

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

**BEDEUTUNG DER SAUREN SPHINGOMYELINASE (ASM) IN DER FUNKTION DER
MAKROPHAGEN: ROLLE DER LIPID RAFTS**

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

2013

vorgelegt von: Wolfgang Frederik Weich
geb. am: 08. September 1987 in Lichtenfels

A Widmung

Für meine geliebte Familie.

B Inhaltsverzeichnis

A	Widmung	II
B	Inhaltsverzeichnis	III
C	Abkürzungsverzeichnis	VI
1	Abstract	1
2	Einleitung	5
2.1	Alzheimer-Krankheit	5
2.1.1	Symptomatik	6
2.1.2	Epidemiologie	6
2.1.2.1	Altern der Gesellschaft	7
2.1.2.2	Risikofaktoren	8
2.2	Histopathologie und Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit	9
2.2.1	Herkunft des Amyloids	9
2.2.2	Amyloid β	10
2.2.3	Neurofibrillen	11
2.3	Neuroinflammation	12
2.3.1	Immunstimulation durch A β	13
2.3.2	Zelluläre Antwort	14
2.3.2.1	Rolle der Mikroglia	15
2.3.2.2	Rolle peripherer Makrophagen im ZNS	15
2.3.3	Inflammatorische Mediatoren	17
2.3.3.1	Rolle von TNF- α in der Neuroinflammation	17
2.3.3.2	Rolle von MCP-1 in der Neuroinflammation	18
2.3.3.3	Rolle von IL-6 in der Neuroinflammation	18
2.4	Lipid Rafts	19
2.5	Saure Sphingomyelinase, Ceramid und Lipid Rafts	20
2.6	Fragestellung	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Material	24
3.1.1	Geräte und Instrumente	24
3.1.2	Gebrauchsmaterialien	25

3.1.3	Antikörper, Sets und Enzyme	25
3.1.4	Substanzen und Chemikalien	26
3.1.5	Salzlösungen	28
3.1.6	Stimulantien	28
3.1.7	Zelltypen und Organismen	29
3.1.7.1	THP-1-Zellen	29
3.1.7.2	ASM-Mäuse	29
3.1.8	Plasmidvektoren	29
3.2	Methoden	30
3.2.1	Entwickeln von THP-1-Knockdown-Zellen	30
3.2.1.1	Insertionskontrolle der Plasmidvektoren - Agarose-Gelelektrophorese	31
3.2.1.2	Transfektion der THP-1-Zellen	31
3.2.1.3	Nachweis der Transfektion - Fluoreszenzmikroskopie	32
3.2.2	BMDM- und Gewebegewinnung aus ASM-Mäusen	32
3.2.3	Präparation der A β -Peptide	33
3.2.4	Zellkulturarbeit	33
3.2.4.1	THP-1-KD-Zellen	34
3.2.4.2	Murine BMDMs	34
3.2.5	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	34
3.2.6	Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) mit Saccharose	36
3.2.7	Proteinbestimmung in den DGZ-Fraktionen des Maus-Großhirns	37
3.2.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.2.9	Western Blot	38
4	Ergebnisse	42
4.1	Insertionskontrolle der Plasmidvektoren	42
4.2	Nachweis der Transfektion der THP-1-Zellen	43
4.3	Einfluss der ASM auf die Sekretion inflammatorischer Mediatoren	44
4.3.1	Einfluss der ASM auf die Sekretion inflammatorischer Mediatoren durch humane THP-1-Makrophagen	44
4.3.1.1	Einfluss der ASM auf die TNF- α -Sekretion durch THP-1-Makrophagen	46
4.3.1.2	Einfluss der ASM auf die MCP-1-Sekretion durch THP-1-Makrophagen	47
4.3.1.3	Einfluss der ASM auf die IL-6-Sekretion durch THP-1-Makrophagen	48

