppelt so viele *tnc*-Transkripte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle gebildet ($p = 0,003$). Die Menge steigerte sich mit zunehmender Inkubationsdauer, bis sie nach 24 h dem 6-fachen Wert der Kontrollprobe entsprach (für 3 h, 6 h und 24 h $p < 0,001$). Die Transkripte anderer Tenascin-Gene hingegen blieben auf einem sehr geringen Niveau und wiesen keine eindeutigen Profile in Abhängigkeit der Inkubationsdauer auf. Demzufolge konnte die Überexpression des *tnc* in murinen Mikroglia durch A β -Aggregate spezifisch eingeleitet werden.

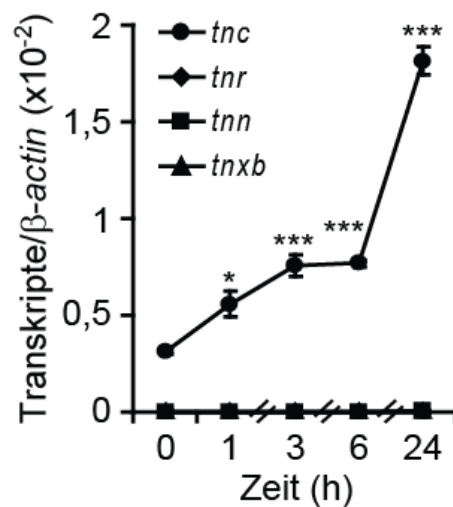


Abbildung 44: A β 242 stimuliert die *tnc*-Expression in Mikroglia

Mikroglia aus neugeborenen C57/BL6N Mäusen wurden mit 10 μ M aggregiertem A β 242 für 0 h, 1 h, 3 h, 6 h und 24 h inkubiert. Im Anschluss wurde die RNA aus den Zellen isoliert und die Transkripte von *tnc*, *tnr*, *tnn* und *tnxb* mittels Real-Time-quantitative-PCR quantifiziert (n = 5). * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$.

3.4 Keine *tnc*-Überexpression in human *app695* transfizierten SH-SY5Y

pEYFP-N1 human *app695* transfizierte SH-SY5Y (Herstellung siehe Abschnitte 2.2.3 und 2.2.4 im Teil I) und die zugehörigen Kontrollen wurden ausgewählt, um die Tenascin-Expression in neuronalen Zellen im Abhängigkeit der *app695*-Überexpression zu studieren. Zelllysate der pEYFP-N1 human *app695* sowie mit Kontrollplasmid transfizierten SH-SY5Y wurden hergestellt, um zunächst den Transfektionserfolg mit *western blot* zu bestätigen (Abb. 45 A). Nachfolgend wurde die RNA aus jeweils 2 Mio. Zellen mit TRIzol[®] extrahiert und revers transkribiert. Die Ergebnisse aus der Real-Time-quantitativen-PCR belegten, dass die Überexpression des human *app695* in SH-SY5Y nicht zur verstärkten Transkription von Tenascin-Genen führte. Im Gegenteil, während die Menge der *tnc*-, *tnn*- und *tnxb*-Transkripte

weitestgehend konstant blieben, wurde ein signifikanter Rückgang der *tnr*-Transkripte beobachtet ($p = 0,007$) (Abb. 45 B). Folglich steht eine Überexpression des *app695* in neuronalen Zellen nicht im Zusammenhang mit den überhöhten *tnc*-Transkripten im Alzheimer-Mausmodell.

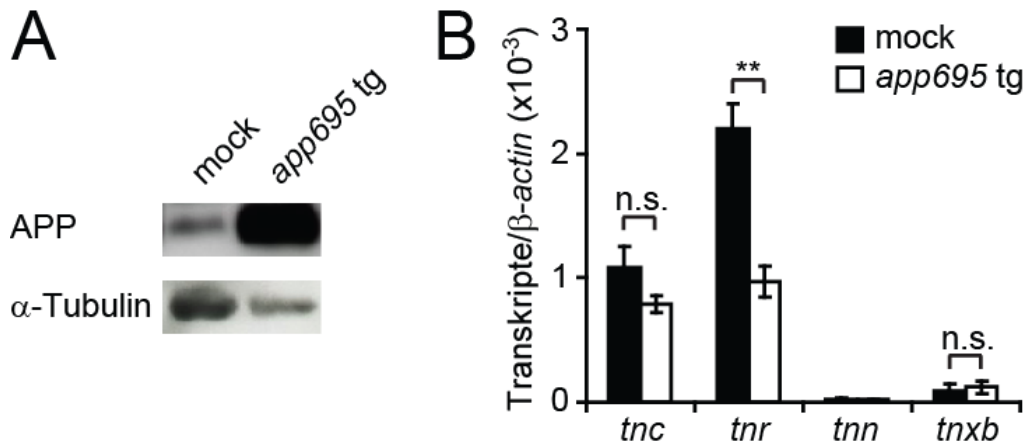


Abbildung 45: Expression der Tenascin-Genfamilie in SH-SY5Y nach *app695*-Überexpression

SH-SY5Y Zellen wurde mit dem pEYFP-N1 *app695* Konstrukt (*app695* tg) oder dem leeren pEYFP-N1 Plasmid (mock) stabil transfiziert. (A) Nachweis der Überexpression des APP695 Proteins im *western blot*. (B) RNA aus Kontrollzellen und APP695 überexprimierenden SH-SY5Y wurden isoliert und die Expression von *tnc*, *tnr*, *tnn* und *tnxb* mittels Real-Time-quantitative-PCR überprüft ($n = 3$). ** $p \leq 0,01$. n.s. = nicht signifikant.

3.5 *Tnc*-Defizienz verschiebt die Inflammation vom M1- zum M2-Profil

Während einer Immunantwort im Gehirn können sich ruhende Mikroglia zu zwei unterschiedlichen Phänotypen polarisieren, M1 und M2 (Fumagalli et al., 2011). Der sogenannte „klassische Weg“ M1 wird durch IFN- γ oder LPS eingeleitet. Mikroglia des M1-Phänotyps setzen große Mengen an proinflammatorischen Zytokinen bzw. Chemokinen wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 oder CCL-2 frei und sind dadurch am Untergang der Neuronen direkt beteiligt. Die „alternative Aktivierung“ M2 wird über Stimulation mit IL-4, IL-10 oder IL-13 eingeschlagen. In Mikroglia mit M2-Phänotyp werden Transkripte von *il-10*, *arginase 1* (*arg1*), *chitinase 3 like 3* (*chi3l3*), *C-type mannose receptor 1* (*mrc1*) vermehrt gebildet. Außerdem schütten sie neurotrophische Faktoren wie *insulin-like growth factor β subunit* (IGF- β) oder *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) aus, um sich an der Genesung verletzter neuronaler Bereiche zu beteiligen.

Es ist bekannt, dass das Tenascin-C (TNC) ein Agonist des Toll-like Rezeptors 4 darstellt und aktiv die Synthese proinflammatorischer Zytokine induziert (Midwood et al., 2009). Um mögliche Veränderungen der Inflammation bezüglich der M1- und M2-Aktivierungen nach

tnc knock out (*tnc* ko) festzustellen, wurden Transkripte des M1-Phänotyps (*tnf- α* , *ccl-2*, *inos*, *il-1 β* und *il-6*) und des M2-Phänotyps (*il-10*, *mrc1*, *chi3l3* und *arg1*) mittels Real-Time-quantitative-PCR quantifiziert. Die Expressionsprofile der *tnc*^{-/-} und der *app tg/tnc*^{-/-} Mäusen wurden mit denen ihrer Geschwister (*tnc*^{+/+} bzw. *app tg/tnc*^{+/+} und *app tg/tnc*^{+/-}) verglichen. Im Vergleich zwischen *tnc*^{+/+} und *tnc*^{-/-} Mäusen war es ersichtlich, dass bei einer *tnc*-Defizienz die Bildung aller getesteten M1-Transkripte (*tnf- α* *p* = 0,013; *ccl-2* *p* = 0,005; *inos* *p* = 0,004; *il-1 β* *p* = 0,002; *il-6* *p* = 0,002) signifikant runterreguliert wurden, während die Expression von *il-10*, *mrc1*, *chi3l3* und *arg1* unverändert blieb (Abb. 46).

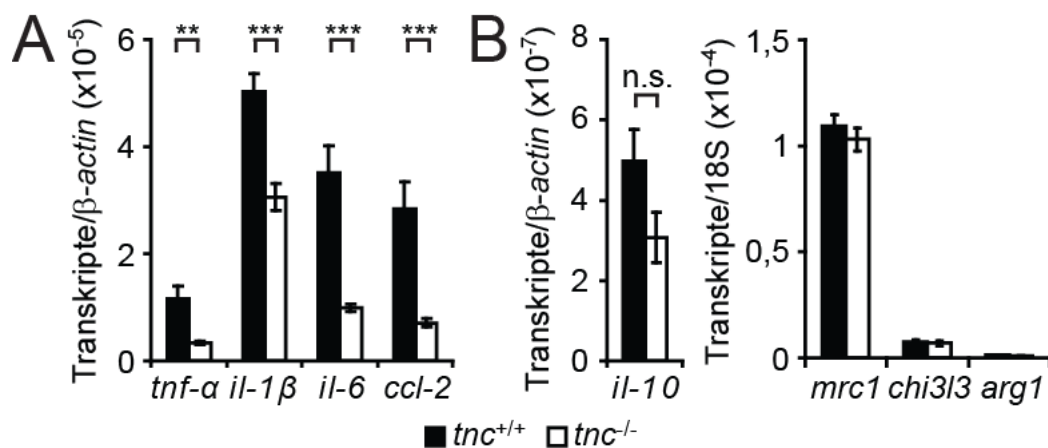


Abbildung 46: Analyse der Inflammation in Wildtyp und *tnc*-defizienten Mäusegehirnen

RNA wurde aus den Gehirnen 4 Monate alter C57BL/6J Wildtyp (*tnc*^{+/+}) und *tnc*-defizienten Mäusen (*tnc*^{-/-}) isoliert. (A) Transkripte der M1-Markergene (*tnf- α* , *il-1 β* , *il-6* und *ccl-2*) und (B) M2-Markergene (*mrc1*, *chi3l3*, *arg1* und *il-10*) wurden mittels Real-Time-quantitative-PCR ermittelt (n = 6 je Gruppe). ** *p* ≤ 0,01, *** *p* ≤ 0,001. n.s. = nicht signifikant.

Im Gegensatz dazu wurde in den Alzheimer-Modellmäusen nach *tnc* ko ein Shift vom M1- zum M2-Profil registriert. Verglichen mit *app tg/tnc*^{+/+} verringerten sich die M1-Transkripte *tnf- α* (*p* = 0,002 für *app tg/tnc*^{+/-} und *p* = 0,001 für *app tg/tnc*^{-/-}), *il-1 β* (*p* = 0,015 für *app tg/tnc*^{+/-} und *p* = 0,017 für *app tg/tnc*^{-/-}) und *il-6* (*p* = 0,023 für *app tg/tnc*^{+/-} und *p* = 0,002 für *app tg/tnc*^{-/-}) in den *app tg/tnc*^{+/-} und *app tg/tnc*^{-/-} Mäusen deutlich (Abb. 47 A). Interessanterweise wurden die *ccl-2*-Transkripte in *app tg/tnc*^{-/-} Tieren (*p* = 0,04) verstärkt gebildet. Der Verschiebung zum M2-Profil wurde dadurch verdeutlicht, dass signifikant erhöhte Mengen an *il-10*- (*p* = 0,01 für *app tg/tnc*^{-/-}) und *mrc1*-Transkripten (*p* = 0,05 für *app tg/tnc*^{+/-} und *p* = 0,008 für *app tg/tnc*^{-/-}) erfasst wurden (Abb. 47 B). Veränderungen der *chi3l3*-Expression verfehlten aufgrund großer Standardabweichung die Signifikanzgrenze (*p* = 0,184 für *app tg/tnc*^{-/-}) und bei der Expression von *arg1* wurden keine Unterschiede festgestellt.

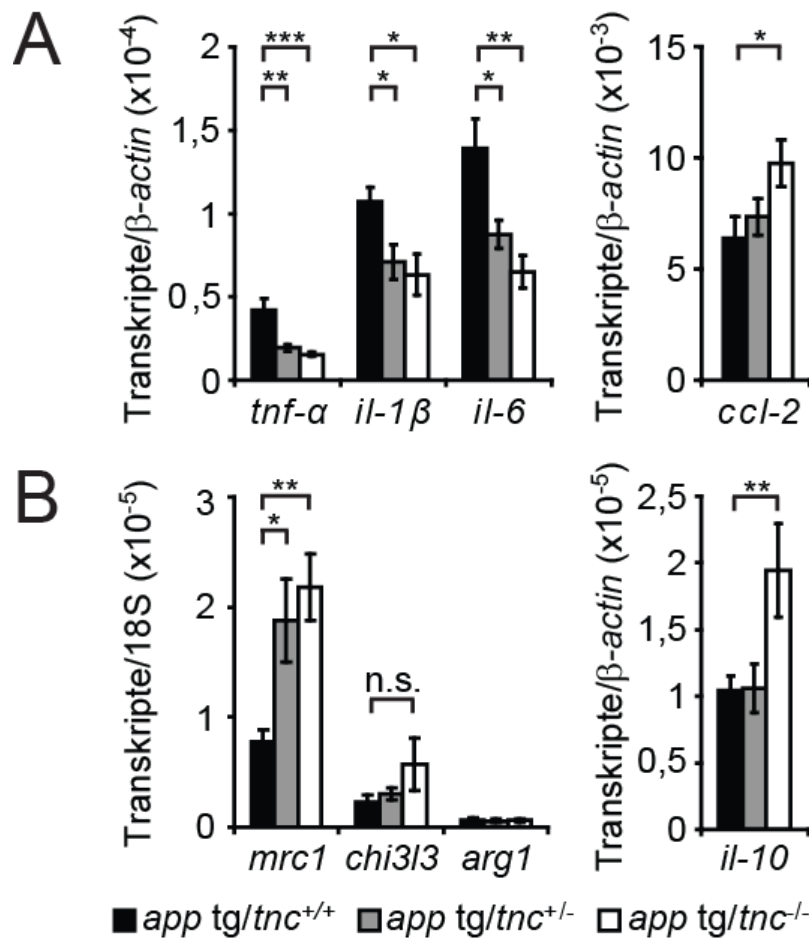


Abbildung 47: *Tnc*-Defizienz verschiebt die Inflammation vom M1- zum M2-Profil in *app tg* Mäusen

RNA wurde aus den Gehirnen 4 Monate alter *app tg/tnc*^{+/+}, *app tg/tnc*^{+/-} sowie *app tg/tnc*^{-/-} Mäusen isoliert. (A) Transkripte der M1-Markergene (*tnf-α*, *il-1β*, *il-6* und *ccl-2*) und (B) M2-Markergene (*mrc1*, *chi3l3*, *arg1* und *il-10*) wurden mit Real-Time-quantitative-PCR detektiert (n ≥ 8 je Gruppe). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. n.s. = nicht signifikant.

3.6 Expression der Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLRs) gehören zu den *pattern recognition receptors* (PRRs) und sind elementare Bestandteile der angeborenen Immunabwehr. Humanes Amyloid β (Aβ) interagiert direkt mit TLR2 und TLR4 (Udan et al., 2008; Liu et al., 2012). Über die Expression von *tlrs* in *tnc* ko Mäusen ist bislang nichts bekannt. Die RNA aus *app tg/tnc*^{+/+} und *app tg/tnc*^{-/-} Mäusen wurde verwendet, um das Expressionsmuster aller bislang bekannten murinen *tlrs*, des Corezeptors *cd14* und des intrazellulären Adapterproteins *myd88* zu analysieren. Die Expressionen der *tlrs*, des *cd14* und des *myd88* wurden im Zuge einer *tnc*-Defizienz nicht beeinflusst, so dass die verminderte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in *tnc*^{-/-} und *app tg/tnc*^{-/-} Mäusen nicht darauf zurückgeführt werden konnte (Abb. 48).

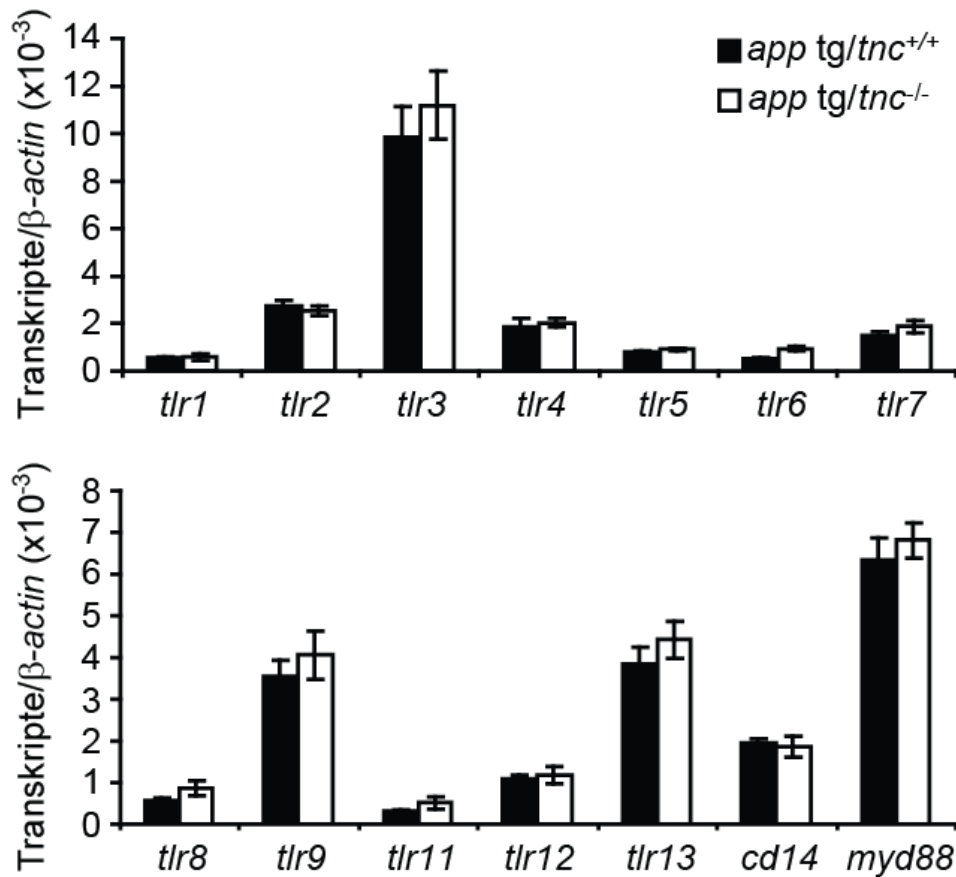


Abbildung 48: Expression der Toll-like Rezeptoren in *app tg/tnc*^{+/+} und *app tg/tnc*^{-/-} Mäusen

RNA wurde aus den Gehirnen 4 Monate alter *app tg/tnc*^{+/+} und *app tg/tnc*^{-/-} Mäusen isoliert. Transkripte muriner Toll-like Rezeptoren (*tlrs*), *cd14* und *myd88* wurden mit Real-Time-quantitative-PCR evaluiert (n = 6 je Gruppe).

3.7 *Tnc*-Defizienz verstärkt mikrogliale Rekrutierung zum Hippocampus

Chemokine (C-C motif) ligand-2 (CCL-2), auch *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) genannt, rekrutiert Makrophagen und Mikroglia zur Standort einer Verletzung oder einer Infektion (Hayashi et al., 1995). Obwohl die Expression anderer M1-Markergene herunterreguliert wurde, wies speziell *ccl-2* eine Erhöhung seiner Transkripte nach *tnc* ko auf. Zur Quantifizierung der Mikroglia im Hippocampus wurden serielle Paraffinschnitte von *app tg/tnc*^{+/+}, *app tg/tnc*^{+/-} und *app tg/tnc*^{-/-} Mäusegehirnen angefertigt, mit anti Iba1 (*ionized calcium binding adapter molecule 1*) Antikörper immunhistochemisch gefärbt und die Anzahl der Mikroglia pro mm² berechnet. Während die Anzahl der Mikroglia in den *app tg/tnc*^{+/+} (97,63 ± 4,39 pro mm²) und *app tg/tnc*^{+/-} (104,79 ± 6,41 pro mm²) Tieren vergleichbar war, erhöhte sie sich in *tnc*-defizienten Tieren (118,95 ± 9,57 pro mm², *p* = 0,048) zwar leicht, jedoch signifikant (Abb. 49). Morphologische Unterschiede traten nicht auf.

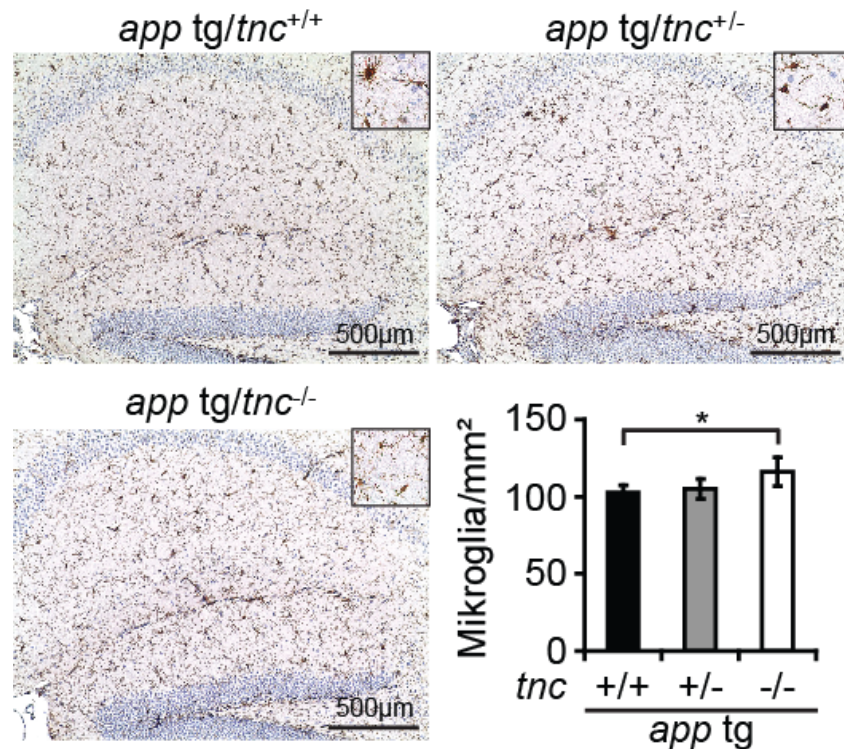


Abbildung 49: *Tnc*-Defizienz verstärkt die Rekrutierung von Mikroglia zum Hippocampus

Mikrogliale Rekrutierung zum Hippocampus wurde mittels Immunhistochemie untersucht. Dazu wurden 4 serielle Paraffinschnitte mit einem jeweiligen Abstand von 60 µm mit anti Iba1 Antikörper gefärbt. Die Anzahl der detektierten Mikroglia wurde ausgezählt und zwischen den *app tg/tnc*^{+/+}, *app tg/tnc*^{+/-} und *app tg/tnc*^{-/-} Mäusen verglichen (n ≥ 8 je Gruppe). Die Morphologie der Mikroglia ist in der oberen rechten Ecke vergrößert dargestellt. * $p \leq 0,05$.

3.8 Reduktion der Aβ-Ablagerungen im Mausgehirn nach *tnc* knock out

Die progressive Zunahme extrazellulärer Aβ-Plaques ist ein wichtiges pathologisches Merkmal der AD. Zur Beurteilung der cerebralen Aβ-Ablagerungen in *tnc*-defizienten Tieren wurden serielle Paraffinschnitte von *app tg/tnc*^{+/+}, *app tg/tnc*^{+/-} und *app tg/tnc*^{-/-} Mäusegehirnen angefertigt, mit einem anti Amyloid β Antikörper (Klon 6F/3D) immunhistochemisch gefärbt und die prozentuale Abdeckung Aβ-positiver Fläche kalkuliert. Dieser Primärantikörper färbte alle Aβ-Peptide, sodass er keine Auskünfte über den jeweiligen Anteil einzelner Aβ-Spezies in den Plaques preisgab. Als Ergänzung wurden Paraffinschnitte mit dem Antikörper OC gefärbt, der spezifisch fibrilläre Strukturen erkennt. Ergebnisse beider Färbungen verdeutlichten, dass der Anteil Aβ-positiver Fläche sowohl im Cortex als auch im Hippocampus der *app tg/tnc*^{+/-} und *app tg/tnc*^{-/-} Mäuse signifikant vermindert wurde (Abb. 50).

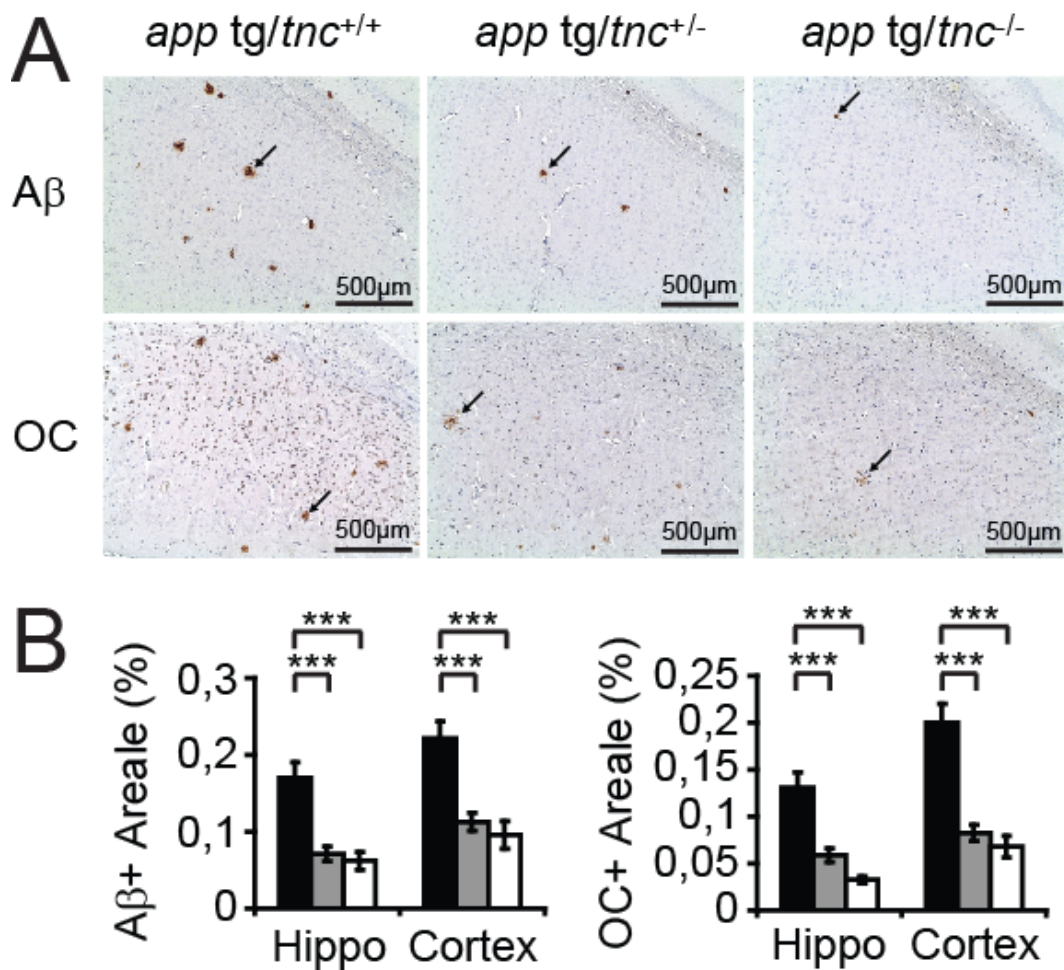


Abbildung 50: Weniger Aβ-Ablagerungen im Hippocampus und Cortex *tnc*-defizienter Mäuse

Zur Evaluation der Aβ-Ablagerungen im Mausgehirn wurden 4 serielle Paraffinschnitte mit einem jeweiligen Abstand von 60 μm mit dem anti Amyloid β (Klon 6F/3D) oder dem anti amyloid Fibrillen (OC) Antikörper immunhistochemisch gefärbt. (A) Repräsentative Färbungen aus der corticalen Region. Charakteristische Plaques sind mit Pfeilen markiert. (B) Der prozentuale Anteil Aβ positiver Flächen im Hippocampus und Cortex wurden mit der Software NIS-Elements BR (Version 3.0) ermittelt und zwischen den *app tg/tnc^{+/+}*, *app tg/tnc^{+/-}* und *app tg/tnc^{-/-}* Mäusen verglichen (n ≥ 8 je Gruppe). *** $p \leq 0,001$.