4.3.2	Einfluss der ASM auf die Sekretion inflammatorischer Mediatoren durch murine Bone Marrow-Derived Macrophages	49
4.3.2.1	Einfluss der ASM auf die TNF- α -Sekretion durch BMDMs	49
4.3.2.2	Einfluss der ASM auf die MCP-1-Sekretion durch BMDMs	51
4.4	Änderungen der Lipid-Raft-Eigenschaften durch ASM-Modulation	53
4.4.1	Western Blot der DGZ-Fraktionen der THP-1-Zellen (TBS/Triton X-100)	53
4.4.2	Proteinbestimmung in den DGZ-Fraktionen des Maus-Großhirns	55
4.4.2.1	Homogenate in TBS/Triton X-100	55
4.4.2.2	Homogenate in MBS/CHAPSO	56
4.4.3	Western Blot der DGZ-Fraktionen des Maus-Großhirns	57
4.4.3.1	Homogenate in TBS/Triton X-100	57
4.4.3.2	Homogenate in MBS/CHAPSO	59
5	Diskussion	61
5.1	Bedeutung der ASM in der inflammatorischen Funktion humaner THP-1-Makrophagen als Modell der entzündlichen AD-Pathophysiologie	62
5.2	Bedeutung der ASM in der inflammatorischen Funktion muriner BMD-Makrophagen als Modell der entzündlichen AD-Pathophysiologie	66
5.3	Schlussfolgerung: Bedeutung der ASM in der inflammatorischen Funktion von Makrophagen als Modell der entzündlichen AD-Pathophysiologie	68
5.4	Auswirkung der ASM auf die Eigenschaften der Lipid Rafts	69
6	Literaturverzeichnis	72
7	Abbildungsverzeichnis	83
8	Tabellenverzeichnis	84
9	Danksagung	85
10	Lebenslauf	86

C Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AD	Alzheimer-Disease
AGE	Agarose-Gelelektrophorese
AICD	Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazole Propionic Acid
APH-1	Anterior Pharynx-defective 1
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor Protein
ASM	Saure Sphingomyelinase
Aβ	Amyloid β
BACE1	β -Site APP – Cleaving Enzyme 1
BMD	Bone Marrow-Derived
BMDM	Bone Marrow-Derived Macrophage
CD	Cluster of Differentiation
CRP	C-Reaktives Protein
DGZ	Dichtegradientenzentrifugation
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DRM	Detergent-Resistant Membrane
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EmGFP	Emerald Green Fluorescent Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HPBMC	Human Peripheral Blood Mononuclear Cell
HRP	Horseradish-Peroxidase
IL-6	Interleukin-6
KD	Knock-Down
LPS	Lipopolysaccharid
LTD	Long-Term Depression
LTP	Long-Term Potentiation
MAC	Membrane-Attack-Complex
MBS	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)-Buffered Saline
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MD	Myeloid Differentiation Protein
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
miRNA	MicroRNA
NFT	Neurofibrilläres Tangle
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSM	Neutrale Sphingomyelinase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PEN-2	Presenilin Enhancer 2
PHF	Paarweise Helikale Filamente
RAGE	Rezeptor für „Advanced Glycation Endproducts“
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ribonucleic Acid
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
shRNA	small hairpin RNA
TBS	Tris-Buffered Saline
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
wt	Wild-Type
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Abstract

Bedeutung der sauren Sphingomyelinase (ASM) in der Funktion der Makrophagen: Rolle der Lipid Rafts

Neuroinflammation ist eines der wesentlichen pathophysiologischen Merkmale des Morbus Alzheimer und ist wahrscheinlich substanziell an den neurodegenerativen Auswirkungen dieser chronisch progredienten Erkrankung beteiligt. Bei Betroffenen sind die Spiegel diverser inflammatorischer Mediatoren teilweise in Blut, Liquor und Gehirngewebe erhöht. Die für diese Krankheit charakteristischen fibrillären Amyloid-Ablagerungen stimulieren sowohl eingewanderte als auch originäre Mikroglia und ebenso die direkt verwandten Makrophagen an CD14, TLR2 und TLR4. Indem sie auf diese Weise eine entzündliche Reaktion hervorrufen, dürften die A β -Peptide die Ausbildung eines chronisch-inflammatorischen Milieus im ZNS anregen.