Kommerzielle ELISA Kits wurden eingesetzt, um die Mengen an Aβ40 und Aβ42 spezifisch zu ermitteln. Dazu wurden die Aβ-Peptide mit TBS (= lösliche Fraktion), TBS+1% Triton X-100 (= membranassoziierte Fraktion) und 5M Guanidinhydrochlorid (= unlösliche Fraktion) Puffern sequentiell aus *app tg/tnc^{+/+}*, *app tg/tnc^{+/-}* und *app tg/tnc^{-/-}* Mäusegehirnen extrahiert. Aus den ELISA Ergebnissen ging hervor, dass sich die Aβ-Mengen hauptsächlich in den 5M Guanidinextrakten konzentrierten. In den Fraktionen TBS und TBS+Triton waren keine Unterschiede zu erkennen. Interessanterweise verringerte sich das Aβ40 der *app tg/tnc^{+/-}* (Δ39,01%, $p = 0,034$) und *app tg/tnc^{-/-}* (Δ44,03%, $p = 0,021$) Tiere in der Guanidinhydrochlorid-Fraktion, das Aβ42 jedoch nur tendentiell (Abb. 51).

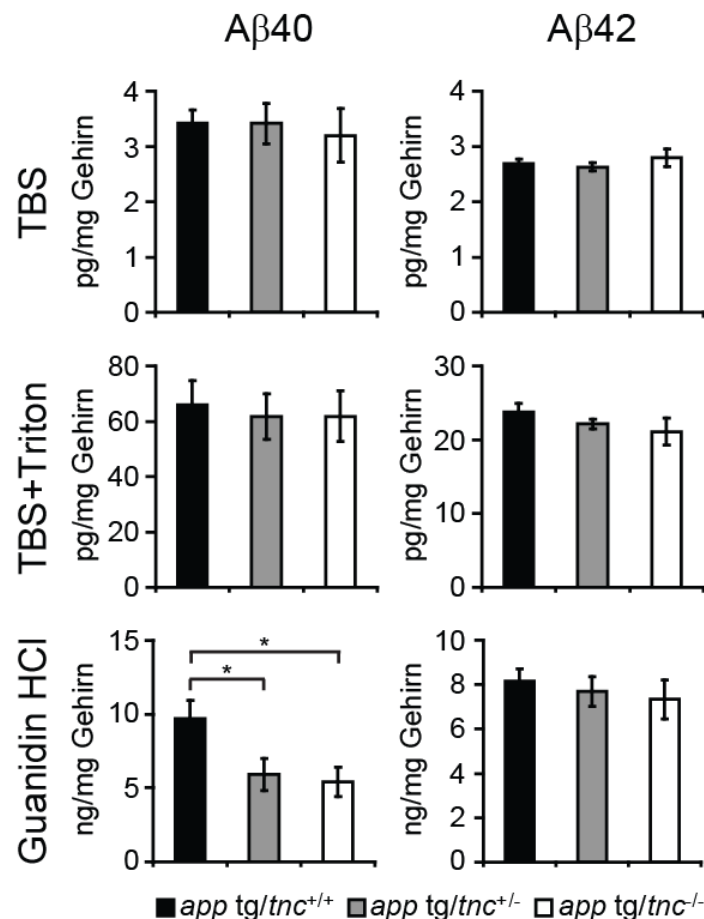


Abbildung 51: Aβ40 ist im Gehirn *tnc*-defizienter Mäusen deutlich reduziert

Amyloid beta Peptide (Aβ) wurden mit TBS, TBS+1% Triton X-100 und 5M Guanidinhydrochlorid sequentiell aus *app tg/tnc^{+/+}*, *app tg/tnc^{+/-}* und *app tg/tnc^{-/-}* Mäusegehirnen extrahiert. Konzentrationen an Aβ40 und Aβ42 aus den drei Fraktionen wurden mit ELISA Kits quantifiziert und anhand der gemessenen Proteinkonzentrationen angeglichen (n ≥ 7 je Gruppe). * $p \leq 0,05$.

3.9 Analyse der β- und γ-Sekretasenkomponenten

Bei der amyloidogenen Prozessierung wird das Amyloid-Vorläuferprotein (APP) von den Enzymen β- und γ-Sekretasen in der Nähe seiner Transmembranregion geschnitten, wodurch Aβ-Peptiden mit einer Länge von 36-43 Aminosäuren entstehen. Dabei bestimmen die Aktivitäten der β- und γ-Sekretasen maßgeblich über die Menge des gebildeten Aβ. Die β-Sekretase, auch *beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1* (BACE) genannt, ist eine Aspartatprotease, welche das APP im C-terminalen Bereich zwischen den Aminosäuren 671 und 672 schneidet. Die γ-Sekretase ist ein Komplex bestehend aus 6 möglichen Komponenten: *presenilin 1* (PS1) oder *presenilin 2* (PS2), *presenilin enhancer 2* (PEN2), *nicastrin* (NCT), *anterior pharynx defective 1-α* (APH1-α) und *anterior pharynx defective 1-β* (APH1-β). Die enzymatische Aktivität der γ-Sekretase wird durch PS1 oder PS2 vermittelt.

Zur Untersuchung der β - und γ -Sekretasenkomponenten wurden die Proteinmengen von BACE, PS1 und NCT im *western blot* immundetektiert und ergänzend dazu die Transkripte aller γ -Sekretasekomponenten mit Real-Time-quantitative-PCR quantifiziert.

Jedoch musste zunächst überprüft werden, ob im Folge einer *tnc*-Defizienz zu Abweichungen des APP-Proteingehaltes kam. Die densitometrische Quantifizierung ergab, dass die APP-Proteinmengen in den *app tg* Mäusen unabhängig vom *tnc* Genotyp vergleichbar waren (Abb. 52 A). Dagegen wurden signifikante Verminderungen von BACE ($p = 0,001$ für *app tg/tnc^{+/-}* und $p < 0,001$ für *app tg/tnc^{-/-}*) und der γ -Sekretasekomponenten PS1 ($p = 0,021$ für *app tg/tnc^{-/-}*) und NCT ($p = 0,042$ für *app tg/tnc^{+/-}* und $p = 0,033$ für *app tg/tnc^{-/-}*) in den *tnc*-defizienten *app tg* Tieren festgestellt (Abb. 52 B-D).

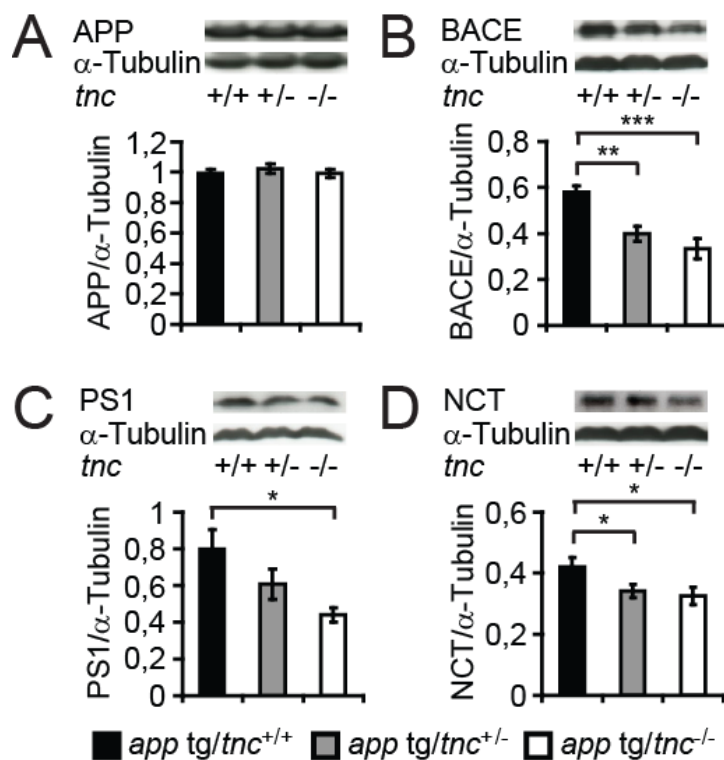


Abbildung 52: Analyse der β - und γ -Sekretasenkomponenten in *app tg/tnc^{+/+}*, *tnc^{+/-}* und *tnc^{-/-}* Mäusen

Die Proteinmengen von Amyloid-Vorläuferprotein (APP) β -Sekretase (BACE), Presenilin 1 (PS1) und Nicastrin (NCT) in *app tg/tnc^{+/+}*, *app tg/tnc^{+/-}* und *app tg/tnc^{-/-}* Mäusen wurden via *western blot* analysiert. (A) *Tnc*-Defizienz beeinflusst das APP nicht. (B, C und D) *Tnc*-Defizienz reduziert die Proteinmengen der β -Sekretase sowie Komponenten der γ -Sekretase. ($n \geq 7$ je Gruppe). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Diese Ergebnisse wurden in *tnc*-defizienten Mäusen bestätigt (Abb. 53). Auch in jenen Proben lagen signifikante Reduktionen der Proteine BACE, PS1 und NCT vor. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verringerte sich BACE um einen Drittel ($\Delta 33,70\%$, $p = 0,005$), PS1 um zwei Drittel ($\Delta 66,36\%$, $p < 0,001$) und NCT um 38,13% ($p = 0,008$). Im Einklang mit den

western blot Resultaten zeigten die Ergebnisse aus der Real-Time-quantitative-PCR, dass die Expression sämtlicher γ -Sekretasekomponenten in $tnc^{-/-}$ Mäusen abgeschwächt waren ($ps1$ $p = 0,003$; $ps2$ $p = 0,004$; $pen2$ $p = 0,019$; nct $p = 0,003$; $aph1-\alpha$ $p = 0,001$; $aph1-\beta$ $p < 0,001$).

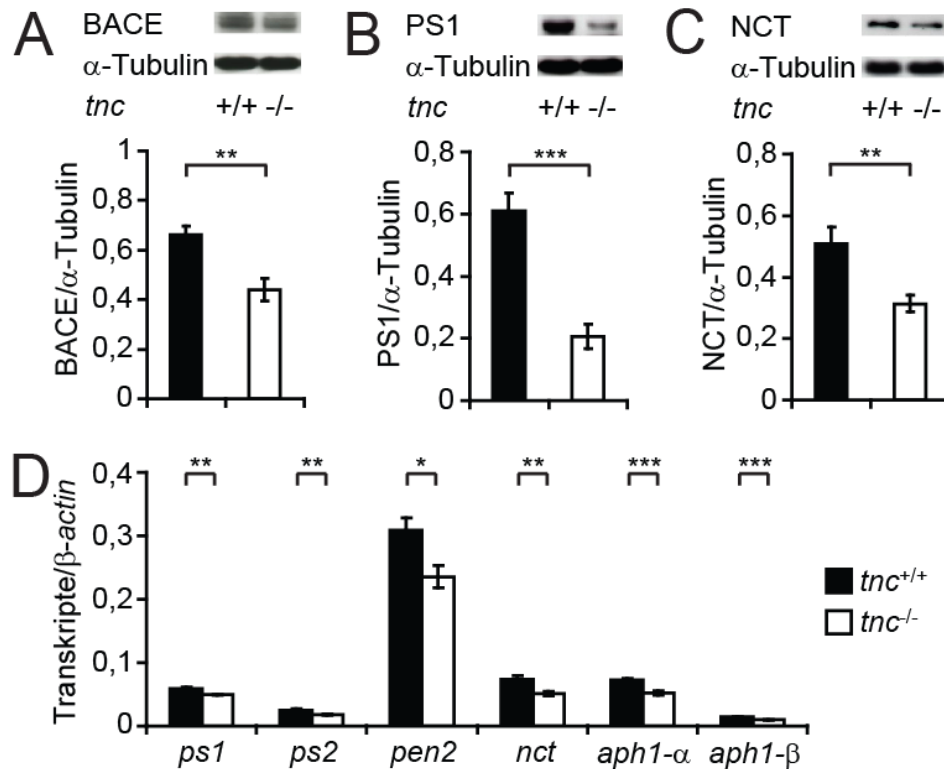


Abbildung 53: Vergleich der β - und γ -Sekretasekomponenten in $tnc^{+/+}$ und $tnc^{-/-}$ Mäusen

(A, B und C) Die Proteinmengen von β -Sekretase (BACE), Presenilin 1 (PS1) und Nicastrin (NCT) in $tnc^{+/+}$ und $tnc^{-/-}$ Mäusen wurden via western blot analysiert (n = 6 je Gruppe). (D) mRNA-Quantifizierung der γ -Sekretasekomponenten *presenilin 1* (*ps1*), *presenilin 2* (*ps2*), *presenilin enhancer 2* (*pen2*), *nicastrin* (*nct*), *anterior pharynx defective 1- α* (*aph1- α*) und *anterior pharynx defective 1- β* (*aph1- β*) (n = 6 je Gruppe). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3.10 *Tnc*-Defizienz führt zur Hemmung der β - und γ -Sekretasen

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die reduzierte Proteinmenge der β - und γ -Sekretasekomponenten sich auf die Aktivität des jeweiligen Enzyms auswirkt. Dazu wurden Kinetiken der β - und γ -Sekretasen mit fluoreszenten Reporterassays in Abhängigkeit der Zeit untersucht. Getestet wurden Membranpräparationen, die aus dem Großhirn der $tnc^{+/+}$ und $tnc^{-/-}$ Mäusen hergestellt wurden. Die Aktivität des jeweiligen Enzyms in den $tnc^{+/+}$ Mäusen wurde als 100% definiert. *Tnc* ko führte zur signifikanten Hemmung beider Sekretasen (Abb. 54). Beim β -Sekretase Assay war der Unterschied zwischen $tnc^{+/+}$ und $tnc^{-/-}$ Mäusen in der Anfangsphase am größten (nach 1 h $\Delta 19,82\%$, $p < 0,001$), wobei sich die Aktivitäten im Laufe

des 6-stündigen Experiments immer weiter annäherten (nach 6 h $\Delta 13,70\%$, $p < 0,001$). Dagegen war der Unterschied zwischen $tnc^{+/+}$ und $tnc^{-/-}$ Mäusen beim γ -Sekretase Assay in der Anfangsphase am geringsten (nach 1 h $\Delta 19,80\%$, $p < 0,001$) und vergrößerte sich mit zunehmender Dauer (nach 6 h $\Delta 25,88\%$, $p < 0,001$).

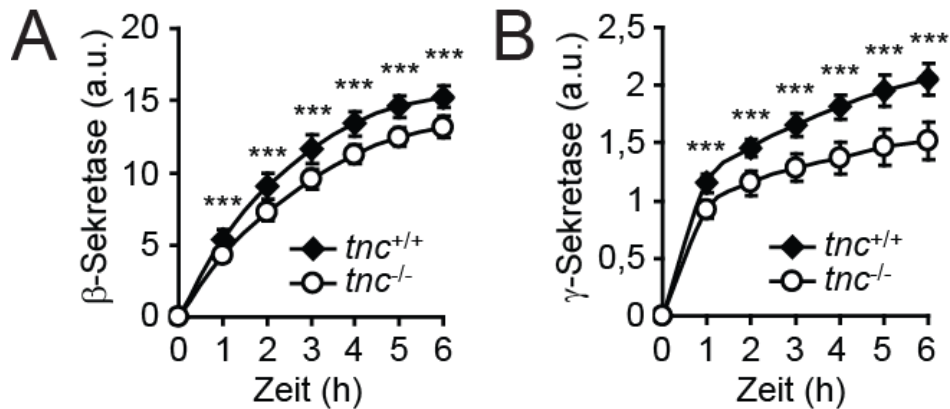


Abbildung 54: Aktivität von β - und γ -Sekretasen ist in tnc -defizienten Mäusen gehemmt

Die Membranfraktion wurde aus den Gehirnen 4 Monate alter C57BL/6J Wildtyp ($tnc^{+/+}$) und tnc knock out ($tnc^{-/-}$) Mäuse präpariert. Anhand Fluoreszenz basierter Assays wurden die Aktivitäten von (A) β - und (B) γ -Sekretasen in Abhängigkeit der Zeit quantitativ gemessen ($n = 6$ je Gruppe). Die Daten werden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen gezeigt. a.u. = *arbitrary unit*, willkürliche Einheit. *** $p \leq 0,001$.

3.11 TNC hat keinen Einfluss auf A β -Phagozytose, -Abbau oder -Transport

Infolge einer tnc -Defizienz kommt es zu deutlichen Verminderungen der β - und γ -Sekretasenaktivitäten, die durch reduzierte Expression des BACE-Proteins sowie der γ -Sekretasekomponenten hervorgerufen wurden. Allerdings ist die Aktivität dieser beiden Sekretasen nicht der einzige Mechanismus, wodurch die Menge der cerebralen A β -Ablagerung moduliert wird. Vielmehr wird die A β -Homöostase durch weitere Faktoren wie Phagozytose, Degradation oder Transport mitreguliert. Aus diesem Grund wurden die Transkripte der Gene *cd36*, *insulin-degrading enzyme (ide)*, *low density lipoprotein-receptor related protein 1 (lrp1)*, *macrophage scavenger receptor 1 (msr1)*, *neprilysin (nep)* und *receptor for advanced glycation endproducts (rage)* mittels Real-Time-quantitative-PCR in *app tg/tnc^{+/+}*, *app tg/tnc^{+/-}* und *app tg/tnc^{-/-}* Mäusegehirnen detektiert. Die Rezeptoren CD36 und MSR1 stehen mit der A β -Phagozytose in enger Verbindung (El Kouhry et al., 1996; El Kouhry et al., 2003). IDE und NEP sind prominente Vertreter der A β -abbauende Enzyme (Miners et al., 2008). Die beiden Rezeptoren RAGE und LRP1 agieren als Shuttleproteine, die das A β durch die Blut-Hirn-Schranke transportieren (Shibata et al., 2000; Deane et al., 2003).

Aus den Ergebnissen der Real-Time-quantitative-PCR ging hervor, dass weder die Expression der A β -abbauenden Enzyme noch die der Shuttleproteine noch die der A β -Phagozytose-verbundenen Rezeptoren durch eine *tnc*-Defizienz beeinflusst wurde (Abb. 55 A-C). Zusätzlich wurden Konzentrationen von A β 40 und A β 42 im Blutplasma via ELISA quantifiziert. *Tnc* ko führt tendenziell zu einer leichten Erhöhung von A β 40 und A β 42 in der Blutbahn, ohne statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 55 D).

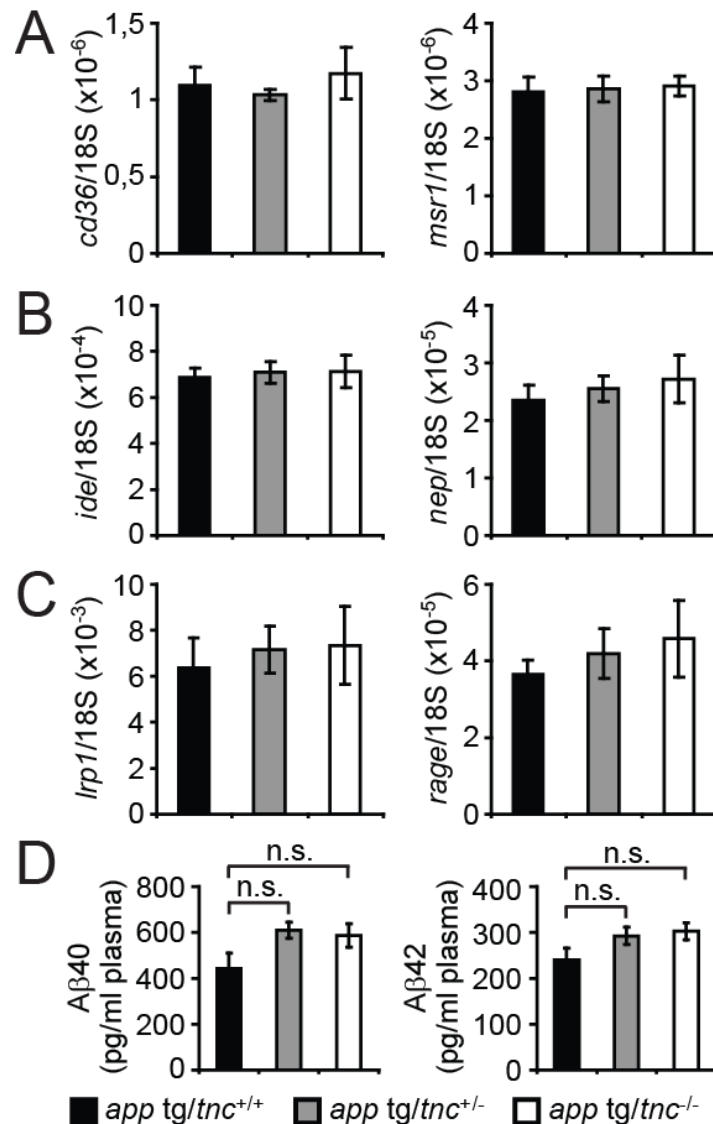


Abbildung 55: TNC beeinflusst weder die A β -Phagozytose noch die -Degradation noch den -Transport

RNA wurde aus den Gehirnen 4 Monate alter *app tg/tnc^{+/+}*, *app tg/tnc^{+/-}* sowie *app tg/tnc^{-/-}* Mäusen isoliert. Transkripte von *cd36*, *insulin-degrading enzyme (ide)*, *low density lipoprotein-receptor related protein 1 (lrp1)*, *macrophage scavenger receptor 1 (msr1)*, *nepriylisin (nep)* und *receptor for advanced glycation endproducts (rage)* wurden mittels Real-Time-quantitative-PCR gemessen. (A) Expression der Rezeptoren CD36 und MSR1, die die phagozytische Aktivität mitregulieren, wurde durch die *tnc*-Defizienz nicht beeinflusst. (B) Expression der A β -abbauende Enzyme, IDE und NEP, lag unverändert vor. (C) und (D) Weder die Expression der Shuttleprotein des A β , LRP1 und RAGE, noch die Konzentration von A β 40 und A β 42 im Blutplasma wurden signifikant beeinträchtigt. n.s. = nicht signifikant.

3.12 *Tnc* knock out verringert den Verlust synaptischer Markerproteine im Alzheimer-Mausmodell

Sowohl bei Alzheimer-Patienten als auch in Alzheimer-Mausmodellen stehen kognitive Defizite in unmittelbarem Zusammenhang mit Veränderungen der synaptischen Aktivität und dem Verlust an Synapsen (DeKorsky und Scheff, 1990; Games et al., 1995). Zur Evaluation der synaptischen Integrität wurden die Proteinmengen von *postsynaptic density protein 95* (PSD95, auch bekannt als *synapse-associated protein 90*, SAP-90) und *synaptophysin* (SYN, auch bekannt als *major synaptic vesicle protein p38*) in Maushirnhomogenaten mittels *western blot* verglichen. Zwischen *tnc*^{+/+} und *tnc*^{-/-} Mäusen wurden keine Veränderungen festgestellt (Abb. 56 A und B links). Verglichen mit Wildtyp-Mäusen wurden deutliche Reduktionen der beiden synaptischen Markerproteine im Alzheimer-Mausmodell beobachtet. In *app695* transgenen Tieren war eine dosisabhängige Verbindung zwischen dem PSD95-Proteingehalt und der *tnc*-Defizienz zu verzeichnen. Gegenüber *app tg/tnc*^{+/+} erhöhte sich PSD95 in den *app tg/tnc*^{+/-} und *app tg/tnc*^{-/-} Mäusen um 23,59% ($p = 0,027$) bzw. 43,13% ($p = 0,001$) (Abb. 56 A rechts). Die Menge an SYN stieg in *app tg/tnc*^{-/-} leicht, jedoch nicht signifikant an ($\Delta 12,18\%$, $p = 0,07$) (Abb. 56 B rechts).

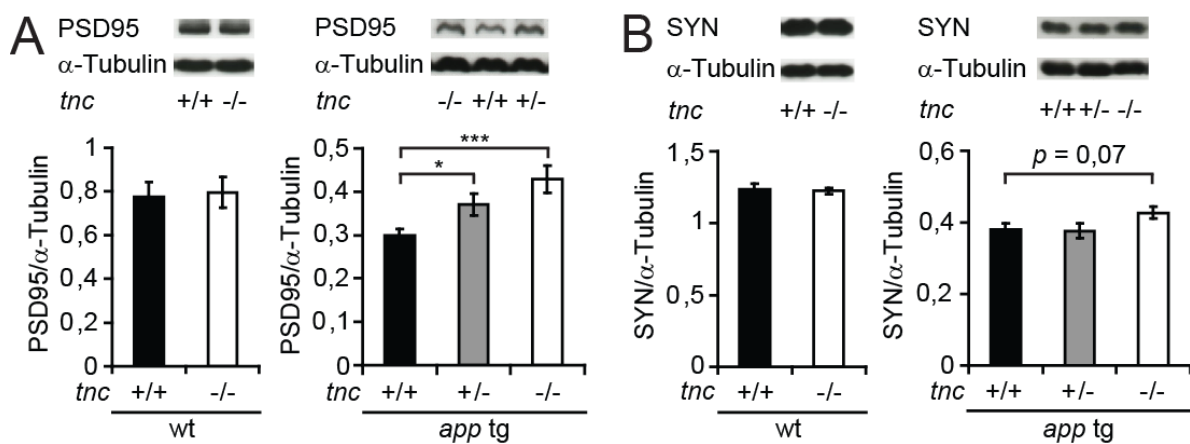


Abbildung 56: *Tnc*-Defizienz verlangsamt den Verlust synaptischer Proteine im Alzheimer-Mausmodell

(A und B) Die Mengen der synaptischen Markerproteine *postsynaptic density protein 95* (PSD95) und *synaptophysin* (SYN) wurden in Hirnhomogenaten mittels *western blot* bestimmt. Zwischen *tnc*^{+/+} und *tnc*^{-/-} Tieren wurden keine Unterschiede festgestellt ($n = 6$ je Gruppe). Im Alzheimer-Mausmodell war PSD95 in *app tg/tnc*^{+/-} und *app tg/tnc*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu *app tg/tnc*^{+/+} signifikant erhöht ($n \geq 8$ je Gruppe). * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle des TNC in der Neuroinflammation

Die chronische Entzündung gehört neben extrazelluläre Amyloid-Ablagerungen und intrazelluläre Akkumulationen von hyperphosphoryliertem Tau zu den wesentlichen pathologischen Merkmalen der Alzheimer-Krankheit (*Alzheimer's Disease*, AD). Die Aktivierung der Mikroglia im Gehirn, auch Neuroinflammation genannt, kann sowohl pro- als auch antiinflammatorisch erfolgen, sodass diese Immunzellen sich zu zwei völlig unterschiedlichen Phänotypen polarisieren (Colton et al., 2006). Der klassische Phänotyp M1 zeichnet sich durch Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 oder CCL-2 aus, während Mikroglia des alternativen Phänotyps M2 verstärkt Gentranskripte von *il-10*, *arginase 1 (arg1)*, *chitinase 3 like 3 (chi3l3)*, *C-type mannose receptor 1 (mrc1)* bilden.

Das Amyloid β -Peptid (A β) wird derzeit als das Schlüsselmolekül in der Pathogenese der AD erachtet, unter anderem bedingt durch seine Rolle als Auslöser der chronischen Neuroinflammation (Meda et al., 1995; Akiyama et al., 2000). In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von Rezeptoren der angeborenen Immunität (CD14, TLR2 und TLR4) und deren *downstream* Adapterproteine (MyD88 und IRAK4) identifiziert, die die A β -induzierte Aktivierung der Mikroglia vermitteln (Fassbender et al., 2004; Walter et al., 2007; Jana et al., 2008; Hao et al., 2011; Liu et al., 2012). In der Tat konnte gezeigt werden, dass Alzheimer-Modellmäuse im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern vermehrt Mikroglia in den Hippocampus rekrutieren und gleichzeitig erhöhte Konzentrationen an TNF- α aufweisen (Liu et al., 2012).

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass das verwendete Alzheimer-Mausmodell, TgCRND8, im Vergleich zu Wildtyp mehr pro- und antiinflammatorische Transkripte generierte. Interessanterweise wurde die Hochregulation der inflammatorischen Aktivität durch verstärkte Expression des *tnc* begleitet. Hingegen blieben die mRNA-Mengen von *tnr* und *tnn* unverändert oder wurde wie im Fall von *tnx* signifikant reduziert, sodass die Induktion der *tnc*-Expression für *app* tg Mäuse spezifisch erschien. Zusätzlich konnte in *in vitro* Experimenten demonstriert werden, dass die transkriptionale Aktivität des *tnc* in primären Mikroglia nach A β -Stimulation in einer zeitabhängigen Art und Weise hochreguliert wurde, während die Transkription der anderen Tenascin-Genen gleichblieben. Diese Beobachtung kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass das A β die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine und Chemokine einleitet, welche wiederum die Bildung des TNC

nach sich ziehen. Das TNC bindet seinerseits an TLR4 und potenziert die Generation von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, sodass ein positiver *feedback* Mechanismus entstehen könnte. Als Referenz dienten *app695* transfizierte SH-SY5Y Zellen, in denen das überexprimierte APP695 und dessen Metabolite keine vergleichbaren Effekte hervorriefen. Zur Überprüfung *in vivo*, ob Mikroglia als einzige zelluläre Quelle für die Hochregulation des *tnc* im Alzheimer-Mausmodell verantwortlich sind, bietet sich beispielsweise das Cre-loxP-System an. Wenn die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CD11b-Promotors exprimiert wird, so werden lediglich die loxP-flankierten *tnc*-Allele in myeloiden Zellen entfernt, während alle andere Zelltypen weiterhin *tnc* transkribieren. Neuartige Cre-loxP-Systeme, in denen die Cre-Rekombinase synthetisches Tamoxifen anstatt natürliches Östrogen bindet, gewährt eine freie Wahl des Induktionszeitpunktes. Des Weiteren gibt es Möglichkeiten, die auf komplette Eliminierung der Mikroglia basieren. Zu einem existiert das Mausmodell CD11b-HSVTK, welches von der Arbeitsgruppe um Prof. Matthias Jucker (Universität Tübingen, Deutschland) erstmalig vorgestellt wurde (Gratewohl et al., 2009). Diese Mäuse exprimieren die Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus unter der Kontrolle des CD11b-Promotors, die das verabreichte Ganciclovir metabolisiert und letztlich das selektive Entfernen proliferierender myeloider Zellen ermöglicht. Eine Alternative stellt das kommerziell erhältliche CD11b-DTR Mausmodell dar. Diese Tiere exprimieren den Diphtherietoxin-Rezeptor unter der Kontrolle des CD11b-Promotors, sodass myeloide Zellen durch Gabe des Diphtherietoxins spezifisch ausgeschaltet werden. Kreuzungen von Alzheimer-Mausmodellen mit diesen beiden Varianten hätten ebenfalls den Vorteil, dass die Tiere sich normal entwickeln und der Zeitpunkt der Mikroglia-Eliminierung frei wählbar ist.

In der vorliegenden Studie wurde eine weitere wichtige Beobachtung bei der Analyse des inflammatorischen Profils gemacht. In *app wt/tnc*-defizienten Mäusen wurde die Transkription von pro- und antiinflammatorischen Genen gleichermaßen reduziert. Bei *app tg/tnc*-defizienten Mäusen hingegen wurde die Expression proinflammatorischer Gene inhibiert, die der antiinflammatorischen Gene jedoch signifikant erhöht. Diese Resultate führen zu der Vermutung, dass sich die Rolle des TNC im Gehirn von *app tg* Mäusen, in dem eine wesentlich stärkere Inflammation als in Wildtyp-Mäusen vorherrscht, wandelt. Ähnliche Ergebnisse erzielten weitere Studien *tnc*-defizienter Mäuse in den Modellen der rheumatoiden Arthritis oder der Lipopolysacchariden (LPS)-induzierten Sepsis, in denen das Einleiten einer Immunantwort aktiv herbeigeführt wurde (Kanayama et al., 2009; Midwood et al., 2009; Piccinini et al., 2012). Folglich gewährleistet TNC eine basale Transkription pro- und antiinflammatorischen Gene. Sobald eine permanente stärkere Immunantwort eingeleitet wird,

agiert TNC als Modulator der Entzündungsreaktion, indem es die Bildung proinflammatorischer Mediatoren begünstigt und die Generation der antiinflammatorischen Mediatoren unterdrückt. Eine Expressionsanalyse aller bislang bekannten TLRs und deren Adapterproteine offenbarte keine Unterschiede auf der transkriptionellen Ebene. Somit bleibt der zugrundeliegende Mechanismus ungeklärt, obwohl neulich berichtet wurde, dass TNC microRNA-155 induziert, welche die Freisetzung der inflammatorischen Zytokine auf posttranskriptionaler Ebene mitreguliert (Piccinini et al., 2012).

Zusammenfassend zur Rolle des TNC in der Neuroinflammation der AD-Pathogenese ließen sich drei Punkte festhalten: (1) die Transkription des *tnc* ist im Gehirn der Alzheimer-Modellmäuse signifikant erhöht, (2) die Expression des *tnc* in primären Mikroglia wird durch A β induziert und (3) *tnc*-Defizienz verschiebt das inflammatorische Profil im Gehirn der Alzheimer-Modellmäuse vom M1 zu M2. Vor allem die dritte Feststellung ist von großer Bedeutung, da eine Verminderung der proinflammatorischen Aktivität im Gehirn mehrfach mit Verbesserung der AD-Pathologie in Verbindung gebracht wurde (Hao et al., 2011; Liu et al., 2012).

4.2 Auswirkung der *tnc*-Defizienz auf A β -Ablagerungen im Gehirn

Die Präsenz extrazellulärer seniler Plaques in Hirnregionen wie Cortex oder Hippocampus, die die Lernfähigkeit und das Erinnerungsvermögen betreffen, ist ein charakteristisches Merkmal der AD-Histopathologie (Mattson, 2004; Blennow et al., 2006). Obwohl die „*amyloid cascade*“ in den vergangenen Jahrzehnten zur beliebtesten Hypothese zur Entstehung der AD geworden ist, bleibt der präzise Zusammenhang zwischen A β -Ablagerungen und AD-Pathogenese unentschlüsselt (Lansbury und Lashuel, 2006). Das A β ist ein natürliches zelluläres Metabolit, welches infolge enzymatischer Prozessierungen des ubiquitär exprimierten APP entsteht (Haass et al., 1992). Die Länge der A β -Peptide reicht von 36-43 Aminosäuren, wobei A β 40 und A β 42 weitaus häufiger vorkommen, sodass ihnen Schlüsselrollen in der AD-Pathogenese zugeordnet werden (Masters et al., 1985; Querfurth und LaFerla, 2010).

In dieser Arbeit wurde die Gesamtheit der A β -Plaques sowie Akkumulationen der fibrillären A β -Aggregate im Cortex und Hippocampus des Mausgehirns mittels Immunhistochemie untersucht. Die Quantifizierung der immunreaktiven Regionen ergab, dass A β -Ablagerungen beider Formen in *tnc*-defizienten Mäuse mehr als halbiert wurde. Ferner wurden die Konzentrationen an A β 40 und A β 42 mit kommerziellen ELISA Kits ermittelt, weil die

immunhistochemische Untersuchungen keine Auskünfte über die Menge einzelner A β -Spezies gaben. Bei den *tnc*-defizienten Mäusen war die Konzentration des A β 40 in der Guanidin-HCl-Fraktion, in welcher sich hochmolekulare A β -Aggregate anreichern, signifikant verringert. Auch die Menge des A β 42 in der Guanidin-HCl-Fraktion wurde tendenziell reduziert, verfehlte jedoch die statistische Signifikanz. Veränderungen von A β 40 und A β 42 in TBS bzw. TBS+Triton X-100, die die Fraktionen der Monomeren bzw. Oligomeren repräsentierten, wurden nicht bemerkt.

Nachdem feststand, dass *tnc*-Defizienz die Bildung der A β -Plaques hemmt und die Menge des A β , speziell des A β 40, vermindert, begann die Suche nach dem molekularen Mechanismus. Schließlich wird die A β -Homöostase durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst: Produktion, Transport, Phagozytose und Degradation.

Das APP ist ein integrales Transmembranprotein, dessen Isoformen von 695-770 Aminosäuren reichen, wobei APP695 als Hauptisoform des Gehirns hauptsächlich von Neuronen produziert wird (Kang et al., 1987; Mattson, 2004). Bei der amyloidogenen Prozessierung wird das APP sequenziell durch β - und γ -Sekretasen geschnitten, sodass das A β neben andere Teilfragmente entsteht (Querfurth und LaFerla, 2010). Folglich wurde die Aktivität der β - und γ -Sekretasen untersucht. In Gehirn *tnc*-defizienter Tiere war die Aktivität beider Sekretasen signifikant erniedrigt. Die mögliche Erklärung dazu lieferten eingehende Analysen via Real-time-quantitative-PCR und *western blot*, in denen die reduzierte Expression der β - und γ -Sekretasenkomponenten in Abhängigkeit der *tnc*-Defizienz sowohl auf posttranskriptioneller als auch auf posttranslationaler Ebene manifestiert wurde. Die Vorstellung, dass die Deletion des TNC und der damit verbundenen Modulation der Neuroinflammation eine Abschwächung der A β -Produktion hervorruft, wird durch Ergebnissen aus anderen Studien gestützt. Denn das Entfernen des TNF- α Rezeptor Typ 1 hemmte die Aktivität der β -Sekretase, wodurch weniger A β generiert wurde (He et al., 2007). Der entgegen gesetzte Effekt trat ein, wenn durch Injektionen von LPS eine Aktivierung der Neuroinflammation herbeigeführt wurde (Sheng et al., 2003).

Aktivierte Mikroglia und aus der Blutbahn infiltrierende Makrophagen sind die Hauptakteure, die im Gehirn A β -Aggregate phagozytieren und abbauen, auch wenn die phagozytische Aktivität der Astrozyten neuerdings bestätigt wurde (Liu et al., 2005; Simard et al., 2006; Querfurth und LaFerla, 2010). Anhand immunhistochemischer Färbungen wurde verdeutlicht, dass die *tnc*-Defizienz zur Erhöhung der Mikroglia-Anzahl im Maushirn führte. In nachfolgenden Experimenten wurde die Expression von *macrophage scavenger receptor 1*

(*msr1*), *cd36*, *insulin-degrading enzyme (ide)*, *nepriylisin (nep)*, *low density lipoprotein-receptor related protein 1 (lrp1)* und *receptor for advanced glycation endproducts (rage)* ermittelt, um nachzuprüfen, inwiefern die verstärkte Präsenz der Mikroglia nach *tnc knock out* mit einer Hochregulation der A β -Clearance assoziiert ist. MSR1 und CD36 sind bekannte *scavenger* Rezeptoren, die wichtige Rollen in der A β -Phagozytose ausüben (El Khoury et al., 1996; El Khoury et al., 2003). Von allen A β -abbauenden Enzymen stellen IDE und NEP die prominentesten Vertreter dar (Leissring et al., 2003; Miners et al., 2008). LRP1 und RAGE sind Shuttle-Proteine, die das A β über die Blut-Hirn-Schranke transportieren (Shibata et al., 2000; Deane et al., 2003). Zur Evaluation des A β -Transports wurden darüber hinaus die A β 40- und A β 42-Konzentrationen im Blutplasma quantitativ bestimmt. Die Resultate aus diesen Versuchen suggerierten, dass TNC keinen Einfluss auf die Phagozytose, Degradation oder Transport des A β nahm.

Zwei Fragen bleiben vorerst unbeantwortet: (1) Weshalb wird die Produktion des A β 40 durch die *tnc*-Defizienz wesentlich stärker inhibiert als die Generation des A β 42? und (2) Wird die A β -Aggregation durch TNC beeinflusst? Es ist zweifelhaft, ob kommerziell erhältliches rekombinantes TNC, das zumeist in Bakterien hergestellt wird, sich zur Beantwortung der zweiten Frage eignet, da TNC viele verschiedene Isoformen besitzt und im physiologischen Kontext stark glykosyliert wird (Hsia und Schwarzbauer, 2005).

4.3 *Tnc knock out* und Neuroprotektion

Neuronen können direkt und indirekt durch A β -Aggregate geschädigt werden. Im sogenannten „nukleationsabhängigen Modell“ aggregieren A β 40- und A β 42-Monomere über Intermediaten wie Oligomere oder Protofibrillen letztlich zu unlöslichen amyloiden Fibrillen (Harper et al., 1999), die die Hauptbestandteile der charakteristischen Plaques darstellen (Iwatsubo et al., 1994; McLaurin et al., 2002). Obwohl A β -Monomere als ungiftig gelten (Dahlgren et al., 2002), wurde die Toxizität von niedrigmolekularen Oligomeren wie Dimeren (Roher et al. 1996; Klyubin et al. 2008; Hung et al. 2008; Shankar et al. 2008) oder Trimeren (Townsend et al. 2006), Dodecameren (Lesne et al. 2006), Protofibrillen (Hartley et al. 1999) sowie reifer Fibrillen (Lorenzo und Yankner 1994; Gerula et al. 1998) wiederholt nachgewiesen. Physiologisch äußert sich die A β -Toxizität neben der Neurodegeneration auch in Form von Veränderung der synaptischen Plastizität, Inhibition der *long-term potentiation* (LTP) sowie Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen (Hsia et al., 1999; Walsh et al., 2002; Klyubin et al., 2005; Cleary et al., 2005; Lesne et al., 2006; Townsend et al., 2006).

Welche Aggregationsform die stärkste Toxizität auf Neuronen ausübt, bedarf weiterer Aufklärung und ist ein bedeutendes Teilgebiet der derzeitigen Forschung.

A β -Aggregate schädigen Neuronen indirekt, indem sie die Mikroglia zur Freisetzung neurotoxischer Mediatoren wie Zytokine (z. B. TNF- α , IL-1 β , IL-6), Chemokine (z. B. CCL-2) sowie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies stimulieren (Akiyama et al., 2000; Lue et al., 2001; Wyss-Coray, 2006). Histologische Untersuchungen belegten, dass senile Plaques von aktivierten Mikroglia umgeben sind (Rogers et al., 1988; Liu et al., 2005; Hao et al., 2011). Außerdem wurde mit dem Verfahren der Positronemissionstomographie (PET), die auf dem Pittsburgh compound B basiert, nachgewiesen, dass die Aktivierung der Mikroglia mit dem Verlauf der AD-Pathogenese korreliert (Edison et al., 2008; Okello et al., 2009). In der Tat senkten Behandlungen mit antiinflammatorischen Medikamenten, speziell nicht-steroidalen antiinflammatorischen Medikamenten (NSAIDs), das Risiko an AD zu erkranken (in't Veld et al., 2001). Somit gilt die Unterdrückung der Neuroinflammation im Gehirn als eine wirkungsvolle therapeutische Maßnahme zur Behandlung von AD-Patienten und ist wegweisend für viele Studien zur Entwicklung neuer Therapieansätze.

In dieser Arbeit wurden *postsynaptic density protein 95* (PSD95) und *synaptophysin* (SYN) zur Evaluation der synaptischen Integrität via *western blot* herangezogen, da in vorangegangenen Studien eine positive Korrelation zwischen der Menge an synaptischen Markerproteinen und kognitiven Funktionen demonstriert wurde (Masliah et al., 2001; Liu et al., 2012). In Wildtyp-Mäusen führte die *tnc*-Defizienz zu keiner Veränderung der beiden getesteten Markerproteine. Daraus folgt, dass der *knock out* des *tnc* in einem nicht pathologischen System weder eine Vermehrung noch eine Reduktion der synaptischen Proteine bewirkt. In Alzheimer-Modellmäusen jedoch wurden mehr PSD95 und SYN in *tnc*-defizienten Tieren detektiert. Der verlangsamte Verlust synaptischer Proteine in AD weist auf einen positiveren Krankheitsverlauf hin und deutet eine protektive Funktion der *tnc*-Defizienz an. In welchem Maß die verringerte A β -Produktion und die verminderte Neuroinflammation jeweils dazu beiträgt, muss in weiteren Experimenten ermittelt werden.

Zusammenfassend ist die Expression des TNC während der Embryogenese notwendig für die normale Entwicklung des zentralen und des peripheren Nervensystems (Fukamauchi et al., 1996; Cifuentes-Ciaz et al., 1998; Weber et al., 1999; Evers et al., 2002). Aber in *app* tg Mäusen ist die Expression des TNC signifikant verstärkt. Eine Deletion des TNC im AD-Mausmodell verschiebt das Profil der Neuroinflammation von pro- zu antiinflammatorisch, senkt die Produktion des A β und verlangsamt den Verlust neuronaler Markerproteine. Diese

Resultate kennzeichnen TNC als ein neues mögliches Target für therapeutische Interventionen von AD.

Teil III: LPS reguliert neuronale Ca²⁺-Reaktion über den TLR4/TRIF-Signalweg

**Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Maryse
Letiembre durchgeführt.**

1 Einleitung

1.1 Toll-like Rezeptoren

In Vertebraten wird die Immunantwort gegen eindringende Mikroorganismen in zwei Kategorien eingeteilt: angeborene und erworbene Immunität, wobei die angeborene Immunität als erste Verteidigungslinie fungiert (Akira und Takeda, 2004). Lange galt das angeborene Immunsystem als schnell reagierend jedoch unspezifisch. Aber die evolutionär konservierte Proteinfamilie der Toll-like Rezeptoren (TLRs) verleiht dem angeborenen Immunsystem die Fähigkeit, distinkt zwischen endogenen und exogenen Pathogenen zu unterscheiden (Janeway und Medhvitov, 2002). Ursprünglich wurde *toll* als essentielles Gen für die dorsoventrale Entwicklung in *Drosophila* entdeckt (Anderson et al., 1985). Den ersten Bericht über die Rolle von Toll in der angeborenen Immunität, nämlich die Einleitung einer Immunantwort gegen fungale Infektion, wurde 1996 verfasst (Lemaitre et al., 1996). Wenig später wurde in Säugern das homologe Protein zum Toll-Rezeptor, aktuell TLR4 genannt, charakterisiert (Medzhitov et al., 1997).

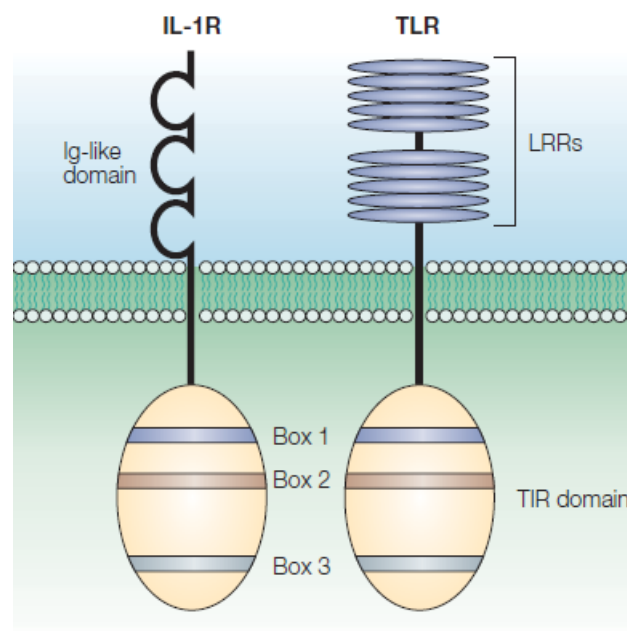


Abbildung 57: Struktur der Toll-like Rezeptoren im Vergleich zum Interleukin-1-Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLRs) und Interleukin-1-Rezeptoren (IL-Rs) haben eine konservierte zyttoplasmatische Domäne, die Toll/IL-1R (TIR)-Domäne. Die Ähnlichkeit dieser Rezeptoren zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass sie drei homologe Regionen innerhalb der TIR-Domäne aufweisen (Box 1, 2 und 3). Jedoch unterscheiden sich die extrazellulären Regionen wesentlich. Während IL-1Rs drei Immunglobulin-ähnliche Domänen besitzen, besteht der extrazelluläre Bereich von TLRs hauptsächlich aus Leucin-reiche Wiederholungen (*leucin-rich repeats*, LRR). (Abbildung stammt aus Akira und Takeda, *Nature Reviews*, 2004)

Insgesamt wurden bislang 13 TLRs, die als Typ I integrale Membranglykoproteine klassifiziert werden, in Mäusen und Menschen identifiziert. Die allgemeine Struktur ist in Abbildung 57 dargestellt. Während ihre zytoplasmatische Region mit der Toll/IL-1R (TIR)-Domäne eine hohe Homologie zu den Interleukin-1-Rezeptoren aufweist, weicht ihr extrazellulärer Bereich bestehend aus 19-25 Leucin-reiche Wiederholungen (*leucin-rich repeat*, LRR) entschieden ab. Jede LRR enthält einen α -Helix und einen β -Faltblatt, die durch Loop-Strukturen miteinander verbunden sind (Akira und Takeda, 2004). TLR10 in Maus ist nicht funktional und TLR11-13 in Menschen nicht vorhanden.

Die Lokalisation der TLRs ist individuell verschieden. TLR1, TLR2 und TLR4 sind auf der Zelloberfläche vorzufinden. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 hingegen sind in intrazellulären Kompartimenten wie Endosomen lokalisiert (Takeda und Akira, 2005).

Im zentralen Nervensystem werden TLRs von einer Vielfalt an Zellen exprimiert. Beispielsweise wurde die Expression sämtlicher TLRs in Mikroglia gefunden (Bsibsi et al., 2002; Olson und Miller, 2004). Die Expression einzelner TLRs wurden in weiteren Zelltypen wie Astrozyten (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR9) oder Oligodendrozyten (TLR2, TLR3) bestätigt (Bsibsi et al., 2002; Bowman et al., 2003). Im peripheren Nervensystem werden TLR3 und TLR4 in Schwann-Zellen stark exprimiert (Goethals et al., 2010). Kürzlich wurde bekannt, dass auch Neuronen in Spinalganglien nahezu alle TLRs tragen (Ochoa-Cortes et al., 2010; Qi et al., 2011).

1.2 Signalkaskaden der Toll-like Rezeptoren

TLRs detektieren Pathogene exogenen Ursprungs wie Bakterien, Pilze oder Viren typischerweise über strukturelle Motive, die als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet werden (Akira et al., 2006). Zu ihren endogenen Liganden zählen Fibrinogen, Fibronectin, Heparansulfat, Hyaluronsäure sowie Hitze-Shock Protein 70 (Smiley et al., 2001; Okamura et al., 2001; Termeer et al., 2002; Vabulas et al., 2002; Johnson et al., 2004). Nach Ligandenbindung dimerisieren TLRs und verändern vorbereitend für die *downstream* Signalübertragung ihre Konformation. TLR2 bildet Heterodimere mit TLR1 oder TLR6. Andere TLRs wie TLR4 oder TLR5 bilden Homodimere (Saitoh et al., 2004; Zhou et al., 2012). Die Aktivierung der TLR-Signalkaskaden über die C-terminale TIR-Domäne wird im höchsten Maße durch das jeweilige Adaptermolekül geprägt (Abb. 58).

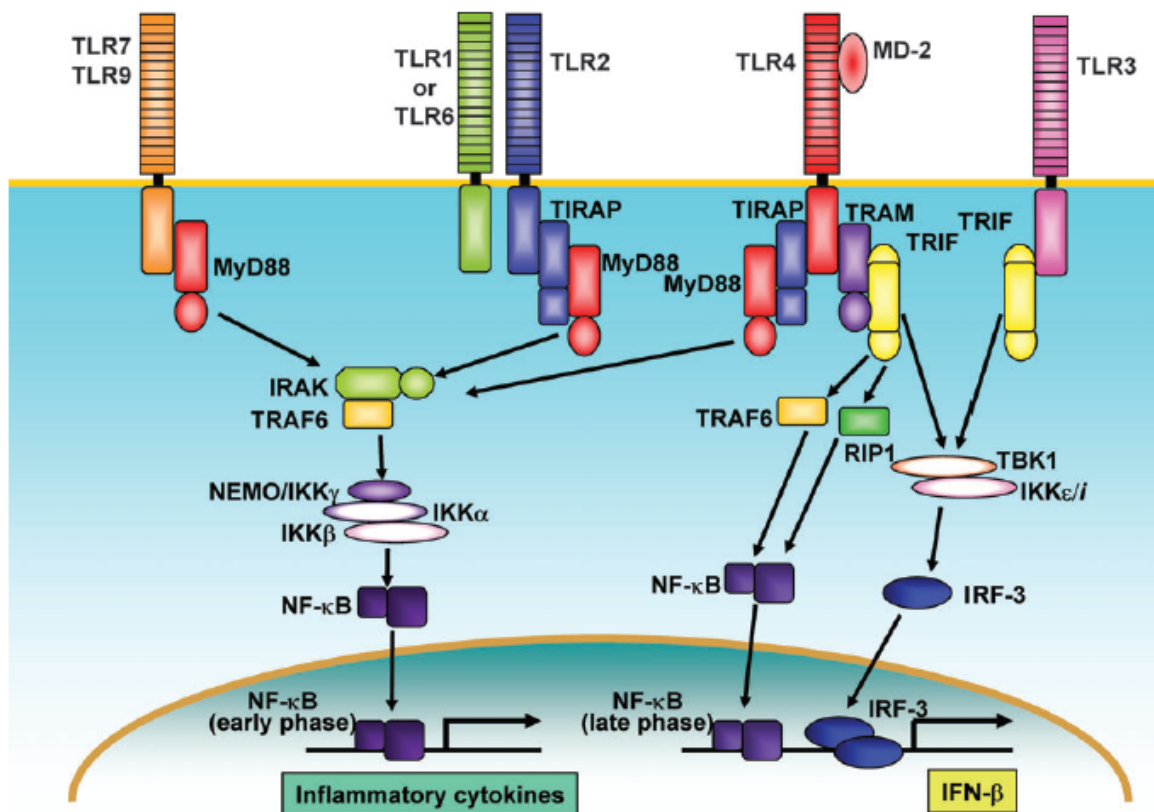


Abbildung 58: Toll-like Rezeptoren (TLRs)-Signalkaskaden

Die intrazelluläre TLR-Signalkaskaden beginnen von der zytoplasmatischen TIR-Domäne. Im *myeloid differentiation primary-response protein 88* (MyD88)-abhängigen Signalweg interagiert das Adapterprotein MyD88 mit der Toll/IL-1R (TIR)-Domäne und rekrutiert *IL-1R-associated kinase* (IRAK)-Proteine. Anschließend wird *tumour-necrosis factor-receptor-associated factor 6* (TRAF6) durch IRAK aktiviert und führt zur Aktivierung des IκB-Kinasekomplexes (IKK-α, -β, -γ). Der IκB-Kinasekomplex phosphoryliert IκB, wodurch IκB abgebaut wird und NF-κB freisetzt. NF-κB transloziert in den Zellkern und induziert die Expression inflammatorischer Zytokine. *TIR domain-containing adaptor protein* (TIRAP) ist ein Brückenadapterprotein, das in den MyD88-abhängigen TLR2- und TLR4-Signalwegen involviert ist. Aktivierung von *IFN-regulatory factor 3* (IRF-3) und Induktion von Interferon-β (IFN-β) in den TLR3- und TLR4-vermittelten Signalwegen führt zur Entdeckung des MyD88-unabhängigen Signalweges. Das Adapterprotein *TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon-β* (TRIF) wird für diesen Signalweg als essentiell erachtet. Hingegen stellt *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) ein weiteres Brückenprotein dar, das spezifisch im TLR4-vermittelten MyD88-unabhängigen/TRIF-abhängigen Signalweg vorkommt. (Abbildung stammt aus Takeda und Akira, *International Immunology*, 2005)

1.2.1 Der MyD88-abhängige Signalweg

Detailliert aufgeklärt wurde der *myeloid differentiation primary-response protein 88* (MyD88)-abhängige Signalweg, dessen Kaskade analog zum IL-1-Signalweg wie folgt abläuft. Nachdem MyD88 zur TIR-Domäne rekrutiert wird, kann die *IL-1R-associated kinase 4* (IRAK4) sich an MyD88 binden und IRAK1 phosphorylieren. Aktiviertes IRAK1 autophosphoryliert Aminosäuren im N-terminalen Bereich, wodurch die Bindung des *tumour-necrosis factor-receptor-associated factor 6* (TRAF6) ermöglicht wird. Danach löst sich der IRAK1-TRAF6-Komplex und interagiert mit einem weiteren Proteinkomplex bestehend aus

transforming growth factor- β -activated kinase (TAK1), *TAK1-binding protein 1* (TAB1) und TAB2 oder TAB3 im Zytoplasma. Die Phosphorylierung von TAK1 infolge dieser Interaktion aktiviert entweder *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) oder den I κ B-Kinasekomplex (IKK- α , - β , - γ), der den Inhibitor von NF- κ B (I κ B) phosphoryliert. Phosphoryliertes I κ B wird anschließend nach Ubiquitinierung abgebaut, sodass NF- κ B freigesetzt wird und in den Zellkern transloziert. Dort induziert es die Expression der Zielgene wie *tnf- α* oder *il-6*.