Die entzündliche zelluläre Reaktion auf das Alzheimer-Amyloid wurde anhand von Makrophagen als etabliertes Modell für humane Mikroglia näher charakterisiert. Als Ansatz für eine mögliche Therapie wurde dabei eine Defizienz der ASM in Betracht gezogen. Dieses Enzym ist sowohl in der Mediation als auch der Amplifikation der entzündlichen zellulären Signalwege involviert, indem es die Komposition der Lipid Rafts in Richtung ceramidreicher Domänen reorganisiert und so ein Clustering relevanter Rezeptoren ermöglicht.

Mittels ELISA konnte an einer transfizierten monozytären THP-1-Zelllinie bei Stimulation an den o.g. Rezeptoren mittels Pam3CSK4 und LPS als spezifische Liganden nach ASM-Knockdown eine signifikant erhöhte Ausschüttung von TNF- α sowie eine signifikant erniedrigte Sekretion von MCP-1 und IL-6 gezeigt werden. Bone Marrow-Derived Macrophages aus ASM-Mäusen (C57BL6/J-Hintergrund) wiesen bei Anregung mit Pam3CSK4, LPS und A β_{42} eine signifikant erhöhte Sekretion von sowohl TNF- α als auch MCP-1 auf. Zudem stieg die Konzentration der untersuchten Mediatoren als Reaktion auf Kontakt der mononukleären Phagozyten mit dem AD-typischen A β_{42} bzw. mit Pam3CSK4 oder LPS als spezifische Liganden jeweils signifikant an. Unabhängig von der Richtung, in die sich die Sekretion bei ASM-Defizienz veränderte, scheint dieses Enzym relevant am Mechanismus der Pam3CSK4-, LPS- und A β_{42} -induzierten

Ausschüttung der betrachteten inflammatorischen Mediatoren aus mononukleären Phagozyten beteiligt zu sein.

Um den Einfluss der ASM auf die Komposition der Lipid Rafts zu untersuchen, wurden diese in Form von Detergent-Resistant Membranes aus THP-1-Zellen und Maus-Großhirnen verschiedener ASM-Genotypen isoliert. Dabei zeigte sich im Western Blot nach ASM-Defizienz für beide Probenarten ein Shift der Lipid Rafts hin zu einer erniedrigten physikalischen Dichte. Diese dürfte auf eine geringere Ceramidsynthese infolge der verminderten ASM-Aktivität zurückzuführen sein.

Sowohl eine Anreicherungen von Ceramid als auch eine erhöhte ASM-Aktivität konnten in den Gehirnen Betroffener bereits in frühen Stadien der AD nachgewiesen werden. Daher wäre nach Reduktion dieser überhöhten Enzymaktivität als mögliche therapeutische Intervention von einer Normalisierung des Ceramid-Haushaltes und der nachfolgenden Effekte auf die zelluläre Membranstruktur auszugehen. Dies würde wiederum auch der Mediation und Amplifikation der inflammatorischen zellulären Signalwege entgegenwirken. Durch das Design von ASM-Modulatoren könnten daher zukünftig neue Möglichkeiten in der Therapie des Morbus Alzheimer und anderer chronisch-inflammatorischer Erkrankungen erschlossen werden.

Importance of the acid sphingomyelinase (ASM) in the macrophage's functioning: role of the lipid rafts

Neuroinflammation is one of the major pathophysiological hallmarks of Alzheimer's disease and is suspected to play a crucial role in the neurodegenerative course of this chronic-progressive disease. Increased levels of inflammatory mediators can be demonstrated in blood, CSF and brain tissue. The pathognomonic fibrillary amyloid deposits stimulate resident and recruited microglia as well as the directly related macrophages via CD14, TLR2 and TLR4. Triggering an immune response by these means, A β -peptides are likely to induce the formation of a chronic-inflammatory CNS environment.