Im Mausmodell unterbindet eine MyD88-Defizienz die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , gleichgültig welcher TLR stimuliert wird (Kawai et al., 1999; Hacker et al., 2000; Schnare et al., 2000; Takeuchi et al., 2000; Hayashi et al., 2001; Hemmi et al., 2002). Auf der Suche nach strukturell verwandten Adaptermolekülen wurde *TIR domain-containing adaptor protein* (TIRAP)/*MyD88-adaptor-like* (Mal) charakterisiert, dessen *knock out* ebenfalls in eine deutliche Schwächung der Produktion inflammatorischer Zytokine resultiert (Horng et al., 2001). Allerdings beschränkt sich dieser Effekt lediglich auf die TLR2- und TLR4-Signalwege (Fitzgerald et al., 2001; Horng et al., 2002; Yamamoto et al., 2002). Denn TIRAP/Mal-defiziente Mäuse zeigen normale Immunantwort nach Stimulation durch TLR3-, TLR5-, TLR7- oder TLR9-Liganden. TIRAP/Mal arbeitet *upstream* von MyD88, weil eine Überexpression von MyD88 in TIRAP-defizienten Mausfibroblasten den NF- κ B-abhängigen Promotor aktiviert (Akira und Takeda, 2004). Deshalb wird TIRAP/Mal in den gegenwärtigen Modellen als Brückenadapterprotein zwischen TLR und MyD88 in der TLR2- und TLR4-Signalübertragung eingestuft, sodass es dem MyD88-abhängigen Signalweg zugeordnet wird.

1.2.2 Der MyD88-unabhängige Signalweg

Obwohl in MyD88-defizienten Mausmakrophagen die Generation proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α oder IL-6 komplett blockiert wird, erfolgt nach TLR4-Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) eine Aktivierung des NF- κ B und der MAPKs mit verlangsamter Kinetik (Kawai et al., 1999). Außerdem wird der Transkriptionsfaktor *IFN-regulatory factor 3* (IRF-3) nach TLR4-Stimulation aktiviert, welcher in den Zellkern wandert und die Produktion von Interferon- β (IFN- β) anregt (Kawai et al., 2001). Diese Beobachtungen legten den Grundstein zur Entdeckung des MyD88-unabhängigen Signalweges, der über die Adapterproteine *TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon- β* (TRIF, auch bekannt als *TIR-domain-containing molecule 1*, TICAM1) und *TRIF-related adaptor*

molecule (TRAM, auch bekannt als *TIR-domain-containing molecule 2*, TICAM2) vermittelt wird.

TRIF wurde ursprünglich im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen als Interaktionspartner von TLR3 identifiziert (Oshiumi et al., 2003). In *in vitro* Experimenten mit HEK293 Zellen aktivierte eine Überexpression von TRIF den IFN- β -Promotor. Diese physiologische Rolle wurde in einer späteren Arbeit mit *trif*^{-/-} Mäusen verifiziert, die nach Stimulation von TLR3 und TLR4 keine IRF-3-Aktivierung fand (Yamamoto et al., 2003). Somit ist TRIF essentiell für die TLR3- und TLR4-vermittelte Aktivierung des MyD88-unabhängigen Signalweges, der zur Expression von IFN- β führt. Des Weiteren ist es äußerst bemerkenswert, dass *trif*^{-/-} Mäuse zu allen TLR-Liganden mit Ausnahme von TLR4-Liganden eine Immunantwort mit Bildung proinflammatorischer Zytokinen einleiten. Diese Feststellung überrascht, weil die TLR4-vermittelte Phosphorylierung von IRAK1 und NF- κ B im MyD88-abhängigen Signalweg nicht beeinträchtigt wird (Hoebe et al., 2003; Yamamoto et al., 2003). Weshalb TLR4 sowohl den MyD88-abhängigen als auch den MyD88-unabhängigen Signalweg zur Induktion proinflammatorischer Zytokine benötigt, ist Gegenstand derzeitiger Forschung.

Bedingt durch seine Sequenzhomologie wurde TRAM als viertes Adapterprotein der TLRs identifiziert. *In vitro* Experimente basierend auf RNA-Interferenz und *in vivo* Experimente mit *tram*^{-/-} Mäusen suggerieren eine essentielle Rolle des TRAM im TLR4-vermittelten MyD88-unabhängigen/TRIF-abhängigen-Signalweg, aber nicht für den TLR3-Signalweg (Fitzgerald et al., 2003; Yamamoto et al., 2003; Oshiumi et al., 2003). Ähnlich wie *trif*^{-/-} Mäuse produzieren *tram*^{-/-} Tiere keine proinflammatorische Zytokine nach LPS-Stimulation (Yamamoto et al., 2003). Es wird angenommen, dass TRAM wie TIRAP ein Brückenadapterprotein darstellt, da die zytoplasmatische Region von TLR4 direkt mit TRAM anstatt TRIF interagiert (Oshiumi et al., 2003).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das LPS, Bestandteil der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien, gilt als primärer Ligand von TLR4 in Säuger (Poltorak et al., 1998). Administration von LPS verstärkt Entzündungsreaktionen (Boisse et al., 2004), erhöht die Wahrscheinlichkeit von Krampfanfällen (Galic et al., 2008) und verändert motorische Eigenschaften der Muskulatur (Yamaguchi et al., 2011) in Tiermodellen. Derartige systemische Effekte können möglicherweise durch die Fähigkeit des LPS, Ionenkanäle zu modulieren, erklärt werden. Denn in einer Vielzahl an Publikationen wurde eingehend erläutert, dass LPS sowohl die

Aktivitäten von Ca^{2+} -Kanälen (Beck et al., 2008; Diogenes et al., 2011; Tauseef et al., 2012) als auch die der K^{+} -Kanäle (Mezghani-Abdelmoula et al., 2003; Gerth et al., 2005; Kane et al., 2006; Scheel et al., 2006; Croker et al., 2007) entscheidend beeinflusst. Die überwiegende Mehrheit dieser Arbeiten zielt auf lang anhaltende Wirkung des LPS, sodass Effekte erst nach Stunden oder Tage untersucht wurden. Selten wird akuten Effekten Beachtung geschenkt.

In dieser Arbeit soll die akute Wirkung des LPS hinsichtlich der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase in Neuronen untersucht werden. Unter Verwendung von primären Mausneuronen aus Spinalganglien als Modellsystem sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Werden ruhende und depolarisierte Neuronen gleichermaßen durch LPS beeinträchtigt?
2. Über welchen Signalweg wird der Effekt des LPS vermittelt?
3. Wird die neuronale Ca^{2+} -Reaktion durch andere Zelltypen reguliert?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterial

Die für die Kultivierung der DRG-Neuronen verwendeten mikroskopischen Deckgläser mit 12 mm und 25 mm Durchmesser stammten von Karl Hecht GmbH (Sondheim, Deutschland).

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Herkunft
CaCl ₂	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Collagenase Typ II	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Diphtherietoxin	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2-AM)	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Glucose	Serva (Heidelberg, Deutschland)
HEPES	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Lipopolysaccharid-bindendes-Proteins (LBP)	Biometec (Greifswald, Deutschland)
Poly-L-Lysin Hydrobromid (PLL) mol wt 70-150k	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
ProLong Gold Antifade Reagent	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin Typ I	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Zigens serum	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

2.1.3 Antikörper

Der Maus monoklonal anti β -Tubulin Cy-3 konjugierte Antikörper wurde von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Der Schwein anti Hase Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugierten Sekundärantikörper stammte von Dako (Hamburg, Deutschland).

2.1.4 Mäuse

Wildtyp (C57BL/6N, C57BL/6J), *cd14*-defiziente (*cd14*^{-/-}) und *myd88*-defiziente (*myd88*^{-/-}) Mäuse stammten aus der eigenen Tierhaltung nach SPF-Standard. Mäuse mit defektem TLR4 (C3H/HeJ), der dazugehörige Wildtyp (C3H/HeN) sowie *trif*-defiziente (C57BL/6J-Ticam1^{LPS2}/J; *trif*^{-/-}) Tiere wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. *Dtr* transgene Mäuse überexprimieren ein Gen für Diphtherietoxinrezeptor (DTR) unter der Kontrolle des CD11b-Promotors und stammten ebenfalls aus der eigenen Tierhaltung nach SPF-Standard. *Gfp* transgene Tiere wurden freundlicherweise vom Prof. Dr.

Michael D. Menger (Institut für klinische-experimentelle Chirurgie, Universitätsklinik des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland) bereitgestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung muriner DRG-Neuronen

Für die Calcium-Imaging-Versuche (Abschnitt 2.2.2) wurden Neuronen muriner Spinalganglien (*dorsal root ganglion*, DRG) auf runde Deckgläser kultiviert. Die Deckgläser wurden vor dem Gebrauch autoklaviert. Am Vortag der Isolation wurden sie in die Vertiefungen einer BD Falcon™ 6-Well Gewebekulturplatte platziert und mit 500 µg/ml Poly-L-Lysin Hydrobromid (PLL, Molekulargewicht 70,000-150,000, γ -bestrahlt) in bidest. Wasser über Nacht bei 37 °C beschichtet. Anschließend wurde die PLL-Lösung entfernt und die beschichteten Deckgläser 2x mit bidest. Wasser gewaschen. Sie wurden solange unter der Sterilbank getrocknet, bis sämtliche Flüssigkeitsrückstände verdunstet waren. Kurz vor der Isolation wurde zu jedem 6-Well 2 ml DMEM+10% FCS hinzugefügt und bei 37 °C aufbewahrt.

Zur Isolation muriner DRG-Neuronen wurden die Tiere folgendermaßen präpariert. Die Maus wurde mit Isofluran narkotisiert, kurz in 70% Ethanol getaucht und auf dem Bauch gelegt. Das Rückenfell wurde aufgeschnitten und die Wirbelsäule zwischen Beckenbereich und Halsregion freipräpariert. Danach wurde die Wirbelsäule seitlich aufgeschnitten, ohne das Rückenmark zu verletzen. Die Spinalganglien wurden mit der Pinzette fixiert, von den restlichen Nervenfasern abgetrennt und in einem Reaktionsgefäß mit 1 ml DMEM+10% FCS solange aufbewahrt, bis sämtliche Spinalganglien aus dem Lumbal- und Thorakalbereich gesammelt wurden. Anschließend wurde das DMEM+10% FCS entfernt und durch 500 µl einer Enzymmischung (4 mg/ml Collagenase Typ II und 1 mg/ml Trypsin Typ I) ersetzt, um das Gewebe bei 37 °C im Wasserbad zu verdauen. Die Inkubationsdauer im 37 °C Wasserbad betrug 20 min, wobei das Reaktionsgefäß nach jeweils 3 min geschüttelt wurde. Ungenügend verdautes Material wurde mit der Pipette möglichst zerkleinert. Die Zellsuspension wurde bei 500 xg, 6 min, 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Schließlich wurde die Zellen in 300 µl DMEM+10% FCS resuspendiert, zu den vorgewärmten 2 ml DMEM+10% FCS in 6-Well hinzugefügt und bei 37 °C 5% CO₂ inkubiert, so dass die Zellen sich auf den Boden adhäreren und ein netzartiges Geflecht ausbilden. Am folgenden Tag und jeweils nach 3 Tagen wurde das Kulturmedium ausgetauscht. Calcium-Imaging-Experimente wurden mit DRG-Neuronen, die sich 8-12 Tagen in Kultur befanden, ausgeführt.

Für Cokultur-Experimente wurden die Zellen aus einer C3H/HeJ Maus und einer *gfp* transgenen Maus im Verhältnis 1:1 gemischt und gemeinsam auf einem PLL-beschichteten Deckglas kultiviert.

2.2.2 Calcium-Imaging

2.2.2.1 Durchführung der Calcium-Imaging-Experimente

Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2-AM) ist eine membranpermeable Variante des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2, das 1985 von der Gruppe um Roger Tsien entwickelt wurde (Grynkiewicz et al., 1985). Fura-2 bildet mit Ca^{2+} Chelatkomplexe und wird deshalb zur Quantifizierung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration genutzt. Der Acetoxymethylester wird im Zytoplasma der Zelle durch endogene Esterasen vom Fura-2 abgespalten, wodurch ein Wiederaustritt des Farbstoffs unterbunden wird. Während Ca^{2+} -gebundenes Fura-2 ein Anregungsmaximum bei 340 nm aufweist, wird das freie Fura-2 bei 380 nm angeregt. Die Emission wird in beiden Fällen bei 510 nm registriert. Über das Verhältnis 340/380 nm wird auf die Menge des freigesetzten Ca^{2+} zurückgeschlossen.

Bei den vorliegenden Versuchen wurden Fluoreszenzänderungen des Fura-2 (Anregung 340 und 380 nm, Emission 510 nm) mit einer TILLvisION Software (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) überwacht. Änderungen des Fura-2-Signals wurden als Verhältnis F340/F380 angegeben und in 3-Sekunden-Takt ausgewertet, wobei F340 und F380 Hintergrund bereinigte Fluoreszenzintensitäten einzelner Neuronen darstellen. Parallel dazu wurde ein Video zu jedem Versuch aufgenommen.

Imaging-Experimente wurden wie folgt ausgeführt. Als Vorbereitung des Calcium-Imagings wurden DRG-Neuronen mit DMEM+10% FCS+10 μM Fura-2-AM für 30-40 min bei RT beladen. Nach Aufnahme des Farbstoffs wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und anschließend dem Niedrig- K^+ -Puffer (140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 5 mM CaCl_2 , 10 mM Glucose, 10 mM HEPES, [pH 7,2]) ausgesetzt. Unter dem Mikroskop wurde ein Bereich ausgewählt, der möglichst viele Neuronen enthält. Daraufhin wurde das Aufnahmeprotokoll mit einer Gesamtzeit von 6 min gestartet. Nach 60 s wurde ein Volumen Hoch- K^+ -Puffer (140 mM NaCl, 44,6 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 5 mM CaCl_2 , 10 mM Glucose, 10 mM HEPES, [pH 7,2]) hinzugefügt, um eine Depolarisation der Neuronen zu erzielen. Die Applikation der Lipopolysaccharide (LPS) in unterschiedlichen Konzentrationen erfolgte 90 s später. Zur Überprüfung möglicher Einflüsse des Lipopolysaccharid-bindendes-Proteins (LBP) wurde es in Kombination mit LPS eingesetzt.

2.2.2.2 Auswertung der Calcium-Imaging-Experimente

Calcium-Imaging-Experimente wurde nach dem Schema in der unten gezeigten Abbildung 59 ausgewertet. Aus den Werten der Messpunkte 2-4 wurde ein Mittelwert gebildet und als Punkt a bezeichnet. Punkt a stellte die basale Ausgangssituation des jeweiligen Neurons vor der Depolarisation dar. Der zweite Mittelwert, gebildet aus den Werten der Messpunkte 44-46, wurde Punkt b genannt. Punkt b bezog sich auf das Ende der Plateauphase, kurz bevor LPS appliziert wurde. Der dritte Mittelwert, Punkt c, wurde aus den Werten der Messpunkte 54-56 gebildet und beschrieb die Wirkung nach Zugabe des LPS. Die Berechnung des repolarisierenden Effektes durch das LPS erfolgte nach der Formel $(b-c)/(b-a)$ und wurde in % angegeben.

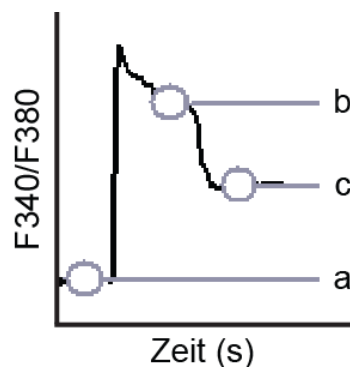


Abbildung 59: Schematische Darstellung zur Auswertung der Calcium-Imaging-Experimente

a: Basallevel des Ca^{2+} , b: Ende der Plateauphase vor Applikation des LPS, c: nach Applikation des LPS. Der Effekt des LPS berechnete sich aus $(b-c)/(b-a)$ und wurde in % angegeben.

2.2.3 Spezifische Bereinigung der Mikroglia/Makrophagen

2.2.3.1 Applikation des Diphtherietoxins

1 mg lyophilisiertes Diphtherietoxin aus *Corynebacterium diphtheriae* wurde in 1 ml steriles bidest. Wasser gelöst, aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Um spezifisch DTR-exprimierende Mikroglia/Makrophagen in DRG-Kulturen zu bereinigen, wurden die aus Wildtyp und *dtr* transgenen Tieren angefertigte Kulturen für 4 Tage mit 100 ng/ml Diphtherietoxin in DMEM+10% FCS inkubiert. Entsprechende Kulturen ohne Kontakt zum Toxin dienten als Kontrollen.

2.2.3.2 Nachweis der Bereinigung

Um die spezifische Bereinigung DTR-exprimierende Mikroglia/Makrophagen in DRG-Kulturen zu überprüfen, wurde auf die Technik der Immunfluoreszenzmikroskopie zurückgegriffen. Nachdem die aus Wildtyp und *dtr* transgenen Tieren angefertigte Kulturen für 4 Tage mit 100 ng/ml Diphtherietoxin behandelt wurden, wurden die Zellen für 5 min mit PBS gewaschen und mit 1 ml 4% Paraformaldehyd (PFA) für 20 min bei RT fixiert. Danach wurde das PFA entfernt, die Zellen erneut 2x 5 min mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml PBS+10% Ziegen Serum+1% BSA (w/v)+0,1% Triton X-100 für 30 min bei RT geblockt. Nach 3 weiteren Waschgängen je 5 min mit PBS wurde die beiden Antikörper Hase polyklonal anti Iba1 (Wako) 1:200 und Maus monoklonal anti β -Tubulin Cy-3 Konjugat (Sigma Aldrich) 1:100 in PBS+0,1% BSA (w/v)+0,1% Triton X-100 verdünnt und gemeinsam für 2 h bei RT appliziert. Wieder wurden die Zellen gewaschen und im Anschluss mit dem Schwein anti Hase FITC konjugierten Sekundärantikörper (Dako), der 1:20 in PBS+0,1% BSA+0,1% Triton X-100 verdünnt wurde, für 1,5 h bei RT inkubiert. Es folgten 3 Waschgänge je 7 min mit PBS. Schließlich wurden die Deckgläser mit einer Pinzette aus der 24-Well Platte entnommen und mit jeweils einen Tropfen ProLong[®] Gold Antifade Reagent, welches das 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) enthielt, auf Glasobjektträger angeheftet. Bis zur Auswertung mit dem Nikon Eclipse E600 Mikroskop wurden die Präparate in Dunkeln aufbewahrt. Unter geeigneter Anregung erschienen die Iba1-positive Mikroglia/Makrophagen grün und die β -Tubulin-positive Neuronen rot, während alle Zellkerne bedingt durch die DAPI-Färbung blau dargestellt wurden. Bereiche mit hoher Zelldichte wurden fotografiert und mit dem Bildverarbeitungsprogramm Image-Pro Plus (Version 6.0) analysiert, um den prozentualen Anteil an Neuronen und Mikroglia/Makrophagen zu ermitteln.

3 Ergebnisse

3.1 LPS inhibiert Ca^{2+} -Signale in DRG-Neuronen (M. Letiembre)

Zur Überprüfung der funktionalen Relevanz des Toll-like Rezeptors 4 (TLR4) in DRG-Neuronen wurde sein natürlicher Agonist, das Lipopolysaccharid (LPS), verwendet, um spezifisch TLR4 zu stimulieren. Das experimentelle Design des Ca^{2+} -Imaging erlaubte die Detektion der durch LPS hervorgerufene Effekte innerhalb von Sekunden. Die Experimente wurden mit Neuronen im ruhenden und depolarisierten Zustand durchgeführt.

Zuerst wurde untersucht, ob die basale Ca^{2+} -Menge der DRG-Neuronen, die sich in einer Niedrig- K^+ -Lösung (5,4 mM) befanden, in der Anwesenheit von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS verändert wurden. Die Ca^{2+} -Signale zeigten einen konstanten Verlauf über die gesamte Messzeit und ließen darauf schließen, dass LPS keinen Einfluss auf die basale Ca^{2+} -Menge der DRG-Neuronen nahm (Abb. 60 A).

Als nächstes wurden die Effekte des LPS auf Neuronen im depolarisierten Zustand inspiziert. Es ist bekannt, dass eine Erhöhung der K^+ -Konzentration eine Membrandepolarisation mit gleichzeitigem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} hervorruft (Meier et al., 1988). Darüber hinaus wurde berichtet, dass eine hohe extrazelluläre K^+ -Konzentration die LPS-induzierte Toxizität in Mischkulturen aus Neuronen und Gliazellen verstärkt (Chang et al., 2000). Zur Depolarisation der Zellen wurde ein Volumen Hoch- K^+ -Lösung (44,6 mM) hinzugefügt, um eine K^+ -Endkonzentration von 25 mM zu erreichen. Unter depolarisierenden Bedingungen erfuhr das intrazelluläre Ca^{2+} einen Anstieg bis zu einem Spitzenwert innerhalb von wenigen Sekunden und fällt im Anschluss langsam und stetig bis hin zu einem Gleichgewicht ab. Diese kontinuierliche Repolarisation wurde durch die Zugabe von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS unterbrochen, indem dessen Effekt sich durch eine abrupte Reduktion des intrazellulären Ca^{2+} ausdrückte (Abb. 60 B). Während der Abfall des Ca^{2+} vom Maximum bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes in der Anwesenheit des Vehikels einige Minuten in Anspruch nahm, beschleunigte die Zugabe von LPS diesen Vorgang merklich, so dass das Ca^{2+} -Gleichgewicht in den meisten Neuronen innerhalb von 30 s hergestellt wurde. Ein experimentelles Artefakt bedingt durch den Zugabevorgang des LPS wurde ausgeschlossen, weil das Hinzufügen des Vehikels die Repolarisation nicht beeinflusste.

Der Nettoeffekt des LPS auf die Ca^{2+} -Inhibition in C3H/HeN Kulturen wurde für jede Zelle einzeln berechnet und in einem Punktdiagramm aufgetragen. Aus diesem geht hervor, dass Reaktionen auf das Vehikel sich überwiegend zwischen 0% und -20% bewegten, in Einzelfällen jedoch auch -50% erreichen konnten. Zugabe von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS hingegen löste

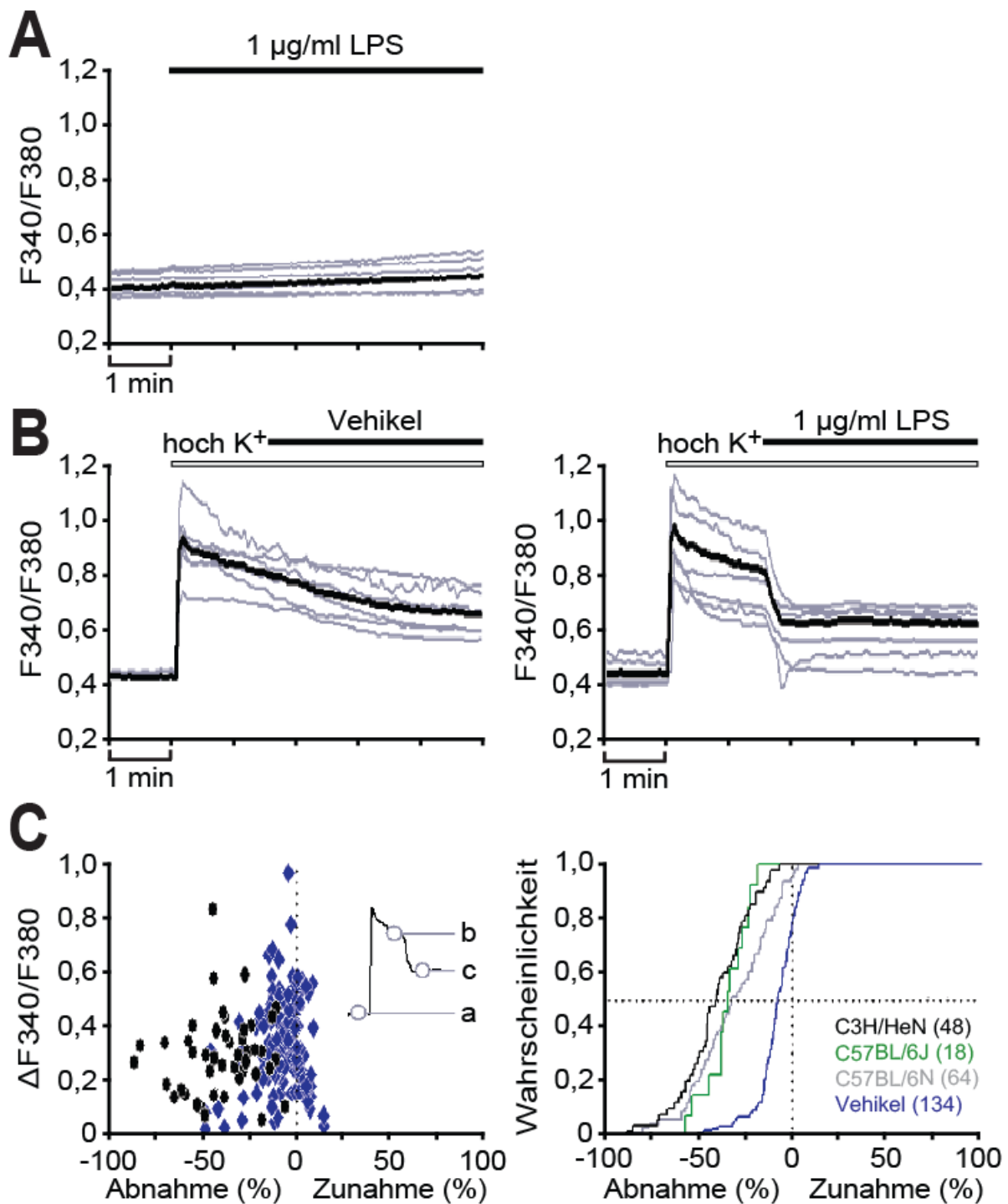


Abbildung 60: LPS inhibiert Ca²⁺-Signale in depolarisierten DRG-Neuronen

(A) LPS hatte keinen Effekt auf die basale Ca²⁺-Konzentration in den DRG-Neuronen. (B) DRG-Neuronen wurden mit hoher K⁺-Konzentration zur Depolarisation gebracht, woraufhin die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration rapide bis zu einem Maximum anstieg und anschließend stetig fiel. Die Applikation von 1 µg/ml LPS führte zur schnellen Inhibition und beschleunigte die Wiederherstellung des Ca²⁺-Gleichgewichts. Aufnahmen von Einzelzellen sind in grau sowie ihre Mittelwerte in schwarz dargestellt. (C) Statistische Analyse der LPS-Effekte auf die Ca²⁺-Signale. (a) Basallevel, (b) vor und (c) nach Applikation des Vehikels oder LPS (links). Änderungen der Ca²⁺-Signale wurden als Verhältnis ΔF340/F380 angegeben. Vergleich der durchschnittlichen Effekte, hervorgerufen durch Vehikel oder 1 µg/ml LPS, in den Mauslinien C3H/HeN, C57BL/6J und C57BL/6N (rechts).

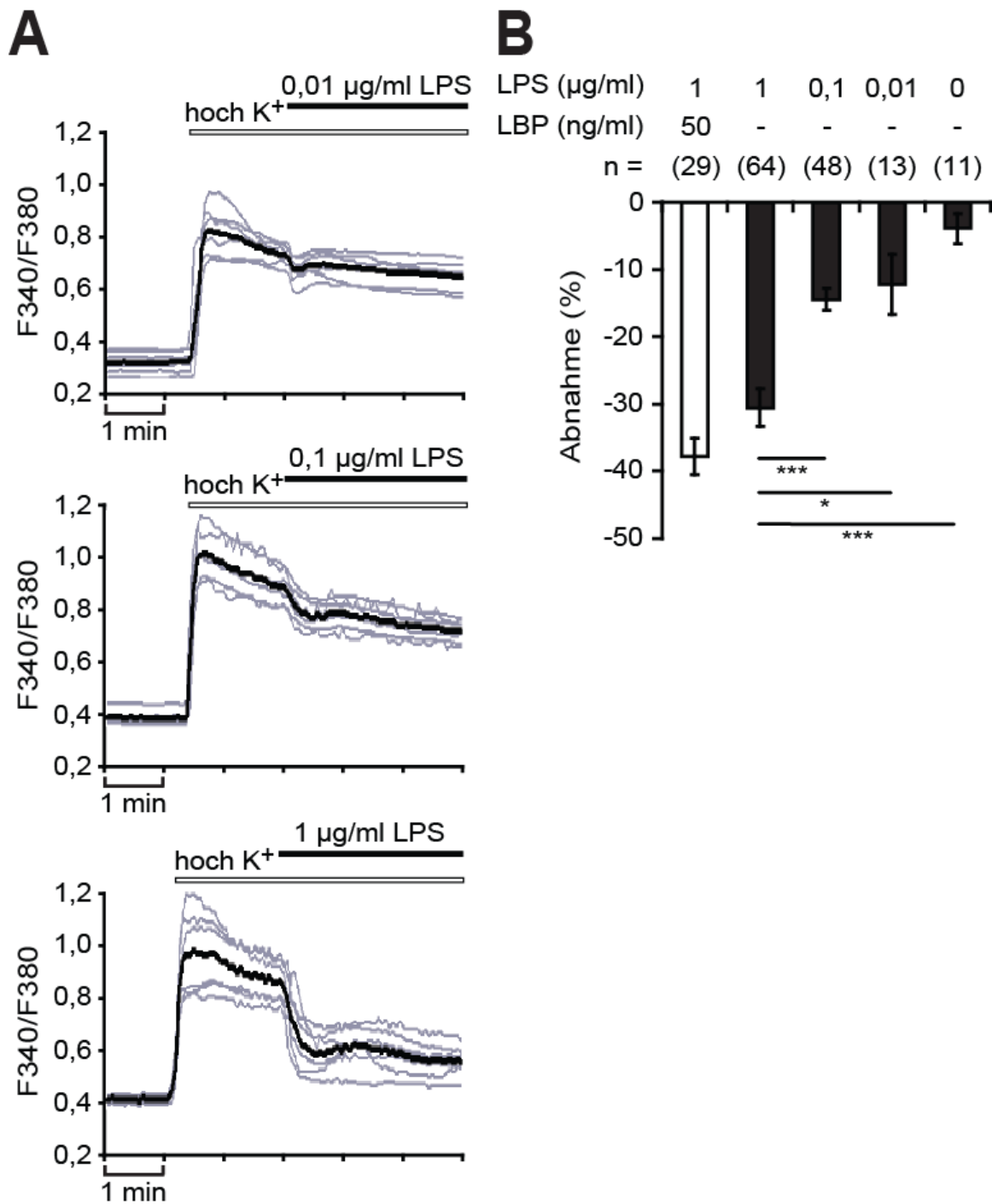


Abbildung 61: Dosisabhängige Inhibition der neuronalen Ca^{2+} -Signale durch LPS

DRG-Neuronen aus C57BL/6N Mäusen wurden depolarisiert und mit verschiedenen LPS-Konzentrationen konfrontiert. (A) Repräsentative Aufnahmen von Einzelzellen (grau) sowie ihre Mittelwerte (schwarz) sind gezeigt. (B) Durchschnittliche Abnahme der Ca^{2+} -Signale nach Applikation des LPS mit oder ohne LPS-bindendes-Protein (LBP). * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$.

unterschiedliche Reaktionen aus. Sie reichten von -5% bis -85%, wobei die meisten Inhibitionen Werte zwischen -25% und -50% aufwiesen. Das Experiment wurde mit DRG-Neuronen aus weiteren Mauslinien, C57BL/6J und C57BL/6N, wiederholt und führte zu ähnlichen Ergebnissen. Somit wurde nachgewiesen, dass der inhibitorische Effekt des LPS

auf das intrazelluläre Ca^{2+} depolarisierter DRG-Neuronen nicht auf eine bestimmte Mauslinie bzw. -hintergrund beschränkt war (Abb. 60 C).

Die dosisabhängige Wirkung des LPS wurde durch serielle Reduktion der eingesetzten Menge demonstriert. Zelluläre Ca^{2+} -Inhibitionen, hervorgerufen durch 0,01 $\mu\text{g/ml}$ und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, waren stärker als die Vehikelkontrolle, jedoch wesentlich schwächer im Vergleich zu 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS (Abb. 61).

Das Lipopolysaccharid-bindendes-Protein (LBP) ist ein bekanntes Molekül zur Verstärkung der LPS-Effekte (Dunzendorfer et al., 2004). Um den möglichen Einfluss des LBP zu ergründen, wurden Neuronen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS mit oder ohne 50 ng/ml LBP konfrontiert. Die Anwesenheit von LBP hatte eine geringe Verstärkung der Ca^{2+} -Inhibition zur Folge, ohne statistische Signifikanz zu erlangen (Abb. 61 B).

3.2 LPS-induzierte Ca^{2+} -Inhibition ist TLR4 und TRIF abhängig (M. Letiembre)

Im menschlichen Organismus wird das LPS von LBP gebunden, sobald es in die Blutbahn gelangt. Der LPS-LBP-Komplex wird von TLR4 und seinem Corezeptor *cluster of differentiation 14* (CD14) gebunden, worauf sich intrazelluläre Signalkaskaden über Adapterproteine wie *myeloid differentiation primary-response protein 88* (MyD88) oder *toll/interleukin receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF) ausgelöst werden. Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die LPS-induzierte Ca^{2+} -Inhibition nicht auf die Präsenz des LBP angewiesen ist. Folglich wurde analysiert, welche der Rezeptoren TLR4 und CD14 sowie der Adapterproteine MyD88 und TRIF die Effekte des LPS vermitteln. Für diese Versuche wurden DRG-Neuronen aus *cd14*-, *myd88*- oder *trif*-defizienten Mäuse isoliert. Zusätzlich wurden DRG-Neuronen aus C3H/HeJ Tieren, die eine Punktmutation im *tlr4*-Gen aufweisen, verwendet. Die Mutation in TLR4 macht diese Mauslinie gegenüber LPS unempfindlich (Poltorak et al., 1998).

Im depolarisierten Zustand zeigten DRG-Neuronen aus Tieren mit defektem TLR4 keine Reaktion auf das LPS und reagierten sogar schwächer als die Vehikelkontrolle. Zellen aus *cd14*- oder *myd88*-defizienten Mäusen reagierten auf LPS in ähnlicher Manier wie Wildtyp-Kontrollen. Die Ca^{2+} -Reaktion *trif*-defizienter Neuronen war in einigen Punkten auffällig anders. Nach Depolarisation lag das Ca^{2+} -Maximum dieser Zellen niedriger als die restlichen. Die Repolarisation verlief zügiger und nach LPS-Zugabe wurde keine Reaktion beobachtet.

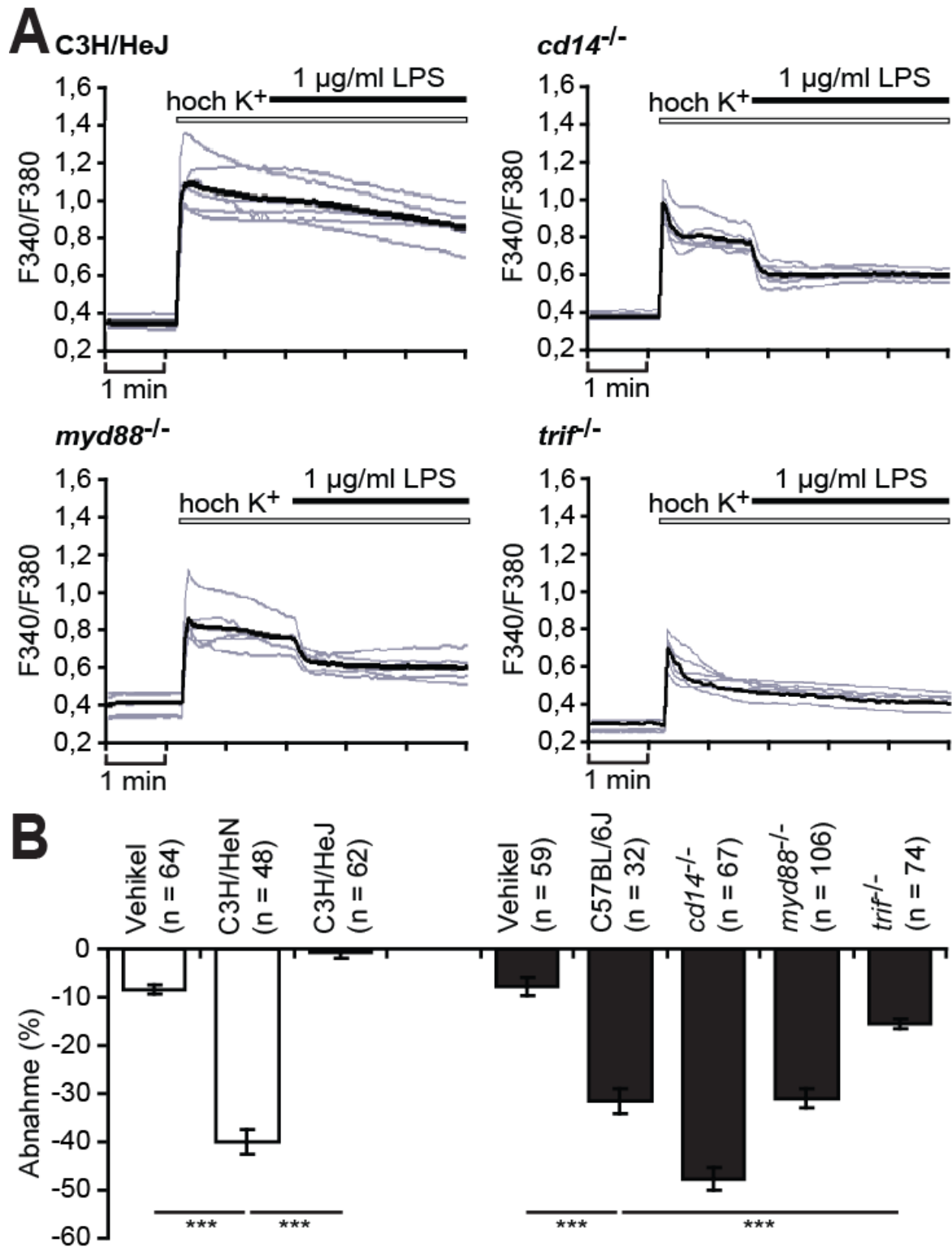


Abbildung 62: Die LPS-induzierte Ca^{2+} -Inhibition in DRG-Neuronen ist TLR4 und TRIF abhängig

(A) Repräsentative Experimente mit DRG-Neuronen aus C3H/HeJ (TLR4 defekt), *cd14*^{-/-}, *myd88*^{-/-} und *trif*^{-/-} Mäusen sind gezeigt. Aufnahmen von Einzelzellen sind in grau sowie ihre Mittelwerte in schwarz dargestellt. (B) Statistischer Vergleich der Effekte von 1 µg/ml LPS auf DRG-Neuronen aus unterschiedlichen Mauslinien. *** $p \leq 0,001$.

Aus der statistischen Analyse konnte abgeleitet werden, dass bei Neuronen mit defektem TLR4 und Neuronen mit *trif*-Defizienz eine signifikante Schwächung der Ca^{2+} -Inhibition festgestellt wurde, während *cd14*- oder *myd88*-defiziente Zellen keine Schwächung aufwiesen (Abb. 62 B). Folglich sind TLR4 und TRIF für die Vermittlung der LPS-induzierten Ca^{2+} -Inhibition in DRG-Neuronen essentiell.

3.3 DRG-Neuronen mit defektem TLR4 in Cokultur mit Wildtyp-Zellen

Die Spinalganglion enthalten neben pseudounipolare sensorische Nervenzellen auch Satellitenzellen und Schwann-Zellen, die zur Gruppe der Gliazellen gehören. Satellitenzellen haben ähnliche Funktionen wie die Astrozyten im zentralen Nervensystem. Sie umhüllen die Zellkörper der Neuronen, versorgen diese mit Nährstoffe und besitzen Schutz- sowie strukturelle Eigenschaften. Bisher wurden Satellitenzellen nicht in Verbindung mit TLR4 gebracht. Es wurde jedoch berichtet, dass Astrozyten eine Reihe von TLRs (TLR2, TLR4, TLR5 und TLR9) in geringen Mengen exprimieren (Bowman et al., 2003). Schwann-Zellen, benannt nach ihren Entdecker Theodor Schwann, sind ausschließlich im peripheren Nervensystem vorzufinden. Sie bilden die Myelinscheiden, welche die Axone der Neuronen umwickeln und dadurch für eine Erhöhung der Leitgeschwindigkeit sorgen. TLRs, insbesondere TLR3 und TLR4, werden in Schwann-Zellen in großem Maß exprimiert (Goethals et al., 2010). Ferner konnte in den verwendeten DRG-Kulturen die natürliche Präsenz von Mikroglia/Makrophagen nicht ausgeschlossen werden. Murine Mikroglia/Makrophagen exprimieren fast alle bislang bekannten TLRs und lassen sich durch eine Vielzahl an Agonisten, einschließlich LPS, zur Produktion und Freisetzung inflammatorischer Zytokine stimulieren (Olson und Miller, 2004).

Um die Möglichkeit zu überprüfen, inwiefern die anderen Zelltypen in der DRG-Mischkultur die LPS-induzierte Ca^{2+} -Inhibition in den Neuronen mitbeeinflussen oder gar komplett dirigieren, wurden Zellen aus C3H/HeJ Tieren mit denen aus *gfp* transgenen Mäusen gemeinsam kultiviert. Vor der Ausführung des experimentellen Protokolls wurde eine Photographie angefertigt, in der alle grün fluoreszierende Zellen deutlich zu erkennen war (Abb. 63 C). Anhand der Positionen in den Photographien konnte bei der Analyse nachvollzogen werden, welche Neuronen aus welcher Maus stammten. In den Cokultur-Experimenten fiel auf, dass die Zellen im Vergleich zu vorangegangenen Versuchen grundsätzlich schwächer auf LPS reagierten. Während die Ca^{2+} -Inhibition der C3H/HeN Zellen nach LPS-Zugabe bei ca. 40% lag, betrug sie bei *gfp* transgenen Neuronen ungefähr

25%. Hingegen unterschied sich die neuronale Ca^{2+} -Reaktion der Zellen mit defektem TLR4 gänzlich von denen aus isolierten Kulturen. Die Ca^{2+} -Profile belegten, dass die LPS-induzierte Ca^{2+} -Inhibition der Neuronen aus C3H/HeJ Tieren in einer Umgebung mit TLR4-exprimierenden Zellen teilweise wiederhergestellt wurden (Abb. 63 A unten). Weiterhin wies die statistische Analyse darauf hin, dass die Reaktionen in Neuronen mit defektem TLR4 (-14,79%) signifikant geringer ausfielen als in *gfp* transgenen Neuronen der gleichen Kultur (-24,34%, $p = 0,016$) (Abb. 63 B). Zusammenfassend demonstrierten die Cokultur-Versuche, dass die LPS-induzierte neuronale Ca^{2+} -Inhibition von weiteren Zellen in ihrer Umgebung mitreguliert wurden. Die Neuronen selbst trugen zu dieser Reaktion einen Anteil bei, da ansonsten das Maß der Inhibition zwischen *gfp* transgenen Zellen und Zellen mit defektem TLR4 sich nicht unterschieden hätten.

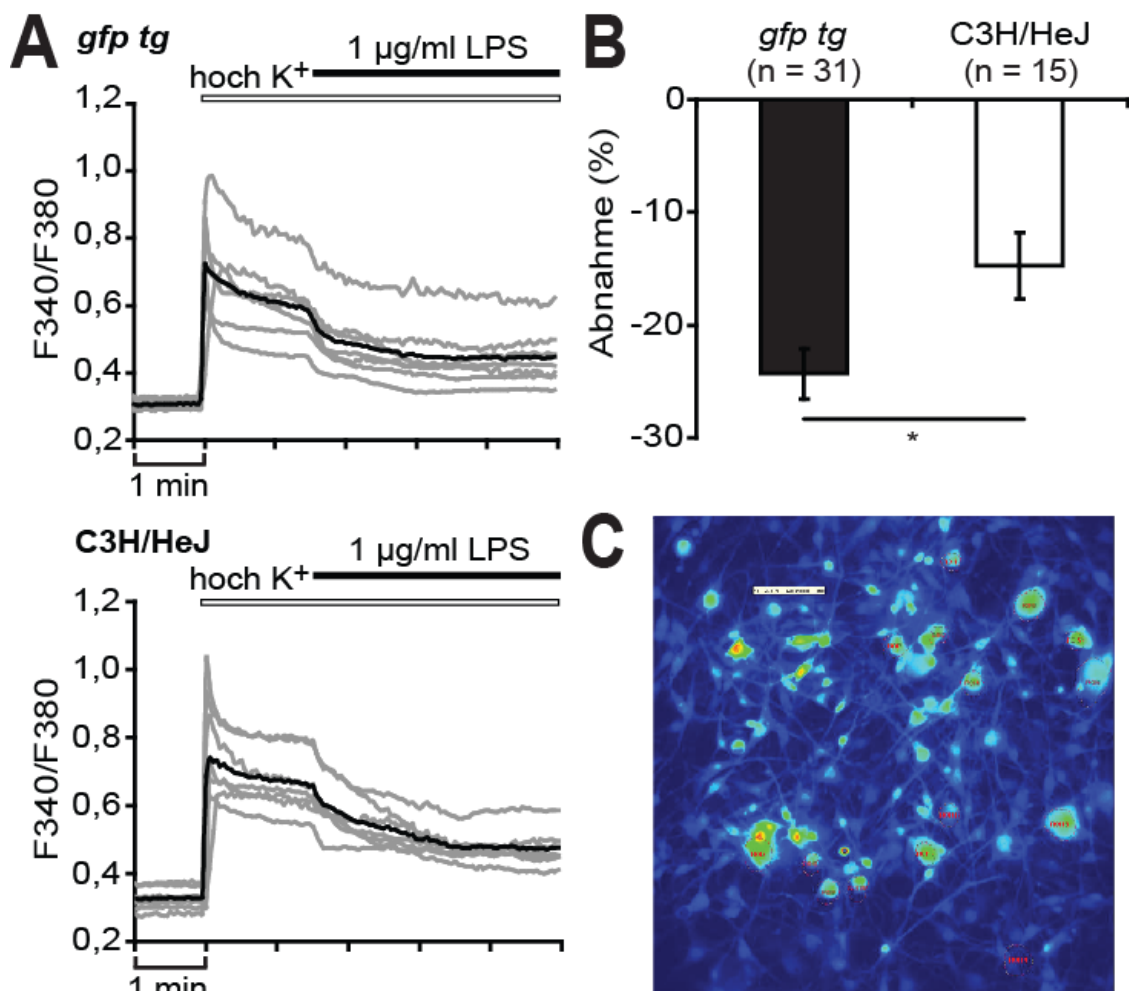


Abbildung 63: DRG-Neuronen mit defektem TLR4 in Cokultur mit TLR4 wt Zellen

(A) Repräsentative Experimente von DRG-Neuronen aus C3H/HeJ (TLR4 defekt) und TLR4 wt/*gfp tg* Mäusen in Cokultur. Aufnahmen von Einzelzellen sind in grau sowie ihre Mittelwerte in schwarz dargestellt. (B) Durchschnittliche Abnahme der Ca^{2+} -Signale nach Applikation von 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS. * $p \leq 0,05$. (C) Exemplarische Fotografie der Cokultur.

3.4 Mikroglia/Makrophagen steuern neuronale Ca^{2+} -Signalübertragung

3.4.1 Spezifische Bereinigung der Mikroglia/Makrophagen in DRG-Kulturen

Mikroglia und Makrophagen, Zellen des Immunsystems, stammen von den gleichen Vorläuferzellen ab und teilen die meisten Eigenschaften wie Phagozytose oder Vermittlung entzündlicher Immunantworten miteinander. Die Makrophagen, die sich aus dem Knochenmark entwickeln, zirkulieren in den Blutgefäßen. Zusammen mit den im zentralen Nervensystem ansässigen Mikroglia dienen sie der aktiven Immunabwehr gegen eindringende Pathogene wie Bakterien, Pilze oder Viren. Makrophagen können über die Blutbahn in die DRG eindringen und sind dort im Gegensatz zum zentralen Nervensystem natürlich präsent (Hu und McLachlan, 2002). Bei den Mikroglia wird zwischen der ruhenden und aktivierten Form unterschieden. Aktivierte Mikroglia besitzen längere Fortsätze, schütten Zytokine aus und exprimieren MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex, *major histocompatibility complex*) Klasse II Moleküle, wodurch eine eindeutige Abgrenzung zu den Makrophagen erschwert wird.

Um die Rolle der Mikroglia/Makrophagen in der LPS-induzierten Ca^{2+} -Inhibition zu ergründen, wurden DRG-Neuronen aus *dtr* transgenen Mäusen präpariert. Diese Tiere überexprimieren den Diphtherietoxinrezeptor (DTR) unter der Kontrolle des CD11b-Promotors, so dass Mikroglia/Makrophagen durch Applikation des Diphtherietoxins spezifisch eliminiert werden konnten. Dazu wurden die Kulturen mit 100 ng/ml Diphtherietoxin für eine Dauer von 4 Tagen inkubiert, bevor der Nachweis der Bereinigung mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie erbracht wurde. Die Gesamtheit aller Zellen wurde mit dem Farbstoff DAPI, der die Zellkerne anfärbte, dargestellt. Mikroglia/Makrophagen, detektiert durch anti Iba1 Antikörper, erschienen grün. Das neuronale β -Tubulin ließ Neuronen rot fluoreszieren. Die Fluoreszenzbilder wurden übereinander gelagert, um den jeweiligen Anteil an Neuronen oder Mikroglia/Makrophagen zu berechnen (Abb. 64 A). In der Anwesenheit des Diphtherietoxins erhöhte sich die Anzahl der Neuronen sowohl in der Wildtyp- als auch in *dtr* transgenen Kultur unwesentlich. Der Neuronenanteil lag bei allen untersuchten Präparaten bei ungefähr 3% (Abb. 64 B links). Aufgrund der geringen Anzahl schwankte der prozentuale Anteil an Mikroglia/Makrophagen von Probe zur Probe stark. In Wildtyp-Kulturen waren 0,25% aller Zellen Iba1-positiv, wobei sich die Menge nach Applikation des Diphtherietoxins nicht veränderte. In Kulturen aus *dtr* transgenen Mäusen hingegen verringerte sich der Anteil an Mikroglia/Makrophagen von 0,36% vor der Behandlung auf 0,08% nach der Behandlung mit dem Diphtherietoxin ($p = 0,022$) (Abb. 64 B rechts). Somit

konnte die Menge an Mikroglia/Makrophagen auf ein Minimum reduziert werden, ohne die Lebensfähigkeit der Neuronen zu beeinträchtigen.

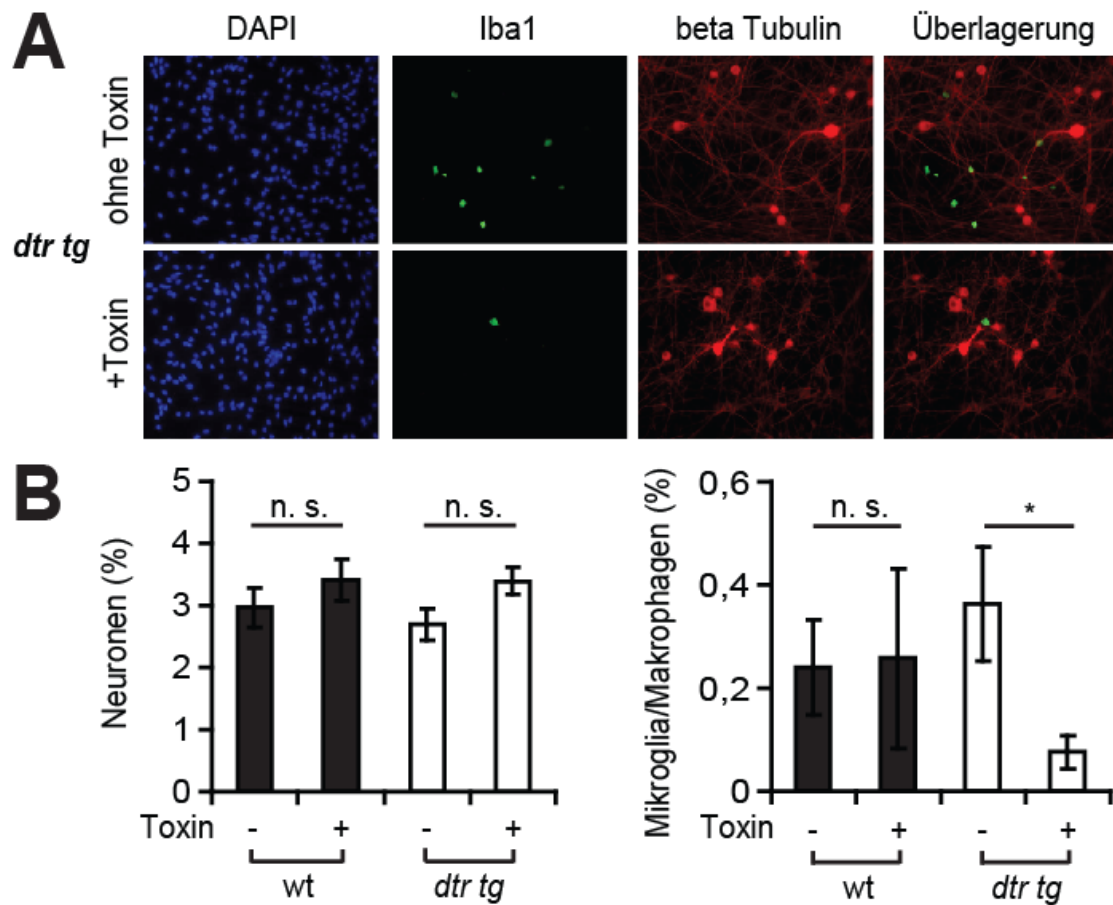


Abbildung 64: Spezifische Bereinigung der Mikroglia/Makrophagen

DRG-Kulturen aus Diphtherietoxinrezeptor exprimierenden Tieren und Wildtyp Kontrollen wurden für 4 Tage mit Vehikel oder 100 ng/ml Diphtherietoxin inkubiert. Anschließend wurden sie mit DAPI, anti Iba1 und anti β -Tubulin Antikörper gefärbt. (A) Repräsentative Färbungen der *dtr tg* Kulturen mit und ohne Toxinbehandlung. Zellkerne sind in blau, Mikroglia/Makrophagen in grün und Neuronen in rot dargestellt. (B) Quantifizierung der Neuronen (links) und Mikroglia/Makrophagen (rechts) mit und ohne Toxinbehandlung. * $p \leq 0,05$. n. s. = nicht signifikant.

3.4.2 Mikroglia/Makrophagen regulieren LPS-induzierte Ca^{2+} -Inhibition in DRG-Neuronen

DRG-Kulturen aus Wildtyp- und *dtr* transgenen Mäusen wurden mit 100 ng/ml Diphtherietoxin für 4 Tage inkubiert, um die Mikroglia/Makrophagen zu dezimieren. Danach wurden die Zellen wie im Abschnitt 3.1 beschrieben mit hoher K^+ -Konzentration depolarisiert und 1 μ g/ml LPS konfrontiert. Bei sämtlichen Präparationen wurden abrupte Inhibitionen nach LPS-Zugabe festgestellt und die Ca^{2+} -Signalprofile belegten, dass der Gleichgewichtszustand mit oder ohne Toxin nach ähnlicher Zeit erreicht wurde (Abb. 65 A).