Macrophages have been established as a viable model for microglia in this context and were, therefore, used to characterize the cellular inflammatory reaction. A deficiency of the ASM was considered as a feasible approach for possible therapeutic intervention. Said enzyme plays a vital role in the mediation and amplification of inflammatory signal transduction pathways by alternating the composition of lipid rafts towards ceramide-rich domains and consequently enabling a clustering of relevant receptors.

A monocytic THP-1 cell line, transfected with an ASM knockdown vector, was stimulated on the aforementioned receptors with the specific ligands Pam3CSK4 and LPS. Consecutively, a significant increase in TNF- α release as well as a marked decrease in MCP-1 and IL-6 secretion could be recorded by the means of ELISA. Bone marrow-derived macrophages obtained from ASM mice (C57BL6/J-background) exhibited a significantly enhanced secretion of TNF- α and MCP-1 after stimulation with Pam3CSK4, LPS or A β ₄₂. Furthermore, after exposure of mononuclear phagocytes to the AD-specific A β ₄₂, Pam3CSK4 or LPS a significant rise of the investigated mediators in response could be demonstrated. Regardless of the tendency in which ASM deficiency affects the secretion of inflammatory signal transducers, it is safe to assume that the enzyme plays a prominent part in the mechanism of Pam3CSK4-, LPS- and A β ₄₂-induced release of the respective inflammatory mediators from mononuclear phagocytes.

In order to determine the influence of the ASM on the composition of lipid rafts, they were isolated in the form of detergent-resistant membranes from THP-1 cells and mouse cerebral hemispheres of various ASM genotypes. In both sorts of samples western blot

revealed a shift of the lipid rafts towards a decreased physical density in case of ASM deficiency. This circumstance might be explained by a decline in ceramide synthesis as a consequence of reduced ASM activity. An accumulation of ceramide as well as an enhanced ASM activity in AD-brains have already been experimentally verified even in early stages of the disease. Hence we can proceed to the assumption that reducing this increased enzyme activity in terms of a possible therapeutic intervention might entail a normalization of the ceramide homeostasis and its consecutive effects on the cellular membrane structure. This in turn would also counteract the mediation and amplification of the respective inflammatory signal transduction pathways. The designing of ASM modulators could establish new treatment options in the therapy of Alzheimer's disease and other pathologies linked to chronic inflammatory states.

2 Einleitung

Demenzkrankungen haben in den letzten Jahren mit prominenten Beispielen, vor allem aber mit ihrer enormen medizinischen, sozialen und ökonomischen Bedeutung traurige Berühmtheit erlangt. Darunter ist die Alzheimer-Krankheit die weitaus häufigste Form [1].

2.1 Alzheimer-Krankheit

1906 berichtete Alois Alzheimer (1864–1915) über einen neuartigen Krankheitsfall, der sich mit zunehmender Gedächtnisschwäche, verminderten kognitiven Fähigkeiten und Halluzinationen präsentierte [2]. Diese langsame, aber stetige Entwicklung geistigen Siechtums bezeichnete Emil Kraepelin 1910 als Alzheimer-Krankheit [3]. Bei jenem Krankheitsfall handelte es sich um Auguste Deter, die viereinhalb Jahre später im Alter von 55 Jahren an den Folgen dieses Leidens verstarb. Die Sektion zeigte eine ausgeprägte gleichmäßige Atrophie des Gehirns. An silbergefärbten Schnitten (Abb. 1) beschrieb Alzheimer neben ausgeprägtem Neuronenverlust auffällige Veränderungen der Neurofibrillen, die sich teils zu dichten, stark gefärbten Bündeln zusammenlagerten. Auch fielen kleine Herde auf, die er der Einlagerung eines plaqueartigen Stoffes in die Hirnrinde zuschrieb [2] [4].

Diese pathologischen Veränderungen sind die Charakteristika der Alzheimer-Krankheit, welche durch massiven Neuronenuntergang, die Bildung von Neurofibrillenbündeln und die Akkumulation von Amyloidplaques gekennzeichnet sind [5] [6].