Wildtyp-Neuronen zeigten, dass die Toxinbehandlung keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Ca^{2+} -Inhibition in den Neuronen nahm. Die Stärke der Repolarisation in den Neuronen aus *dtr* transgenen Kulturen nach Toxinbehandlung unterschied sich signifikant von den Reaktionen der Zellen ohne Toxinbehandlung (Abb. 65 B). Die Bereinigung der Mikroglia/Makrophagen führte zu einem signifikanten Rückgang der Ca^{2+} -Inhibition von -44% auf -34% ($p < 0,001$). Obwohl die Anzahl der Mikroglia/Makrophagen als gering einzustufen war, erwiesen sie sich als wichtige Regulatoren der LPS-induzierte Ca^{2+} -Inhibition in den DRG-Neuronen.

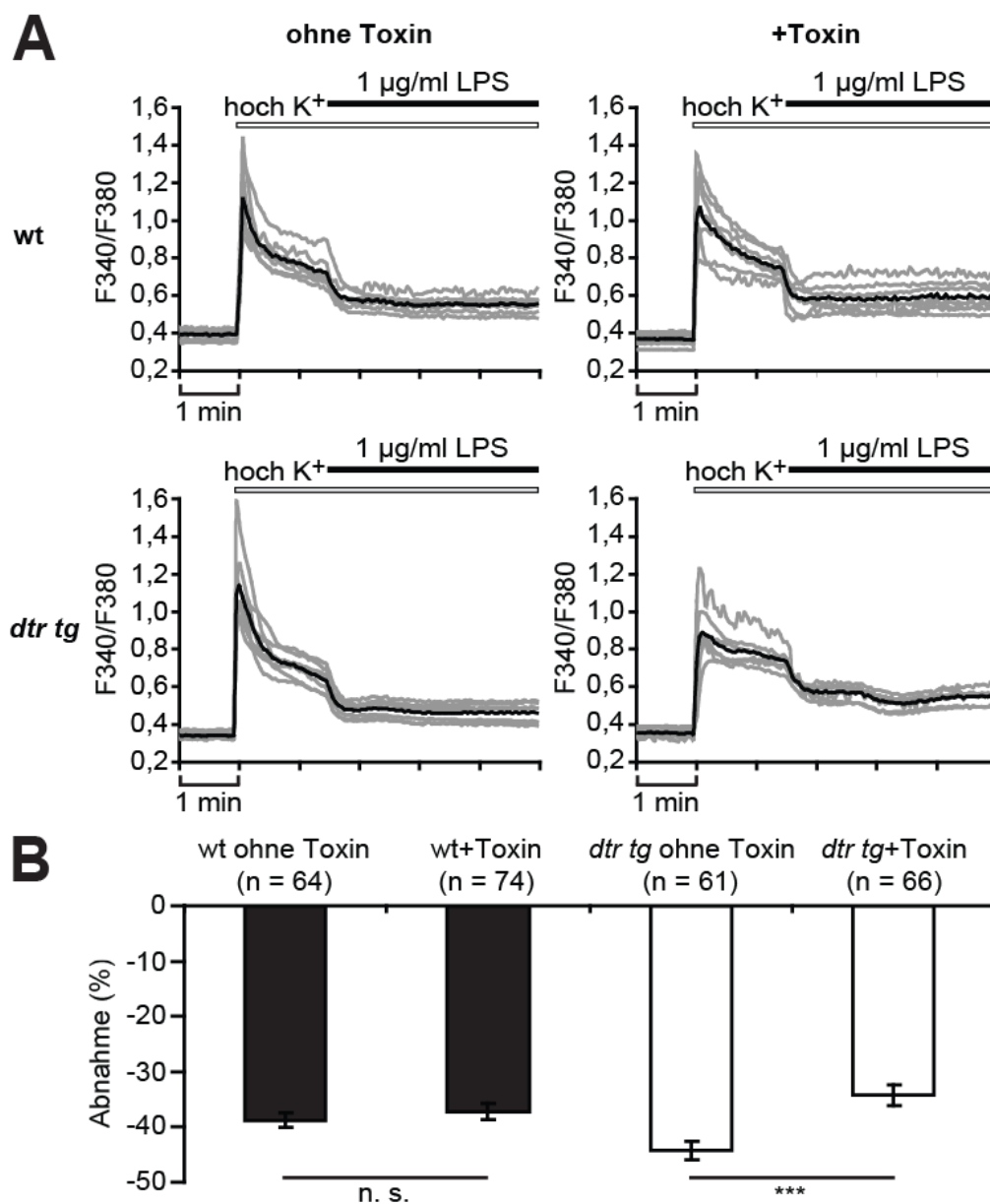


Abbildung 65: Mikroglia/Makrophagen regulieren die LPS-induzierte Ca^{2+} -Inhibition in DRG-Neuronen

DRG-Kulturen aus Diphtherietoxinrezeptor exprimierenden Tieren und Wildtyp Kontrollen wurden für 4 Tage mit Vehikel oder 100 ng/ml Diphtherietoxin inkubiert. (A) Repräsentative Aufnahmen der Ca^{2+} -Signale von Einzelzellen sind in grau sowie ihre Mittelwerte in schwarz gezeigt. (B) Statistische Analyse der Ca^{2+} -Inhibitionen mit und ohne Toxinbehandlung. *** $p \leq 0,001$. n. s. = nicht signifikant.

4 Diskussion

Toll-like Rezeptoren (TLRs), wichtige Komponenten der angeborenen Immunität, werden hauptsächlich in den myeloiden Zellen, Makrophagen und Mikroglia, exprimiert (Ozinsky et al., 2000; Bsibsi et al., 2002). Jedoch mehren sich die Hinweise, dass bestimmte TLRs auch in weiteren Zelltypen des zentralen und peripheren Nervensystems wie Astrozyten, Oligodendrozyten oder Schwann-Zellen exprimiert werden (Bsibsi et al., 2002, Bowman et al., 2003). Die Charakterisierung der TLRs-Expression in Neuronen führt endgültig zum Umdenken in der traditionellen Sichtweise, in dem die myeloiden Zellen in erster Linie agieren (Ochoa-Cortes et al., 2010; Qi et al., 2011). Vielmehr bestehen Reaktionen der angeborenen Immunität aus komplexen Abläufen, in denen verschiedene Zelltypen kooperieren und gemeinsam den Organismus gegen eindringende Pathogene verteidigen.

LPS, Membranbestandteile gramnegativer Bakterien, wird in vielen pathogenen Vorgängen eine Rolle in der Modulation von Ca^{2+} - und K^{+} -Kanälen zugeordnet. Jedoch bleiben die zugrundeliegenden Mechanismen weitestgehend unentschlüsselt. Ferner ist in den meisten Fällen unklar, ob neuronal exprimierte TLRs in diesen Ereignissen involviert sind. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kinetik der neuronalen Ca^{2+} -Reaktion nach LPS-Applikation detailliert charakterisiert. LPS induzierte eine Inhibition der Ca^{2+} -Signalübertragung, die innerhalb von Sekunden und ausschließlich in depolarisierten Neuronen hervorgerufen wurde. Während die Stärke der Inhibition positiv mit der eingesetzten LPS-Konzentration korrelierte, blieb die Kinetik konstant. Dieser Effekt wurde durch TLR4, einen Rezeptor der angeborenen Immunität, vermittelt und erfolgte unabhängig von dessen Corezeptor CD14 und dem LPS-Transportprotein LBP. Unter Verwendung weiterer *knock out* Mausmodelle wurde festgestellt, dass die zelluläre Ca^{2+} -Reaktion in *myd88*-defizienten DRG-Neuronen im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen unverändert blieb. In *trif*-defizienten DRG-Neuronen jedoch war der Effekt des LPS signifikant geschwächt. Somit nutzt die LPS-induzierte Ca^{2+} -Inhibition nicht den MyD88-abhängigen, sondern einzig den MyD88-unabhängigen/TRIF-abhängigen Signalweg des TLR4.

Die Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nimmt eine entscheidende Rolle in der Funktionalität von Neuronen ein, da die Freisetzung von Neurotransmittern an den Synapsen, Kontraktion aller Muskelzellen und die Initiation oder Modulation weiterer Signalübertragungsprozessen davon abhängen. Bereits zuvor wurde in einigen Studien eine direkte Assoziation der TLRs und dessen Liganden mit der Ca^{2+} -Homöostase erörtert. In Endothelzellen beispielsweise leitet LPS in Abhängigkeit von TLR4 einen Ca^{2+} -Einstrom über *transient receptor potential canonical channel 6* (TRPC6) ein (Tauseef et al., 2012). In

sensorischen Neuronen des Nervus trigeminus wird der Ionenkanal *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1) durch LPS über Aktivierung des TLR4 sensibilisiert (Diogenes et al., 2011). Außerdem ist aus Untersuchungen über das Schmerzempfinden mittels Neuronen aus den Spinalganglion bekannt, dass eine Aktivierung der TLR-Rezeptoren 3, 7 und 9 den Ca^{2+} -Influx über TRPV1 verstärkt (Qi et al., 2011). Im Gegensatz zu diesen Studien, die eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch die Präsenz von LPS nahelegen, wurde in dieser Arbeit eine rapide Verminderung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels nach LPS-Applikation registriert. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen aus anderen Arbeiten kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die verwendeten Neuronen aus anderen Studien mit LPS oder weiteren TLR-Liganden für einige Minuten bis hin zu 16 Stunden präinkubiert wurden, bevor eine Evaluation der Effekte stattfand. Die hier beobachtete akute Inhibition der Ca^{2+} -Signalübertragung stellt einen möglichen Schutzmechanismus dar, um unter pathogenen Bedingungen unkontrollierte Aktivitäten geschädigter Neuronen zu minimieren.

Neben Neuronen enthalten Spinalganglion Satellitenzellen und Schwann-Zellen, in denen bislang die Expression von TLR4 nicht nachgewiesen wurde. Außerdem kann die Präsenz von Mikroglia/Makrophagen nicht ausgeschlossen werden. Um die Möglichkeit zu testen, inwiefern weitere Zelltypen die LPS-induzierte Ca^{2+} -Inhibition in DRG-Neuronen mitregulieren, wurden Neuronen mit defektem TLR4 mit Wildtyp-Zellen gemeinsam kultiviert. In dieser Konstellation konnte die LPS-induzierte Ca^{2+} -Inhibition in Neuronen mit defektem TLR4 teilweise wiederhergestellt werden, welche wiederum auf eine Beteiligung umgebender nichtneuronaler Zellen deutete. In weiterführenden Experimenten wurde mittels Immunfluoreszenz eine natürliche Präsenz von Mikroglia/Makrophagen in DRG-Kulturen bestätigt. Zellen aus Spinalganglien von Diphtherietoxinrezeptor (DTR) transgenen Mäusen wurden kultiviert, die DTR unter der Kontrolle des CD11b-Promotors spezifisch in der myeloiden Zelllinie exprimieren. Behandlung mit dem Diphtherietoxin reduzierte die Anzahl der Mikroglia/Makrophagen auf ein Minimum, ohne die Neuronen zu beeinträchtigen. In der Tat wurde ein signifikanter Rückgang der LPS-induzierten Ca^{2+} -Inhibition nach Eliminierung der myeloiden Zellen verzeichnet. Über welchen molekularen Mechanismus Mikroglia/Makrophagen (beispielsweise durch direkte Zell-Zell-Interaktion oder mittels Freisetzung einer bestimmten chemischen Substanz) die neuronale Ca^{2+} -Reaktion auf LPS steuern, muss in künftigen Experimenten aufgeklärt werden. Eine Kooperation von Neuronen und Leukozyten beschreibt einen neuen Aspekt in der angeborenen Immunität, der künftig therapeutische Relevanz verspricht.

Literaturverzeichnis

- Aarum J, Sandberg K, Haeberlein SL, Persson MA. Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(26):15983-8.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*. 2007;10(12):1538-43.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499-511.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000;21(3):383-421.
- Akiyama H, Kondo H, Ikeda K, Arai T, Kato M, McGleer PL. Immunohistochemical detection of coagulation factor XIIIa in postmortem human brain tissue. *Neurosci Lett*. 1995;202(1-2):29-32.
- Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):270-9.
- Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat*. 1995;8(6):429-31.
- Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, et al. Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(38):13461-6.
- Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*. 1985;42(3):791-8.
- Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia LC, Cracchiolo JR, et al. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience*. 2006;142(4):941-52.
- Authier F, Cameron PH, Taupin V. Association of insulin-degrading enzyme with a 70 kDa cytosolic protein in hepatoma cells. *Biochem J*. 1996;319 (Pt 1):149-58.
- Backstrom JR, Lim GP, Cullen MJ, Tokes ZA. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J Neurosci*. 1996;16(24):7910-9.
- Baig S, Kehoe PG, Love S. MMP-2, -3 and -9 levels and activity are not related to A β load in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2008;34(2):205-15.
- Bang OY, Hong HS, Kim DH, Kim H, Boo JH, Huh K, et al. Neuroprotective effect of genistein against beta amyloid-induced neurotoxicity. *Neurobiol Dis*. 2004;16(1):21-8.
- Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1979;93(1):74-104.
- Barnholz Y, Roitman A, Gatt S. Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. II. Hydrolysis of sphingomyelin by an enzyme from rat brain. *J Biol Chem*. 1966;241(16):3731-7.

- Beck A, Penner R, Fleig A. Lipopolysaccharide-induced down-regulation of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ currents (I CRAC) but not Ca²⁺-activated TRPM4-like currents (I CAN) in cultured mouse microglial cells. *J Physiol*. 2008;586(2):427-39.
- Becker CG, Schweitzer J, Feldner J, Becker T, Schachner M. Tenascin-R as a repellent guidance molecule for developing optic axons in zebrafish. *J Neurosci*. 2003;23(15):6232-7.
- Ben Halima S, Rajendran L. Membrane anchored and lipid raft targeted beta-secretase inhibitors for Alzheimer's disease therapy. *J Alzheimers Dis*. 2011;24 Suppl 2:143-52.
- Bertram L, Tanzi RE. The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients? *Pharmacol Res*. 2004;50(4):385-96.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006;368(9533):387-403.
- Boisse L, Mouihate A, Ellis S, Pittman QJ. Long-term alterations in neuroimmune responses after neonatal exposure to lipopolysaccharide. *J Neurosci*. 2004;24(21):4928-34.
- Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, et al. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*. 1996;17(5):1005-13.
- Bourdon MA, Wikstrand CJ, Furthmayr H, Matthews TJ, Bigner DD. Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1983;43(6):2796-805.
- Bouwstra JA, Gooris GS, Dubbelaar FE, Weerheim AM, Ijzerman AP, Ponc M. Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J Lipid Res*. 1998;39(1):186-96.
- Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I. Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia*. 2003;43(3):281-91.
- Bristow J, Tee MK, Gitelman SE, Mellon SH, Miller WL. Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B. *J Cell Biol*. 1993;122(1):265-78.
- Brodkey JA, Laywell ED, O'Brien TF, Faissner A, Stefansson K, Dorries HU, et al. Focal brain injury and upregulation of a developmentally regulated extracellular matrix protein. *J Neurosurg*. 1995;82(1):106-12.
- Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *J Vis Exp*. 2011(53).
- Brown DA, London E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*. 2000;275(23):17221-4.
- Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002;61(11):1013-21.
- Cagnin A, Kassiou M, Meikle SR, Banati RB. Positron emission tomography imaging of neuroinflammation. *Neurotherapeutics*. 2007;4(3):443-52.
- Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, et al. BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci*. 2001;4(3):233-4.
- Cai XD, Golde TE, Younkin SG. Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science*. 1993;259(5094):514-6.
- Cameron B, Landreth GE. Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2010;37(3):503-9.

- Cao X, Sudhof TC. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*. 2001;293(5527):115-20.
- Chan ED, Riches DW. IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280(3):C441-50.
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev*. 2007;53(2):344-54.
- Chang RC, Hudson PM, Wilson BC, Liu B, Abel H, Hong JS. High concentrations of extracellular potassium enhance bacterial endotoxin lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in glia-neuron mixed cultures. *Neuroscience*. 2000;97(4):757-64.
- Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, et al. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature*. 1991;353(6347):844-6.
- Chen CC, Wang JK. p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Mol Pharmacol*. 1999;55(3):481-8.
- Cheng Y, Nilsson A, Tomquist E, Duan RD. Purification, characterization, and expression of rat intestinal alkaline sphingomyelinase. *J Lipid Res*. 2002;43(2):316-24.
- Chevalier X, Claudopierre P, Groult N, Godeau GJ. Influence of interleukin 1 beta on tenascin distribution in human normal and osteoarthritic cartilage: a quantitative immunohistochemical study. *Ann Rheum Dis*. 1996;55(10):772-5.
- Chiquet-Ehrismann R. Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(6):986-90.
- Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M. Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol*. 2003;200(4):488-99.
- Chiquet-Ehrismann R, Kalla P, Pearson CA, Beck K, Chiquet M. Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell*. 1988;53(3):383-90.
- Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T. Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell*. 1986;47(1):131-9.
- Chiquet M, Fambrough DM. Chick myotendinous antigen. II. A novel extracellular glycoprotein complex consisting of large disulfide-linked subunits. *J Cell Biol*. 1984;98(6):1937-46.
- Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, et al. Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem*. 2001;276(24):21562-70.
- Cifuentes-Diaz C, Velasco E, Meunier FA, Goudou D, Belkadi L, Faille L, et al. The peripheral nerve and the neuromuscular junction are affected in the tenascin-C-deficient mouse. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1998;44(2):357-79.
- Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, et al. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci*. 2005;8(1):79-84.
- Colton CA, Mott RT, Sharpe H, Xu Q, Van Nostrand WE, Vitek MP. Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *J Neuroinflammation*. 2006;3:27.
- Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci*. 2001;21(4):1179-88.

- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Jr., et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* 1994;7(2):180-4.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 1993;261(5123):921-3.
- Crocker B, Crozat K, Berger M, Xia Y, Sovath S, Schaffer L, et al. ATP-sensitive potassium channels mediate survival during infection in mammals and insects. *Nat Genet.* 2007;39(12):1453-60.
- Cummings JL. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2004;351(1):56-67.
- Cummings JL, Cole G. Alzheimer disease. *JAMA.* 2002;287(18):2335-8.
- Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, et al. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(7):2070-5.
- Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Jr., Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem.* 2002;277(35):32046-53.
- De Strooper B. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron.* 2003;38(1):9-12.
- Deane R, Du Yan S, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, et al. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med.* 2003;9(7):907-13.
- DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol.* 1990;27(5):457-64.
- Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta ES. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science.* 2005;307(5715):1630-4.
- Diogenes A, Ferraz CC, Akopian AN, Henry MA, Hargreaves KM. LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons. *J Dent Res.* 2011;90(6):759-64.
- Dudal S, Krzywkowski P, Paquette J, Morissette C, Lacombe D, Tremblay P, et al. Inflammation occurs early during the A β deposition process in TgCRND8 mice. *Neurobiol Aging.* 2004;25(7):861-71.
- Dunzendorfer S, Lee HK, Soldau K, Tobias PS. Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses. *FASEB J.* 2004;18(10):1117-9.
- Eckman EA, Adams SK, Troendle FJ, Stodola BA, Kahn MA, Fauq AH, et al. Regulation of steady-state beta-amyloid levels in the brain by neprilysin and endothelin-converting enzyme but not angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem.* 2006;281(41):30471-8.
- Eckman EA, Reed DK, Eckman CB. Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem.* 2001;276(27):24540-8.
- Edelmann B, Bertsch U, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Perrotta C, Jakob M, et al. Caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in TNF-R1 receptors. *EMBO J.* 2011;30(2):379-94.
- Edison P, Archer HA, Gerhard A, Hinz R, Pavese N, Turkheimer FE, et al. Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: An [11C](R)PK11195-PET and [11C]PIB-PET study. *Neurobiol Dis.* 2008;32(3):412-9.
- Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol.* 2003;160(1):113-23.

- El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature*. 1996;382(6593):716-9.
- El Khoury JB, Moore KJ, Means TK, Leung J, Terada K, Toft M, et al. CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J Exp Med*. 2003;197(12):1657-66.
- Elefteriou F, Exposito JY, Garrone R, Lethias C. Cell adhesion to tenascin-X mapping of cell adhesion sites and identification of integrin receptors. *Eur J Biochem*. 1999;263(3):840-8.
- Erickson HP. Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr Opin Cell Biol*. 1993;5(5):869-76.
- Erickson HP, Bourdon MA. Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Annu Rev Cell Biol*. 1989;5:71-92.
- Erickson HP, Inglesias JL. A six-armed oligomer isolated from cell surface fibronectin preparations. *Nature*. 1984;311(5983):267-9.
- Evers MR, Salmen B, Bukalo O, Rollenhagen A, Bosl MR, Morellini F, et al. Impairment of L-type Ca²⁺ channel-dependent forms of hippocampal synaptic plasticity in mice deficient in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-C. *J Neurosci*. 2002;22(16):7177-94.
- Exley C, Korchazhkina OV. Plasmin cleaves Abeta42 in vitro and prevents its aggregation into beta-pleated sheet structures. *Neuroreport*. 2001;12(13):2967-70.
- Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):4162-7.
- Fassbender K, Walter S, Kuhl S, Landmann R, Ishii K, Bertsch T, et al. The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2004;18(1):203-5.
- Feng Y, Li L, Sun XH. Monocytes and Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*. 2011;27(2):115-22.
- Ferlinz K, Hurwitz R, Moczall H, Lansmann S, Schuchman EH, Sandhoff K. Functional characterization of the N-glycosylation sites of human acid sphingomyelinase by site-directed mutagenesis. *Eur J Biochem*. 1997;243(1-2):511-7.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005;366(9503):2112-7.
- Fiala M, Lin J, Ringman J, Kermani-Arab V, Tsao G, Patel A, et al. Ineffective phagocytosis of amyloid-beta by macrophages of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis*. 2005;7(3):221-32; discussion 55-62.
- Filippov V, Song MA, Zhang K, Vinters HV, Tung S, Kirsch WM, et al. Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis*. 2012;29(3):537-47.
- Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*. 2001;413(6851):78-83.
- Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, et al. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*. 2003;198(7):1043-55.
- Floden AM, Combs CK. Beta-amyloid stimulates murine postnatal and adult microglia cultures in a unique manner. *J Neurosci*. 2006;26(17):4644-8.
- Forsberg E, Hirsch E, Frohlich L, Meyer M, Ekblom P, Aszodi A, et al. Skin wounds and severed nerves heal normally in mice lacking tenascin-C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(13):6594-9.

- Franberg J, Welander H, Aoki M, Winblad B, Tjernberg LO, Frykman S. Rat brain gamma-secretase activity is highly influenced by detergents. *Biochemistry*. 2007;46(25):7647-54.
- Fukamauchi F, Mataga N, Wang YJ, Sato S, Youshiki A, Kusakabe M. Abnormal behavior and neurotransmissions of tenascin gene knockout mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;221(1):151-6.
- Fumagalli M, Lecca D, Abbracchio MP. Role of purinergic signalling in neuro-immune cells and adult neural progenitors. *Front Biosci*. 2011;16:2326-41.
- Galic MA, Riazi K, Heida JG, Mouihate A, Fournier NM, Spencer SJ, et al. Postnatal inflammation increases seizure susceptibility in adult rats. *J Neurosci*. 2008;28(27):6904-13.
- Gamerding M, Clement AB, Behl C. Effects of sulindac sulfide on the membrane architecture and the activity of gamma-secretase. *Neuropharmacology*. 2008;54(6):998-1005.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*. 1995;373(6514):523-7.
- Gengler S, Hamilton A, Holscher C. Synaptic plasticity in the hippocampus of a APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease is impaired in old but not young mice. *PLoS One*. 2010;5(3):e9764.
- Gerth A, Grosche J, Nieber K, Hauschildt S. Intracellular LPS inhibits the activity of potassium channels and fails to activate NFkappaB in human macrophages. *J Cell Physiol*. 2005;202(2):442-52.
- Geula C, Wu CK, Saroff D, Lorenzo A, Yuan M, Yankner BA. Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med*. 1998;4(7):827-31.
- Ghosh N, Sabbadini R, Chatterjee S. Identification, partial purification, and localization of a neutral sphingomyelinase in rabbit skeletal muscle: neutral sphingomyelinase in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem*. 1998;189(1-2):161-8.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991;349(6311):704-6.
- Goethals S, Ydens E, Timmerman V, Janssens S. Toll-like receptor expression in the peripheral nerve. *Glia*. 2010;58(14):1701-9.
- Goh FG, Piccinini AM, Krausgruber T, Udalova IA, Midwood KS. Transcriptional regulation of the endogenous danger signal tenascin-C: a novel autocrine loop in inflammation. *J Immunol*. 2010;184(5):2655-62.
- Goni FM, Alonso A. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett*. 2002;531(1):38-46.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(12):953-64.
- Grassme H, Jekle A, Riehle A, Schwarz H, Berger J, Sandhoff K, et al. CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem*. 2001;276(23):20589-96.
- Grassme H, Jendrossek V, Riehle A, von Kurthy G, Berger J, Schwarz H, et al. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med*. 2003;9(3):322-30.
- Grathwohl SA, Kalin RE, Bolmont T, Prokop S, Winkelmann G, Kaeser SA, et al. Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia. *Nat Neurosci*. 2009;12(11):1361-3.
- Grimm MO, Kuchenbecker J, Grosgen S, Burg VK, Hundsdorfer B, Rothhaar TL, et al. Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms. *J Biol Chem*. 2011;286(16):14028-39.

- Grimm MO, Rothhaar TL, Grosgen S, Burg VK, Hundsdorfer B, Hauptenthal VJ, et al. Trans fatty acids enhance amyloidogenic processing of the Alzheimer amyloid precursor protein (APP). *J Nutr Biochem*. 2012;23(10):1214-23.
- Grumet M, Hoffman S, Crossin KL, Edelman GM. Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(23):8075-9.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985;260(6):3440-50.
- Gu M, Kerwin JL, Watts JD, Aebersold R. Ceramide profiling of complex lipid mixtures by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem*. 1997;244(2):347-56.
- Gutowski NJ, Newcombe J, Cuzner ML. Tenascin-R and C in multiple sclerosis lesions: relevance to extracellular matrix remodelling. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1999;25(3):207-14.
- Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med*. 2000;192(4):595-600.
- Halfter W, Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP. The effect of tenascin and embryonic basal lamina on the behavior and morphology of neural crest cells in vitro. *Dev Biol*. 1989;132(1):14-25.
- Hall AM, Roberson ED. Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*. 2012;88(1):3-12.
- Han X, D MH, McKeel DW, Jr., Kelley J, Morris JC. Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J Neurochem*. 2002;82(4):809-18.
- Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(2):139-50.
- Hao W, Liu Y, Liu S, Walter S, Grimm MO, Kiliaan AJ, et al. Myeloid differentiation factor 88-deficient bone marrow cells improve Alzheimer's disease-related symptoms and pathology. *Brain*. 2011;134(Pt 1):278-92.
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002;297(5580):353-6.
- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992;256(5054):184-5.
- Harper JD, Wong SS, Lieber CM, Lansbury PT, Jr. Assembly of A beta amyloid protofibrils: an in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease. *Biochemistry*. 1999;38(28):8972-80.
- Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, et al. Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci*. 1999;19(20):8876-84.
- Hartmann T, Bieger SC, Bruhl B, Tienari PJ, Ida N, Allsop D, et al. Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med*. 1997;3(9):1016-20.
- Hashimoto M, Katakura M, Hossain S, Rahman A, Shimada T, Shido O. Docosahexaenoic acid withstands the A beta(25-35)-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *J Nutr Biochem*. 2011;22(1):22-9.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001;410(6832):1099-103.
- Hayashi M, Luo Y, Laning J, Strieter RM, Dorf ME. Production and function of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines in murine glial cells. *J Neuroimmunol*. 1995;60(1-2):143-50.

- He P, Zhong Z, Lindholm K, Berning L, Lee W, Lemere C, et al. Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid beta generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice. *J Cell Biol.* 2007;178(5):829-41.
- He X, Huang Y, Li B, Gong CX, Schuchman EH. Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2010;31(3):398-408.
- Hebert SS, Serneels L, Tolia A, Craessaerts K, Derks C, Filippov MA, et al. Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. *EMBO Rep.* 2006;7(7):739-45.
- Hellstrom-Lindahl E, Ravid R, Nordberg A. Age-dependent decline of neprilysin in Alzheimer's disease and normal brain: inverse correlation with A beta levels. *Neurobiol Aging.* 2008;29(2):210-21.
- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol.* 2002;3(2):196-200.
- Hemming ML, Selkoe DJ. Amyloid beta-protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor. *J Biol Chem.* 2005;280(45):37644-50.
- Herz J, Pardo J, Kashkar H, Schramm M, Kuzmenkina E, Bos E, et al. Acid sphingomyelinase is a key regulator of cytotoxic granule secretion by primary T lymphocytes. *Nat Immunol.* 2009;10(7):761-8.
- Hickey WF, Kimura H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science.* 1988;239(4837):290-2.
- Hickman SE, Allison EK, El Khoury J. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci.* 2008;28(33):8354-60.
- Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology.* 2007;68(5):326-37.
- Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabet K, Kim SO, et al. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature.* 2003;424(6950):743-8.
- Holmes O, Paturi S, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ. Effects of membrane lipids on the activity and processivity of purified gamma-secretase. *Biochemistry.* 2012;51(17):3565-75.
- Hornig T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature.* 2002;420(6913):329-33.
- Hornig T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol.* 2001;2(9):835-41.
- Hossain S, Hashimoto M, Katakura M, Miwa K, Shimada T, Shido O. Mechanism of docosahexaenoic acid-induced inhibition of in vitro Abeta1-42 fibrillation and Abeta1-42-induced toxicity in SH-S5Y5 cells. *J Neurochem.* 2009;111(2):568-79.
- Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, et al. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(6):3228-33.
- Hsia HC, Schwarzbauer JE. Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. *J Biol Chem.* 2005;280(29):26641-4.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science.* 1996;274(5284):99-102.

- Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, et al. AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron*. 2006;52(5):831-43.
- Hu P, McLachlan EM. Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat. *Neuroscience*. 2002;112(1):23-38.
- Huang Y, Tanimukai H, Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX. Elevation of the level and activity of acid ceramidase in Alzheimer's disease brain. *Eur J Neurosci*. 2004;20(12):3489-97.
- Hung LW, Ciccotosto GD, Giannakis E, Tew DJ, Perez K, Masters CL, et al. Amyloid-beta peptide (Abeta) neurotoxicity is modulated by the rate of peptide aggregation: Abeta dimers and trimers correlate with neurotoxicity. *J Neurosci*. 2008;28(46):11950-8.
- Hur JY, Welander H, Behbahani H, Aoki M, Franberg J, Winblad B, et al. Active gamma-secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain. *FEBS J*. 2008;275(6):1174-87.
- in 't Veld BA, Ruitenbergh A, Hofman A, Launer LJ, van Duijn CM, Stijnen T, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2001;345(21):1515-21.
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, et al. Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science*. 2001;292(5521):1550-2.
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*. 1994;13(1):45-53.
- Jana M, Palencia CA, Pahan K. Fibrillar amyloid-beta peptides activate microglia via TLR2: implications for Alzheimer's disease. *J Immunol*. 2008;181(10):7254-62.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
- Jenkins RW, Canals D, Hannun YA. Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cell Signal*. 2009;21(6):836-46.
- Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. Statins and the risk of dementia. *Lancet*. 2000;356(9242):1627-31.
- Joester A, Faissner A. Evidence for combinatorial variability of tenascin-C isoforms and developmental regulation in the mouse central nervous system. *J Biol Chem*. 1999;274(24):17144-51.
- Joester A, Faissner A. The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biol*. 2001;20(1):13-22.
- Johnson GB, Brunn GJ, Platt JL. Cutting edge: an endogenous pathway to systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions through Toll-like receptor 4. *J Immunol*. 2004;172(1):20-4.
- Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn*. 2000;218(2):235-59.
- Jones PL, Jones FS. Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. *Matrix Biol*. 2000;19(7):581-96.
- Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*. 2012;488(7409):96-9.
- Kaether C, Haass C, Steiner H. Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neurodegener Dis*. 2006;3(4-5):275-83.

- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, et al. APP processing and synaptic function. *Neuron*. 2003;37(6):925-37.
- Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Asano T, Matsui Y, Nakayama Y, et al. Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis. *J Immunol*. 2009;182(12):8015-25.
- Kane GC, Lam CF, O'Coilain F, Hodgson DM, Reyes S, Liu XK, et al. Gene knockout of the KCNJ8-encoded Kir6.1 K(ATP) channel imparts fatal susceptibility to endotoxemia. *FASEB J*. 2006;20(13):2271-80.
- Kanemitsu H, Tomiyama T, Mori H. Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci Lett*. 2003;350(2):113-6.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987;325(6106):733-6.
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 1999;11(1):115-22.
- Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol*. 2001;167(10):5887-94.
- Kawano H, Ohyama K, Kawamura K, Nagatsu I. Migration of dopaminergic neurons in the embryonic mesencephalon of mice. *Brain Res Dev Brain Res*. 1995;86(1-2):101-13.
- Kinoshita A, Fukumoto H, Shah T, Whelan CM, Irizarry MC, Hyman BT. Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 16):3339-46.
- Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal*. 2008;20(6):1010-8.
- Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hanninen T, Hallikainen M, Alhainen K, et al. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ*. 2001;322(7300):1447-51.
- Klegeris A, Walker DG, McGeer PL. Interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide with the human monocytic cell line THP-1 results in a protein kinase C-dependent secretion of tumor necrosis factor-alpha. *Brain Res*. 1997;747(1):114-21.
- Klyubin I, Betts V, Welzel AT, Blenow K, Zetterberg H, Wallin A, et al. Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J Neurosci*. 2008;28(16):4231-7.
- Klyubin I, Cullen WK, Hu NW, Rowan MJ. Alzheimer's disease Abeta assemblies mediating rapid disruption of synaptic plasticity and memory. *Mol Brain*. 2012;5:25.
- Klyubin I, Walsh DM, Lemere CA, Cullen WK, Shankar GM, Betts V, et al. Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat Med*. 2005;11(5):556-61.
- Kogel D, Deller T, Behl C. Roles of amyloid precursor protein family members in neuroprotection, stress signaling and aging. *Exp Brain Res*. 2012;217(3-4):471-9.
- Koistinaho M, Koistinaho J. Role of p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in microglia. *Glia*. 2002;40(2):175-83.
- Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(10):5815-20.

- Koo EH, Squazzo SL. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem*. 1994;269(26):17386-9.
- Kornfeld S. Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB J*. 1987;1(6):462-8.
- Kornhuber J, Medlin A, Bleich S, Jendrossek V, Henkel AW, Wiltfang J, et al. High activity of acid sphingomyelinase in major depression. *J Neural Transm*. 2005;112(11):1583-90.
- Kruse J, Keilhauer G, Faissner A, Timpl R, Schachner M. The J1 glycoprotein--a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family. *Nature*. 1985;316(6024):146-8.
- Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, et al. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J*. 2010;29(17):3020-32.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(7):499-509.
- Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, He K, Melnikova T, et al. BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci*. 2005;25(50):11693-709.
- Lansbury PT, Lashuel HA. A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature*. 2006;443(7113):774-9.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*. 1990;39(1):151-70.
- Lee SF, Shah S, Li H, Yu C, Han W, Yu G. Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid-beta precursor protein and Notch. *J Biol Chem*. 2002;277(47):45013-9.
- Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X, et al. Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron*. 2003;40(6):1087-93.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;86(6):973-83.
- Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*. 2006;440(7082):352-7.
- Letiembre M, Liu Y, Walter S, Hao W, Pfander T, Wrede A, et al. Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: a similar pattern. *Neurobiol Aging*. 2009;30(5):759-68.
- Levade T, Salvayre R, Maret A, Douste-Blazy L. Evidence for both endogenous and exogenous sources of the sphingomyelin storage in lymphoid cell lines from patients with Niemann-Pick disease types A and B. *J Inherit Metab Dis*. 1988;11(2):151-7.
- Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, et al. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*. 1990;248(4959):1124-6.
- Lichtenthaler SF. Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem*. 2011;116(1):10-21.

- Lim GP, Yang F, Chu T, Chen P, Beech W, Teter B, et al. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2000;20(15):5709-14.
- Liu B, Hannun YA. Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione. *J Biol Chem*. 1997;272(26):16281-7.
- Liu B, Hannun YA. Purification of rat brain membrane neutral sphingomyelinase. *Methods Enzymol*. 2000;311:156-64.
- Liu S, Liu Y, Hao W, Wolf L, Kiliaan AJ, Penke B, et al. TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid beta peptide to trigger neuroinflammatory activation. *J Immunol*. 2012;188(3):1098-107.
- Liu Y, Walter S, Stagi M, Cherny D, Letiembre M, Schulz-Schaeffer W, et al. LPS receptor (CD14): a receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. *Brain*. 2005;128(Pt 8):1778-89.
- Lorenzen A, Samosh J, Vandewark K, Anborgh PH, Seah C, Magalhaes AC, et al. Rapid and direct transport of cell surface APP to the lysosome defines a novel selective pathway. *Mol Brain*. 2010;3:11.
- Lorenzo A, Yankner BA. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(25):12243-7.
- Lorton D, Kocsis JM, King L, Madden K, Brunden KR. beta-Amyloid induces increased release of interleukin-1 beta from lipopolysaccharide-activated human monocytes. *J Neuroimmunol*. 1996;67(1):21-9.
- Lotz MM, Burdsal CA, Erickson HP, McClay DR. Cell adhesion to fibronectin and tenascin: quantitative measurements of initial binding and subsequent strengthening response. *J Cell Biol*. 1989;109(4 Pt 1):1795-805.
- Lue LF, Brachova L, Civin WH, Rogers J. Inflammation, A beta deposition, and neurofibrillary tangle formation as correlates of Alzheimer's disease neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996;55(10):1083-8.
- Lue LF, Rydel R, Brigham EF, Yang LB, Hampel H, Murphy GM, Jr., et al. Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia*. 2001;35(1):72-9.
- Lue LF, Walker DG, Brachova L, Beach TG, Rogers J, Schmidt AM, et al. Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. *Exp Neurol*. 2001;171(1):29-45.
- Luo WJ, Wang H, Li H, Kim BS, Shah S, Lee HJ, et al. PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem*. 2003;278(10):7850-4.
- Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, et al. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci*. 2001;4(3):231-2.
- Lutter D, Ugocsai P, Grandl M, Orso E, Theis F, Lang EW, et al. Analyzing M-CSF dependent monocyte/macrophage differentiation: expression modes and meta-modes derived from an independent component analysis. *BMC Bioinformatics*. 2008;9:100.
- Mackie EJ. Molecules in focus: tenascin-C. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29(10):1133-7.
- Maier M, Peng Y, Jiang L, Seabrook TJ, Carroll MC, Lemere CA. Complement C3 deficiency leads to accelerated amyloid beta plaque deposition and neurodegeneration and modulation of the microglia/macrophage phenotype in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci*. 2008;28(25):6333-41.
- Mao JR, Taylor G, Dean WB, Wagner DR, Afzal V, Lotz JC, et al. Tenascin-X deficiency mimics Ehlers-Danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition. *Nat Genet*. 2002;30(4):421-5.

- Maor I, Mandel H, Aviram M. Macrophage uptake of oxidized LDL inhibits lysosomal sphingomyelinase, thus causing the accumulation of unesterified cholesterol-sphingomyelin-rich particles in the lysosomes. A possible role for 7-Ketocholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(9):1378-87.
- Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:451-83.
- Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW, Jr., et al. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology.* 2001;56(1):127-9.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(12):4245-9.
- Matsuda A, Yoshiki A, Tagawa Y, Matsuda H, Kusakabe M. Corneal wound healing in tenascin knockout mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40(6):1071-80.
- Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 2004;430(7000):631-9.
- Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron.* 1993;10(2):243-54.
- Mayeux R, Schupf N. Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: plasma Abeta40 and Abeta42, and genetic variants. *Neurobiol Aging.* 2011;32 Suppl 1:S10-9.
- McAllister C, Long J, Bowers A, Walker A, Cao P, Honda S, et al. Genetic targeting aromatase in male amyloid precursor protein transgenic mice down-regulates beta-secretase (BACE1) and prevents Alzheimer-like pathology and cognitive impairment. *J Neurosci.* 2010;30(21):7326-34.
- McGeer PL, McGeer EG. NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging.* 2007;28(5):639-47.
- McGovern MM, Aron A, Brodie SE, Desnick RJ, Wasserstein MP. Natural history of Type A Niemann-Pick disease: possible endpoints for therapeutic trials. *Neurology.* 2006;66(2):228-32.
- McGovern MM, Wasserstein MP, Giugliani R, Bembi B, Vanier MT, Mengel E, et al. A prospective, cross-sectional survey study of the natural history of Niemann-Pick disease type B. *Pediatrics.* 2008;122(2):e341-9.
- McGowan E, Pickford F, Kim J, Onstead L, Eriksen J, Yu C, et al. Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron.* 2005;47(2):191-9.
- McLaurin J, Darabie AA, Morrison MR. Cholesterol, a modulator of membrane-associated Abeta-fibrillogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;977:376-83.
- Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L, Jr., Baron P, Villalba M, et al. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature.* 1995;374(6523):647-50.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997;388(6640):394-7.
- Mega MS, Cummings JL, Fiorello T, Gornbein J. The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease. *Neurology.* 1996;46(1):130-5.
- Meier K, Knepel W, Schofl C. Potassium depolarization elevates cytosolic free calcium concentration in rat anterior pituitary cells through 1,4-dihydropyridine-sensitive, omega-conotoxin-insensitive calcium channels. *Endocrinology.* 1988;122(6):2764-70.

- Meng P, Yoshida H, Matsumiya T, Imaizumi T, Tanji K, Xing F, et al. Carnosic acid suppresses the production of amyloid-beta 1-42 by inducing the metalloprotease gene TACE/ADAM17 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurosci Res.* 2013;75(2):94-102.
- Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, Rozkalne A, et al. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature.* 2008;451(7179):720-4.
- Mezghani-Abdelmoula S, Chevalier S, Lesouhaitier O, Orange N, Feuilloley MG, Cazin L. *Pseudomonas fluorescens* lipopolysaccharide inhibits both delayed rectifier and transient A-type K⁺ channels of cultured rat cerebellar granule neurons. *Brain Res.* 2003;983(1-2):185-92.
- Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, et al. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(21):12683-8.
- Midwood K, Sacre S, Piccinini AM, Inglis J, Trebaul A, Chan E, et al. Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med.* 2009;15(7):774-80.
- Mielke MM, Lyketsos CG. Alterations of the sphingolipid pathway in Alzheimer's disease: new biomarkers and treatment targets? *Neuromolecular Med.* 2010;12(4):331-40.
- Miners JS, Baig S, Palmer J, Palmer LE, Kehoe PG, Love S. Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2008;18(2):240-52.
- Mirakhor A, Craig D, Hart DJ, McLlroy SP, Passmore AP. Behavioural and psychological syndromes in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2004;19(11):1035-9.
- Mitrovic N, Schachner M. Detection of tenascin-C in the nervous system of the tenascin-C mutant mouse. *J Neurosci Res.* 1995;42(5):710-7.
- Moehlmann T, Winkler E, Xia X, Edbauer D, Murrell J, Capell A, et al. Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(12):8025-30.
- Moghekar A, Rao S, Li M, Ruben D, Mammen A, Tang X, et al. Large quantities of Abeta peptide are constitutively released during amyloid precursor protein metabolism in vivo and in vitro. *J Biol Chem.* 2011;286(18):15989-97.
- Montag-Sallaz M, Montag D. Severe cognitive and motor coordination deficits in tenascin-R-deficient mice. *Genes Brain Behav.* 2003;2(1):20-31.
- Moscoso LM, Cremer H, Sanes JR. Organization and reorganization of neuromuscular junctions in mice lacking neural cell adhesion molecule, tenascin-C, or fibroblast growth factor-5. *J Neurosci.* 1998;18(4):1465-77.
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, et al. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet.* 1992;1(5):345-7.
- Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science.* 1991;254(5028):97-9.
- Newrzella D, Stoffel W. Functional analysis of the glycosylation of murine acid sphingomyelinase. *J Biol Chem.* 1996;271(50):32089-95.
- Ni X, Morales CR. The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic.* 2006;7(7):889-902.

- Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DD, Tessier-Lavigne M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature*. 2009;457(7232):981-9.
- Nilsson A, Duan RD. Alkaline sphingomyelinases and ceramidases of the gastrointestinal tract. *Chem Phys Lipids*. 1999;102(1-2):97-105.
- O'Leary TP, Brown RE. Visuo-spatial learning and memory deficits on the Barnes maze in the 16-month-old APP^{swE}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. 2009;201(1):120-7.
- Ochoa-Cortes F, Ramos-Lomas T, Miranda-Morales M, Spreadbury I, Ibeakanma C, Barajas-Lopez C, et al. Bacterial cell products signal to mouse colonic nociceptive dorsal root ganglia neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299(3):G723-32.
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2001;276(13):10229-33.
- Okazaki T, Bielawska A, Domae N, Bell RM, Hannun YA. Characteristics and partial purification of a novel cytosolic, magnesium-independent, neutral sphingomyelinase activated in the early signal transduction of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃-induced HL-60 cell differentiation. *J Biol Chem*. 1994;269(6):4070-7.
- Okello A, Edison P, Archer HA, Turkheimer FE, Kennedy J, Bullock R, et al. Microglial activation and amyloid deposition in mild cognitive impairment: a PET study. *Neurology*. 2009;72(1):56-62.
- Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol*. 2004;173(6):3916-24.
- Osenkowski P, Ye W, Wang R, Wolfe MS, Selkoe DJ. Direct and potent regulation of gamma-secretase by its lipid microenvironment. *J Biol Chem*. 2008;283(33):22529-40.
- Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol*. 2003;4(2):161-7.
- Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem*. 2003;278(50):49751-62.
- Oyama F, Sawamura N, Kobayashi K, Morishima-Kawashima M, Kuramochi T, Ito M, et al. Mutant presenilin 2 transgenic mouse: effect on an age-dependent increase of amyloid beta-protein 42 in the brain. *J Neurochem*. 1998;71(1):313-22.
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13766-71.
- Paresce DM, Ghosh RN, Maxfield FR. Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron*. 1996;17(3):553-65.
- Pasternak SH, Bagshaw RD, Guiral M, Zhang S, Ackerley CA, Pak BJ, et al. Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane. *J Biol Chem*. 2003;278(29):26687-94.
- Pauwels K, Williams TL, Morris KL, Jonckheere W, Vandersteen A, Kelly G, et al. Structural basis for increased toxicity of pathological abeta42:abeta40 ratios in Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2012;287(8):5650-60.
- Pearson CA, Pearson D, Shibahara S, Hofsteenge J, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF-beta. *EMBO J*. 1988;7(10):2977-82.

- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22(2):153-83.
- Perry DK. Serine palmitoyltransferase: role in apoptotic de novo ceramide synthesis and other stress responses. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1585(2-3):146-52.
- Persaud-Sawin DA, Lightcap S, Harry GJ. Isolation of rafts from mouse brain tissue by a detergent-free method. *J Lipid Res.* 2009;50(4):759-67.
- Piccinini AM, Midwood KS. Endogenous control of immunity against infection: tenascin-C regulates TLR4-mediated inflammation via microRNA-155. *Cell Rep.* 2012;2(4):914-26.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998;282(5396):2085-8.
- Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, et al. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest.* 2004;113(10):1456-64.
- Puglielli L, Ellis BC, Saunders AJ, Kovacs DM. Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis. *J Biol Chem.* 2003;278(22):19777-83.
- Qi J, Buzas K, Fan H, Cohen JI, Wang K, Mont E, et al. Painful pathways induced by TLR stimulation of dorsal root ganglion neurons. *J Immunol.* 2011;186(11):6417-26.
- Qiu H, Edmunds T, Baker-Malcolm J, Karey KP, Estes S, Schwarz C, et al. Activation of human acid sphingomyelinase through modification or deletion of C-terminal cysteine. *J Biol Chem.* 2003;278(35):32744-52.
- Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, et al. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem.* 1998;273(49):32730-8.
- Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2010;362(4):329-44.
- Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, et al. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* 2006;7(9):940-6.
- Rajendran L, Annaert W. Membrane trafficking pathways in Alzheimer's disease. *Traffic.* 2012;13(6):759-70.
- Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, et al. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(30):11172-7.
- Ranganathan S, Noyes NC, Migliorini M, Winkles JA, Battey FD, Hyman BT, et al. LRAD3, a novel low-density lipoprotein receptor family member that modulates amyloid precursor protein trafficking. *J Neurosci.* 2011;31(30):10836-46.
- Reagan JW, Jr., Hubbert ML, Shelness GS. Posttranslational regulation of acid sphingomyelinase in niemann-pick type C1 fibroblasts and free cholesterol-enriched chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 2000;275(48):38104-10.
- Reed-Geaghan EG, Savage JC, Hise AG, Landreth GE. CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A β -stimulated microglial activation. *J Neurosci.* 2009;29(38):11982-92.
- Rettig WJ, Triche TJ, Garin-Chesa P. Stimulation of human neuronectin secretion by brain-derived growth factors. *Brain Res.* 1989;487(1):171-7.
- Rezai-Zadeh K, Gate D, Town T. CNS infiltration of peripheral immune cells: D-Day for neurodegenerative disease? *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009;4(4):462-75.

- Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(6):429-39.
- Robakis NK, Wisniewski HM, Jenkins EC, Devine-Gage EA, Houck GE, Yao XL, et al. Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome. *Lancet.* 1987;1(8529):384-5.
- Rogers J. The inflammatory response in Alzheimer's disease. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1535-43.
- Rogers J, Lubert-Narod J, Styren SD, Civin WH. Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1988;9(4):339-49.
- Roher AE, Chaney MO, Kuo YM, Webster SD, Stine WB, Haverkamp LJ, et al. Morphology and toxicity of Abeta-(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 1996;271(34):20631-5.
- 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 (TNFalpha)-converting enzyme activity and TNFalpha secretion in macrophages. *J Biol Chem.* 2010;285(27):21103-13.
- Rubin BP, Tucker RP, Martin D, Chiquet-Ehrismann R. Teneurins: a novel family of neuronal cell surface proteins in vertebrates, homologous to the *Drosophila* pair-rule gene product Ten-m. *Dev Biol.* 1999;216(1):195-209.
- Rushworth JV, Griffiths HH, Watt NT, Hooper NM. Prion Protein-mediated Toxicity of Amyloid-beta Oligomers Requires Lipid Rafts and the Transmembrane LRP1. *J Biol Chem.* 2013;288(13):8935-51.
- Saga Y, Yagi T, Ikawa Y, Sakakura T, Aizawa S. Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev.* 1992;6(10):1821-31.
- Saitoh S, Akashi S, Yamada T, Tanimura N, Kobayashi M, Konno K, et al. Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *Int Immunol.* 2004;16(7):961-9.
- Sakai T, Furukawa Y, Chiquet-Ehrismann R, Nakamura M, Kitagawa S, Ikemura T, et al. Tenascin-X expression in tumor cells and fibroblasts: glucocorticoids as negative regulators in fibroblasts. *J Cell Sci.* 1996;109 (Pt 8):2069-77.
- Satoi H, Tomimoto H, Ohtani R, Kitano T, Kondo T, Watanabe M, et al. Astroglial expression of ceramide in Alzheimer's disease brains: a role during neuronal apoptosis. *Neuroscience.* 2005;130(3):657-66.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 1993;43(8):1467-72.
- Scandroglio F, Venkata JK, Loberto N, Prioni S, Schuchman EH, Chigorno V, et al. Lipid content of brain, brain membrane lipid domains, and neurons from acid sphingomyelinase deficient mice. *J Neurochem.* 2008;107(2):329-38.
- Schachner M, Taylor J, Bartsch U, Pesheva P. The perplexing multifunctionality of janusin, a tenascin-related molecule. *Perspect Dev Neurobiol.* 1994;2(1):33-41.
- Scheel O, Papavlassopoulos M, Blunck R, Gebert A, Hartung T, Zahringer U, et al. Cell activation by ligands of the toll-like receptor and interleukin-1 receptor family depends on the function of the large-conductance potassium channel MaxiK in human macrophages. *Infect Immun.* 2006;74(7):4354-6.
- Scherberich A, Campos-Toimil M, Ronde P, Takeda K, Beretz A. Migration of human vascular smooth muscle cells involves serum-dependent repeated cytosolic calcium transients. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 4):653-62.

- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, et al. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med.* 1996;2(8):864-70.
- Schissel SL, Jiang X, Tweedie-Hardman J, Jeong T, Camejo EH, Najib J, et al. Secretory sphingomyelinase, a product of the acid sphingomyelinase gene, can hydrolyze atherogenic lipoproteins at neutral pH. Implications for atherosclerotic lesion development. *J Biol Chem.* 1998;273(5):2738-46.
- Schissel SL, Keesler GA, Schuchman EH, Williams KJ, Tabas I. The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene. *J Biol Chem.* 1998;273(29):18250-9.
- Schissel SL, Schuchman EH, Williams KJ, Tabas I. Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene. *J Biol Chem.* 1996;271(31):18431-6.
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, et al. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(20):9649-53.
- Schnare M, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol.* 2000;10(18):1139-42.
- Schneider A, Rajendran L, Honsho M, Gralle M, Donnert G, Wouters F, et al. Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. *J Neurosci.* 2008;28(11):2874-82.
- Schrader-Fischer G, Paganetti PA. Effect of alkalizing agents on the processing of the beta-amyloid precursor protein. *Brain Res.* 1996;716(1-2):91-100.
- Schramm M, Herz J, Haas A, Kronke M, Utermohlen O. Acid sphingomyelinase is required for efficient phagolysosomal fusion. *Cell Microbiol.* 2008;10(9):1839-53.
- Schuchman EH. Acid sphingomyelinase, cell membranes and human disease: lessons from Niemann-Pick disease. *FEBS Lett.* 2010;584(9):1895-900.
- Schuchman EH, Levran O, Pereira LV, Desnick RJ. Structural organization and complete nucleotide sequence of the gene encoding human acid sphingomyelinase (SMPD1). *Genomics.* 1992;12(2):197-205.
- Schuchman EH, Suchi M, Takahashi T, Sandhoff K, Desnick RJ. Human acid sphingomyelinase. Isolation, nucleotide sequence and expression of the full-length and alternatively spliced cDNAs. *J Biol Chem.* 1991;266(13):8531-9.
- Schumann RR, Pfeil D, Lamping N, Kirschning C, Scherzinger G, Schlag P, et al. Lipopolysaccharide induces the rapid tyrosine phosphorylation of the mitogen-activated protein kinases erk-1 and p38 in cultured human vascular endothelial cells requiring the presence of soluble CD14. *Blood.* 1996;87(7):2805-14.
- Seaman MN. Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol.* 2004;165(1):111-22.
- Selkoe DJ. Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman. *Neurochem Res.* 2003;28(11):1705-13.
- Shah S, Lee SF, Tabuchi K, Hao YH, Yu C, LaPlant Q, et al. Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell.* 2005;122(3):435-47.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.* 2008;14(8):837-42.

- Shen YE, Wang Y, Yu GC, Liu C, Zhang ZY, Zhang LM. Effects of Edaravone on Amyloid-beta Precursor Protein Processing in SY5Y-APP695 Cells. *Neurotox Res.* 2013.
- Sheng JG, Bora SH, Xu G, Borchelt DR, Price DL, Koliatsos VE. Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APPswe transgenic mice. *Neurobiol Dis.* 2003;14(1):133-45.
- Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, et al. Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest.* 2000;106(12):1489-99.
- Shirotani K, Edbauer D, Capell A, Schmitz J, Steiner H, Haass C. Gamma-secretase activity is associated with a conformational change of nicastrin. *J Biol Chem.* 2003;278(19):16474-7.
- Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, 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.
- Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest.* 2002;110(5):597-603.
- Simons M, Keller P, Dichgans J, Schulz JB. Cholesterol and Alzheimer's disease: is there a link? *Neurology.* 2001;57(6):1089-93.
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, et al. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature.* 1999;402(6761):537-40.
- Sisodia SS, St George-Hyslop PH. gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(4):281-90.
- Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol.* 2001;167(5):2887-94.
- Smith EL, Schuchman EH. The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. *FASEB J.* 2008;22(10):3419-31.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci.* 2005;8(8):1051-8.
- Sot J, Bagatolli LA, Goni FM, Alonso A. Detergent-resistant, ceramide-enriched domains in sphingomyelin/ceramide bilayers. *Biophys J.* 2006;90(3):903-14.
- Spence MW, Byers DM, Palmer FB, Cook HW. A new Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase in fetal bovine serum. *J Biol Chem.* 1989;264(10):5358-63.
- Steindler DA, Settles D, Erickson HP, Laywell ED, Yoshiki A, Faissner A, et al. Tenascin knockout mice: barrels, boundary molecules, and glial scars. *J Neurosci.* 1995;15(3 Pt 1):1971-83.
- Strittmatter WJ, Roses AD. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:53-77.
- Sudoh S, Kawamura Y, Sato S, Wang R, Saido TC, Oyama F, et al. Presenilin 1 mutations linked to familial Alzheimer's disease increase the intracellular levels of amyloid beta-protein 1-42 and its N-terminally truncated variant(s) which are generated at distinct sites. *J Neurochem.* 1998;71(4):1535-43.
- Sutinen EM, Pirttila T, Anderson G, Salminen A, Ojala JO. Pro-inflammatory interleukin-18 increases Alzheimer's disease-associated amyloid-beta production in human neuron-like cells. *J Neuroinflammation.* 2012;9:199.

- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Jr., Eckman C, et al. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*. 1994;264(5163):1336-40.
- Tahara K, Kim HD, Jin JJ, Maxwell JA, Li L, Fukuchi K. Role of toll-like receptor signalling in Abeta uptake and clearance. *Brain*. 2006;129(Pt 11):3006-19.
- Takahashi I, Takahashi T, Mikami T, Komatsu M, Ohura T, Schuchman EH, et al. Acid sphingomyelinase: relation of 93lysine residue on the ratio of intracellular to secreted enzyme activity. *Tohoku J Exp Med*. 2005;206(4):333-40.
- Takasugi N, Sasaki T, Suzuki K, Osawa S, Isshiki H, Hori Y, et al. BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *J Neurosci*. 2011;31(18):6850-7.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005;17(1):1-14.
- Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol*. 2000;12(1):113-7.
- Talts JF, Wirl G, Dictor M, Muller WJ, Fassler R. Tenascin-C modulates tumor stroma and monocyte/macrophage recruitment but not tumor growth or metastasis in a mouse strain with spontaneous mammary cancer. *J Cell Sci*. 1999;112 (Pt 12):1855-64.
- Tanaka S, Shiojiri S, Takahashi Y, Kitaguchi N, Ito H, Kameyama M, et al. Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;165(3):1406-14.
- Tauseef M, Knezevic N, Chava KR, Smith M, Sukriti S, Gianaris N, et al. TLR4 activation of TRPC6-dependent calcium signaling mediates endotoxin-induced lung vascular permeability and inflammation. *J Exp Med*. 2012;209(11):1953-68.
- Teichgraber V, Ulrich M, Endlich N, Riethmuller J, Wilker B, De Oliveira-Munding CC, et al. Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat Med*. 2008;14(4):382-91.
- Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, et al. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 2002;195(1):99-111.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*. 1991;30(4):572-80.
- Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, et al. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron*. 1996;17(1):181-90.
- Thinakaran G, Koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*. 2008;283(44):29615-9.
- Titball RW. Bacterial phospholipases C. *Microbiol Rev*. 1993;57(2):347-66.
- Townsend M, Shankar GM, Mehta T, Walsh DM, Selkoe DJ. Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol*. 2006;572(Pt 2):477-92.
- Triantafyllou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafyllou K. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 12):2603-11.

- Tsubuki S, Takaki Y, Saido TC. Dutch, Flemish, Italian, and Arctic mutations of APP and resistance of Abeta to physiologically relevant proteolytic degradation. *Lancet*. 2003;361(9373):1957-8.
- Tucker RP. Abnormal neural crest cell migration after the in vivo knockdown of tenascin-C expression with morpholino antisense oligonucleotides. *Dev Dyn*. 2001;222(1):115-9.
- Tucker RP, Brunso-Bechtold JK, Jenrath DA, Khan NA, Poss PM, Sweatt AJ, et al. Cellular origins of tenascin in the developing nervous system. *Perspect Dev Neurobiol*. 1994;2(1):89-99.
- Tyler SJ, Dawbarn D, Wilcock GK, Allen SJ. alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;299(3):373-6.
- Udan ML, Ajit D, Crouse NR, Nichols MR. Toll-like receptors 2 and 4 mediate Abeta(1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line. *J Neurochem*. 2008;104(2):524-33.
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem*. 2002;277(17):15107-12.
- van Vliet P, Westendorp RG, Eikelenboom P, Comijs HC, Frolich M, Bakker E, et al. Parental history of Alzheimer disease associated with lower plasma apolipoprotein E levels. *Neurology*. 2009;73(9):681-7.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. 1999;286(5440):735-41.
- Vetrivel KS, Cheng H, Lin W, Sakurai T, Li T, Nukina N, et al. Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol Chem*. 2004;279(43):44945-54.
- Vieira SI, Rebelo S, Esselmann H, Wiltfang J, Lah J, Lane R, et al. Retrieval of the Alzheimer's amyloid precursor protein from the endosome to the TGN is S655 phosphorylation state-dependent and retromer-mediated. *Mol Neurodegener*. 2010;5:40.
- Vlad SC, Miller DR, Kowall NW, Felson DT. Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology*. 2008;70(19):1672-7.
- Vom Berg J, Prokop S, Miller KR, Obst J, Kalin RE, Lopategui-Cabezas I, et al. Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Nat Med*. 2012;18(12):1812-9.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, et al. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. 2002;416(6880):535-9.
- Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem*. 2007;101(5):1172-84.
- Walter S, Letiembre M, Liu Y, Heine H, Penke B, Hao W, et al. Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(6):947-56.
- Wang J, Ho L, Chen L, Zhao Z, Zhao W, Qian X, et al. Valsartan lowers brain beta-amyloid protein levels and improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 2007;117(11):3393-402.
- Wang P, Jiang S, Cui Y, Yue Z, Su C, Sun J, et al. The n-terminal 5-MER peptide analogue P165 of amyloid precursor protein exerts protective effects on SH-SY5Y cells and rat hippocampus neuronal synapses. *Neuroscience*. 2011;173:169-78.
- Weber P, Bartsch U, Rasband MN, Czaniara R, Lang Y, Bluethmann H, et al. Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS. *J Neurosci*. 1999;19(11):4245-62.

- Weber P, Montag D, Schachner M, Bernhardt RR. Zebrafish tenascin-W, a new member of the tenascin family. *J Neurobiol.* 1998;35(1):1-16.
- Weskamp G, Cai H, Brodie TA, Higashiyama S, Manova K, Ludwig T, et al. Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Mol Cell Biol.* 2002;22(5):1537-44.
- Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol.* 2000;57(10):1439-43.
- Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron.* 2002;35(3):419-32.
- Xie J, Brayne C, Matthews FE. Survival times in people with dementia: analysis from population based cohort study with 14 year follow-up. *BMJ.* 2008;336(7638):258-62.
- Yamaguchi Y, Hashimoto T, Sakurai H, Yoshimoto T, Ohmichi Y, Morimoto A, et al. Low rather than high dose lipopolysaccharide 'priming' of muscle provides an animal model of persistent elevated mechanical sensitivity for the study of chronic pain. *Eur J Pain.* 2011;15(7):724-31.
- Yamaji A, Sekizawa Y, Emoto K, Sakuraba H, Inoue K, Kobayashi H, et al. Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. *J Biol Chem.* 1998;273(9):5300-6.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 2003;301(5633):640-3.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature.* 2002;420(6913):324-9.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol.* 2003;4(11):1144-50.
- Yang GZ, Yang M, Lim Y, Lu JJ, Wang TH, Qi JG, et al. Huntingtin associated protein 1 regulates trafficking of the amyloid precursor protein and modulates amyloid beta levels in neurons. *J Neurochem.* 2012;122(5):1010-22.
- Yang LB, Lindholm K, Yan R, Citron M, Xia W, Yang XL, et al. Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med.* 2003;9(1):3-4.
- Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL. Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci Lett.* 2001;297(2):97-100.
- Yates SL, Burgess LH, Kocsis-Angle J, Antal JM, Dority MD, Embury PB, et al. Amyloid beta and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J Neurochem.* 2000;74(3):1017-25.
- Zacharias U, Leuschner R, Norenberg U, Rathjen FG. Tenascin-R induces actin-rich microprocesses and branches along neurite shafts. *Mol Cell Neurosci.* 2002;21(4):626-33.
- Zhang CE, Wei W, Liu YH, Peng JH, Tian Q, Liu GP, et al. Hyperhomocysteinemia increases beta-amyloid by enhancing expression of gamma-secretase and phosphorylation of amyloid precursor protein in rat brain. *Am J Pathol.* 2009;174(4):1481-91.
- Zhang H, Ma Q, Zhang YW, Xu H. Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem.* 2012;120 Suppl 1:9-21.
- Zhao G, Liu Z, Ilagan MX, Kopan R. Gamma-secretase composed of PS1/Pen2/Aph1a can cleave notch and amyloid precursor protein in the absence of nicastrin. *J Neurosci.* 2010;30(5):1648-56.

Zheng H, Koo EH. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener.* 2006;1:5.

Zhou H, Zhou S, Walian PJ, Jap BK. Dependency of gamma-secretase complex activity on the structural integrity of the bilayer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;402(2):291-6.

Zhou K, Kanai R, Lee P, Wang HW, Modis Y. Toll-like receptor 5 forms asymmetric dimers in the absence of flagellin. *J Struct Biol.* 2012;177(2):402-9.

Weitere Lehrbücher und Zeitschriften

Alzheimer A., Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters, *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*, December 1911, Volume 4, Issue 1, pp 356-385

Davis A., Chapter 3: On the Job: Cellular Specialties, *Inside the cell*, 2005, National Institutes of Health, NIH Publication No. 05 1051

Morris RGM., Spatial localization does not require the presence of local cues, *Learning and motivation*, Issue 12, 239-260, 1981

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Ampere
A β	Amyloid beta
ACE	<i>angiotensin-converting enzyme</i>
AD	Alzheimer-Krankheit, <i>Alzheimer's disease</i>
AICD	<i>APP intracellular domain</i>
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
APH1	<i>anterior pharynx defective 1</i>
APP	Amyloid-Vorläuferprotein
APS	Ammoniumpersulfat
arg1	<i>arginase 1</i>
AS	Aminosäure
aSMase, ASM	saure Sphingomyelinase
BACE	<i>beta-site APP cleavage enzyme</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bidest.	zweifach destilliert
BMDM	<i>bone marrow derived macrophages</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bSMase	alkaline Sphingomyelinase
CCL-2	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
chi3l3	<i>chitinase-3-like protein 3</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit, <i>cerebrospinal fluid</i>
Ct	Schwellenwert eines Gens bei der Real-Time-quantitative-PCR
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin-Hydrochlorid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRG	Spinalganglion, <i>dorsal root ganglion</i>
DRM	Detergens resistente Membranen
DTR	Diphtherietoxinrezeptor
DTT	Dithiothreitol
ECE	<i>endothelin-converting enzyme</i>
ECM	extrazelluläre Matrix, <i>extracellular matrix</i>

Abkürzung	Bedeutung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor, <i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EmGFP	<i>Emerald green fluorescent protein</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
ESI-MS/MS	Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie
e.V.	eingetragener Verein
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FGF-2	<i>fibroblast growth factor-2</i>
Flot1	Flotillin 1
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
FTD	Fibronektin Typ III Domäne
Fura-2-AM	Fura-2-acetoxymethylester
g	Gramm
G	<i>gauge</i>
GMCSF	<i>growth factor macrophage colony-stimulating factor</i>
GMEM	<i>glia/mesenchymal extracellular matrix protein</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde(n)
HAP1	<i>huntingtin associated protein 1</i>
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
Iba1	<i>ionized calcium binding adapter molecule 1</i>
IDE	<i>insulin-degrading-enzyme</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IRAK	<i>IL-1R-associated kinase</i>
IRF-3	<i>IFN-regulatory factor 3</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
k	kilo
kb	Kilobasen
kd	<i>knock down</i>
ko	<i>knock out</i>
l	Liter
IGF- β	<i>insulin-like growth factor β subunit</i>
Lamp1	<i>lysosomal associated membrane protein 1</i>
LB	Luria Bertani

Abkürzung	Bedeutung
LBP	Lipopolysacchrid-bindendes-Protein
LPS	Lipopolysaccharide
LRAD3	<i>LDL receptor class A domain containing 3</i>
lrp1	<i>low density lipoprotein-receptor related protein 1</i>
LRR	Leucin-reiche Wiederholungen, <i>leucin-rich repeat</i>
μ	Mikro
m	Milli
M	Mol/Liter
M6P	Mannose-6-Phosphat
Mal	<i>MyD88-adaptor-like</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MBS	<i>MES buffered saline</i>
MCI	leichte kognitive Störung, <i>mild cognitive impairment</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant peptide-1</i>
mcr1	<i>C-type mannose receptor 1</i>
MCSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute(n)
Mio.	Million(en)
miRNA	microRNA
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSR-1	<i>macrophage scavenger receptor 1</i>
Munc18-1	<i>mammalian uncoordinated 18-1</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
NC	Nitrozellulose
NCT	Nicestrin
NEP	<i>nepriylsin</i>
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
NPD	Niemann-Pick-Syndrom, <i>Niemann-Pick disease</i>
NSAIDs	nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente
nSMase, NSM	neutrale Sphingomyelinase
p	pico
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEN2	<i>presenilin enhancer 2</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly-L-Lysin Hydrobromid
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat

Abkürzung	Bedeutung
PMSF	Phenylmethylnsulfonylfluorid
PrP	Prion-Protein
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
PS	Presenilin
PSD95	<i>postsynaptic density protein 95</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA, <i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMasen	Sphingomyelinasen
SNAP25	<i>synaptosomal-associated protein 25</i>
sog.	so genannte
sortLa	<i>sorting protein-related receptor</i>
SR	<i>scavenger receptor</i>
SYN	Synaptophysin
TAB	<i>TAK1-binding protein</i>
TACE	<i>TNF-α converting enzyme</i>
TAK1	<i>transforming growth factor-β-activated kinase 1</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>tris-buffered Saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TICAM	<i>TIR-domain-containing molecule</i>
TIR	Toll/IL-1R
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TN	Tenascin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TPA	Phorbol-12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRAF6	<i>tumour-necrosis factor-receptor-associated factor 6</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon-β</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPC6	<i>transient receptor potential canonical channel 6</i>
TRPV1	<i>transient receptor potential vanilloid 1</i>
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt

Abkürzung	Bedeutung
vps	<i>vacuolar protein sorting</i>
wt	Wildtyp
w/v	Massenkonzentration
xg	Erdbeschleunigung
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis und Kooperationsverzeichnis

Abbildung 1	Historie der Alzheimer-Krankheit Quelle: „Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters“ von Alois Alzheimer, 1911
Abbildung 2	Altersabhängige Prävalenz der Alzheimer-Krankheit in unterschiedlichen Regionen Quelle: Qiu et al., <i>Dialogues in Clinical Neuroscience</i> , 2009
Abbildung 3	Schematische Darstellung der Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) Quelle: Zheng und Koo, <i>Molecular Neurodegeneration</i> , 2006
Abbildung 4	Phänotypen der mikroglialen Aktivierung Quelle: Fugamalli et al., <i>Frontiers in Bioscience</i> , 2011
Abbildung 5	Grundstruktur und Klassifikation der Sphingolipide Quelle: Patwardhan und Liu, <i>Progress in Lipid Research</i> , 2011
Abbildung 6	Einteilung der Sphingomyelinasen in Abhängigkeit ihres pH-Optimums Quelle: Proteinstrukturen stammen von USCN Life Science Inc.
Abbildung 7	Primäre Struktur der sauren Sphingomyelinase (sMase, ASM) Quelle: Jenkins et al., <i>Cell Signaling</i> , 2009
Abbildung 8	Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) in Abhängigkeit der <i>lipid rafts</i> Quelle: Querfurth und LaFerla, <i>New England Journal of Medicine</i> , 2010
Abbildung 9	Plasmide pCEP4 und pEFP-N1 Quelle: Vektorkarten stammen von Invitrogen und Clontech
Abbildung 10	Schematischer Verlauf zur Isolation der Lysosomen aus SH-SY5Y Zellen Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 11	Schematischer Verlauf zur Isolation der <i>lipid rafts</i> aus dem Mausgehirn Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 12	Schematische Auftrennung des Maushirngewebes Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 13	APP, ASM und γ -Sekretase colokalisieren in Endosomen und Lysosomen Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 14	Fotografien von Wildtyp und mit pCEP4-miRNA-Konstrukten transfizierten SH-SY5Y Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 15	<i>Asm knock down</i> verringert die A β -Produktion Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 16	<i>Asm</i> -Defizienz schwächt die Aktivität der γ -Sekretase Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 17	Analyse der Sekretasekomponenten in SH-SY5Y <i>knock down</i> Zellen Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 18	Analyse der Sekretasekomponenten in <i>asm</i> ^{+/+} , <i>asm</i> ^{+/-} und <i>asm</i> ^{-/-} Mäusegehirnen Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 19	<i>Asm knock down</i> hat keinen Einfluss auf den Transport von APP und γ -Sekretase Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 20	γ -Sekretase arbeitet unabhängig von Ceramiden Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 21	Akkumulation des Sphingomyelin in SH-SY5Y <i>asm</i> -kd Zellen Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 22	Proteinverteilung unterschiedlicher Isolationsverfahren Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 23	<i>Asm</i> -Defizienz vermindert die Dichte der <i>lipid rafts</i> Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 24	<i>Asm</i> -Defizienz erhöht den Widerstand der γ -Sekretase gegen Detergens Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 25	Etablierung der THP-1 <i>ct</i> -kd und <i>asm</i> -kd Zelllinien Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie, Wolfgang Weich und Timo Boch

Abbildung 26	<i>Asm</i> -Defizienz verstärkt die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie, Mithilfe: Anna Wagner und Wolfgang Weich
Abbildung 27	Aktivierungen der MAP-Kinase-Wege nach Stimulation mit LPS und Pam3CSK4 Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie, Mithilfe: Rebecca Lancaster
Abbildung 28	Verschiebung des A β -Rezeptors CD14 innerhalb der <i>lipid rafts</i> Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie, Mithilfe: Wolfgang Weich
Abbildung 29	<i>Asm</i> -defiziente Makrophagen phagozytieren mehr A β 42 als Wildtyp-Makrophagen Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie, Mithilfe: Anna Wagner
Abbildung 30	<i>Asm</i> ^{-/-} Makrophagen weisen keinen Degradationsdefekt auf Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 31	Schematische Darstellung der Verpaarung TgCRND8 x <i>asm</i> ko Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 32	Expression von APP und C99 in <i>app tg/asm</i> ^{+/+} und <i>app tg/asm</i> ^{+/-} Mäusen Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 33	<i>Asm</i> -Defizienz reduziert cerebrale A β -Ablagerungen im Mausgehirn Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 34	Verhaltensanalyse der TgCRND8 <i>app tg/asm</i> ^{+/+} und <i>app tg/asm</i> ^{+/-} Mäuse Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 35	Verhaltensanalyse der APP/PS1-21 <i>app tg/asm</i> ^{+/+} und <i>app tg/asm</i> ^{+/-} Mäuse Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 36	Untersuchung der synaptischen Markerproteine in TgCRND8 x <i>asm</i> ko Mäusen Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 37	Untersuchung der synaptischen Markerproteine in APP/PS1-21 x <i>asm</i> ko Mäusen Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 38	Analyse der Expression entzündungsrelevanter Gene Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 39	Behandlung mit Amitriptylin verringert cerebrale A β 42-Ablagerungen Behandlung der Mäuse: Yang Liu; Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 40	Amitriptylin inhibiert die Aktivitäten der β - und γ -Sekretasen Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 41	Struktur der Tenascins Quelle: Jones und Jones, <i>Developmental Dynamics</i> , 2000
Abbildung 42	Inflammation im Gehirn von Wildtyp-Mäusen und Alzheimer-Mausmodell Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 43	Expression der Tenascin-Genfamilie in Wildtyp-Mäusen und Alzheimer-Mausmodell Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 44	A β 42 stimuliert die <i>tnc</i> -Expression in Mikroglia Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 45	Expression der Tenascin-Genfamilie in SH-SY5Y nach <i>app695</i> -Überexpression Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 46	Analyse der Inflammation in Wildtyp und <i>tnc</i> -defizienten Mäusegehirnen Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 47	<i>Tnc</i> -Defizienz verschiebt die Inflammation vom M1- zum M2-Profil in <i>app tg</i> Mäusen Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 48	Expression der Toll-like Rezeptoren in <i>app tg/tnc</i> ^{+/+} und <i>app tg/tnc</i> ^{-/-} Mäusen Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 49	<i>Tnc</i> -Defizienz verstärkt die Rekrutierung von Mikroglia zum Hippocampus Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 50	Weniger A β -Ablagerungen im Hippocampus und Cortex <i>tnc</i> -defizienter Mäuse Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie; Mithilfe: Rebecca Lancaster
Abbildung 51	A β 40 ist im Gehirn <i>tnc</i> -defizienter Mäusen deutlich reduziert Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie

Abbildung 52	Analyse der β - und γ -Sekretasenkomponenten in <i>app tg/tnc^{+/+}</i> , <i>tnc^{+/-}</i> und <i>tnc^{-/-}</i> Mäusen Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 53	Vergleich der β - und γ -Sekretasenkomponenten in <i>tnc^{+/+}</i> und <i>tnc^{-/-}</i> Mäusen Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 54	Aktivität von β - und γ -Sekretasen ist in <i>tnc</i> -defizienten Mäusen gehemmt Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 55	TNC beeinflusst weder die A β -Phagozytose noch die -Degradation noch den -Transport Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 56	<i>Tnc</i> -Defizienz verlangsamt den Verlust synaptischer Proteine im Alzheimer-Mausmodell Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 57	Struktur der Toll-like Rezeptoren im Vergleich zum Interleukin-1-Rezeptoren Quelle: Akira und Takeda, <i>Nature Reviews</i> , 2004
Abbildung 58	Toll-like Rezeptoren (TLRs)-Signalkaskaden Quelle: Takeda und Akira, <i>International Immunology</i> , 2005
Abbildung 59	Schematische Darstellung zur Auswertung der Calcium-Imaging-Experimente Gestaltung: Kan Xie und Maryse Letiembre
Abbildung 60	LPS inhibiert Ca ²⁺ -Signale in depolarisierten DRG-Neuronen Datensammlung: Maryse Letiembre; Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 61	Dosisabhängige Inhibition der neuronalen Ca ²⁺ -Signale durch LPS Datensammlung: Maryse Letiembre; Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 62	Die LPS-induzierte Ca ²⁺ -Inhibition in DRG-Neuronen ist TLR4 und TRIF abhängig Datensammlung: Maryse Letiembre; Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 63	DRG-Neuronen mit defektem TLR4 in Cokultur mit TLR4 wt Zellen Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 64	Spezifische Bereinigung der Mikroglia/Makrophagen Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie
Abbildung 65	Mikroglia/Makrophagen regulieren die LPS-induzierte Ca ²⁺ -Inhibition in DRG-Neuronen Datensammlung und Gestaltung: Kan Xie

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Klaus Faßbender und Prof. Dr. Tobias Hartmann bedanken. Prof. Dr. Klaus Faßbender stellte äußerst interessante Themen im Rahmen dieser Dissertation bereit und war zugleich aufgrund seiner stetigen Hilfsbereitschaft und seiner freundlichen Art ein ständiger Rückhalt. Prof. Dr. Tobias Hartmann danke ich für seine Bereitschaft, mich als Doktoranden zu betreuen sowie seiner kritischen und hilfreichen Diskussionen bei der Korrektur dieser Arbeit. Durch ihre beeindruckenden Fachkenntnisse auf dem Gebiet der gegenwärtigen Alzheimer-Forschung erwiesen sie sich als idealer Mentor bzw. Doktorvater.

Den größten Dank gebührt meinem Betreuer Dr. Yang Liu. Durch seine unvergleichliche Motivation, Geduld und Unterstützung trug er im Wesentlichen zum Gelingen dieser Arbeit bei. Vergleichbar mit dem Turm von Alexandria lenkte er mich durch gefährliches Gewässer in den sicheren Hafen.

Anschließend möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen sowie ehemalige Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppen Fassbender, Hartmann und Diem für das angenehme Arbeitsklima bedanken. Insbesondere danke ich Dr. Wenlin Hao und Dr. Maryse Letiembre für ihre großartige Unterstützung, speziell in der Anfangsphase meiner Doktorarbeit. Ich danke Andrea Schottek, Nadine Commercon, Ulrike Kaul, Rebecca Lancaster und Julia Roth für ihre exzellente technische Unterstützung und der vielen herzlichen Momente. Gemeinsam mit Dr. Shirong Liu und M. Sc. Xu Liu bildete ich in- und außerhalb des Labors ein perfektes Team, sodass es nicht nur arbeitstechnisch, sondern auch zwischenmenschlich bestens funktionierte. Timo Boch, Wolfgang Weich sowie Anna Wagner danke ich für ihr Engagement beim Bearbeiten einzelner Teilprojekte und wünsche Ihnen auf ihren künftigen Karriereweg weiterhin viel Erfolg.

Als nächstes möchte ich den Kollaborationspartner Prof. Dr. Botond Penke (Albert Szent Gyorgyi Medical University, Szeged, Ungarn), Prof. Dr. Melitta Schachner (Rutgers University, NJ, USA), Prof. Dr. Erich Gulbins (Universität Duisburg-Essen, Essen) und Prof. Dr. Matthias Hannig (Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg) für ihre Hilfe danken.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie herzlichst bedanken. Meine Eltern hatten mir in jeglicher Lebenslage den größtmöglichen Halt gegeben. Zu meiner Frau, die mir in den letzten Jahren stets den Rücken freihielt und die ich über alles liebe, möchte ich sagen:“亲爱的老婆,你辛苦了“.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Vorname: Kan
Name: Xie
Laboranschrift: Universitätsklinikum des Saarlandes
Neurologie, AG Fassbender, Gebäude 90.3
Kirrbergerstrasse 100
66421 Homburg/Saar
Telefon: 06841-1624169
Geburtsdatum und -ort: 22.03.1982 in Zhejiang (VR China)
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1988 - 1991 Grundschole Xunbei (Zhejiang, VR China)
1992 - 1993 Gemeinschaftsgrundschule in Düsseldorf
1993 - 1996 Lessing-Gymnasium in Düsseldorf
1996 - 1997 Herzog-Christian-August-Gymnasium in Sulzbach-Rosenberg
1997 - 2002 Robert-Schuman-Gymnasium in Saarlouis

Berufsausbildung

10.2002 - 10.2007 Studium an der Universität des Saarlandes
Fachbereich Human- und Molekularbiologie
08.2005 - 09.2005 Fortgeschrittenenarbeit am Institut für Technische Biochemie
AG Heinzle, Saarbrücken
11.2006 - 10.2007 Diplomarbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie
AG Stahl, Homburg/Saar
ab 01.2008 Promotionsstudium am Universitätsklinikum des Saarlandes
Neurologie, AG Fassbender, Homburg/Saar

Schriftenverzeichnis

1. *Tenascin-C deficiency ameliorates Alzheimer's disease-related pathology in mice*
Neurobiology of Aging, 2013 May 11, Epub ahead of print
Xie K., Liu Y., Hao W., Walter S., Penke B., Hartmann T., Schachner M., Fassbender K.
2. *Matrix metalloproteinase-12 contributes to neuroinflammation in the aged brain*
Neurobiology of Aging, 2013 Apr;34(4):1231-9. Epub 2012 Nov 16
Liu Y, Zhang M, Hao W, Mihaljevic I, Liu X, **Xie K.**, Walter S, Fassbender K.
3. *Deficiency of acid sphingomyelinase decreases A β pathology in Alzheimer's disease*
Manuskript als Erstautor in Vorbereitung
4. *Neuronal Ca²⁺ response is regulated by LPS via microglial TLR4/TRIF*
Manuskript als Erstautor in Vorbereitung

Konferenzen und Abstracts

1. Ernst-Klenk-Symposium (Köln) 2008
2. *Neuronal Ca²⁺ response is regulated by LPS via microglial TLR4/TRIF*
Xie K., Letiembre M., Liu Y., Cavalie A. and Fassbender K.
FENS 2012 (Barcelona), Posterpräsentation
3. *Deficiency of acid sphingomyelinase decreases A β pathology in Alzheimer's disease*
Xie K., Liu Y., Gulbins E. and Fassbender K.
AD/PD 2013 (Florenz), Posterpräsentation

Ehrungen und Preise

1. Forschungspreis der Freunde des Universitätsklinikums des Saarlandes e.V. 2013

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Homburg, den 23.09.2013

Kan Xie