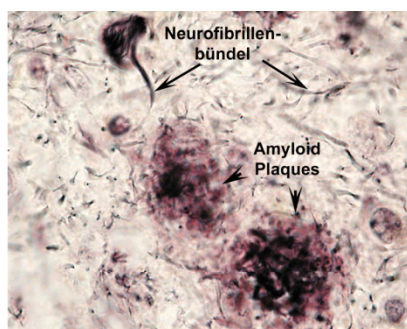


Abb. 1: Originalschnitt des ersten von Alzheimer beschriebenen Alzheimer-Falles

Neben Neurodegeneration zeigten sich in den Gehirnschnitten Neurofibrillenbündel und Amyloid-Plaques (Bielschowskysche Silberfärbung; aus: Archiv des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung, LMU München; [7]).

2.1.1 Symptomatik

Alzheimer ist eine derzeit unheilbare, progressive, neurodegenerative Erkrankung. Charakterisiert wird sie durch Gedächtnisverfall, zunehmende Beeinträchtigung im Alltag und diverse neuropsychiatrische Symptome und Verhaltensauffälligkeiten [8].

Neurologisch fallen zu Beginn oft eine gestörte Merkfähigkeit und die Schwierigkeit neue Informationen aufzunehmen auf. Die zeitliche und örtliche Einordnung der eigenen Handlungen bereitet zunehmend Probleme. Hinzu tritt eine progressive Sprachstörung, die sich anfänglich nur als Wortfindungsstörung zeigt und im Verlauf bis zur Aphasie reicht. Mit nachlassender räumlicher Vorstellung leiden die Orientierung des Erkrankten und die Fähigkeit geometrische Beziehungen zu erfassen. Die steigenden kognitiven Einschränkungen führen zu schwindenden Leistungen bei Problemlösungs-, Rechen- und Abstraktionsaufgaben sowie zu vermindertem Urteilsvermögen. Dieser Verlauf ist chronisch progressiv und führt zu sozialem Rückzug und starken Restriktionen im Alltag [9] [10].

Psychiatrische Symptome wie Stimmungsschwankungen, Persönlichkeitsänderungen und Apathie treten gewöhnlich relativ früh auf und überdauern den Krankheitsverlauf. Psychosen und Agitation wurden eher im mittleren und späteren Stadium beschrieben [8] [11]. So erleiden die Erkrankten häufig neben Schlaf- und Angststörungen auch Depressionen, Wahn oder Halluzinationen [12].

In den fortgeschrittenen Krankheitsstadien verlieren die Patienten zusätzlich elementare Fähigkeiten des täglichen Lebens wie eigenständiges Essen, Erhalt der Hygiene und Kontinenz [8]. Im Endstadium sind die Betroffenen nicht einmal mehr dazu fähig, sich mitzuteilen oder ihre Angehörigen zu erkennen [10]. Hinzutretende Bewegungsunfähigkeit und Bettlägerigkeit prädestinieren sie für Bronchitiden und Pneumonien, an denen sie häufig auch versterben – durchschnittlich nur 7-10 Jahre nach Symptombeginn [9].

2.1.2 Epidemiologie

Weltweit waren 2005 ca. 24 Millionen Menschen an Demenz erkrankt [13], allein in Deutschland sind es heute ca. 1,3 Millionen [14]. Für die nächsten Jahrzehnte geht man international von einer Verdoppelung etwa alle 20 Jahre aus – auf weltweit 42 Millionen Erkrankte 2020 und auf 81 Millionen Erkrankte 2040 – sofern keine Änderungen bei den Behandlungsmöglichkeiten oder der Mortalität eintreten. Allein in

Westeuropa würde demnach der Zuwachs an Demenzerkrankungen von 2001 bis 2040 102% betragen [13].

2.1.2.1 Altern der Gesellschaft

Demenz ist v.a. eine Erkrankung des höheren Alters [13] [15]. Ihre Prävalenz liegt bei 60-64-Jährigen unter 1%, steigt aber mit dem weiteren Alter fast exponentiell an. So liegt sie in der westlichen Welt bei über 85-Jährigen zwischen 24% und 33% [13] [16].

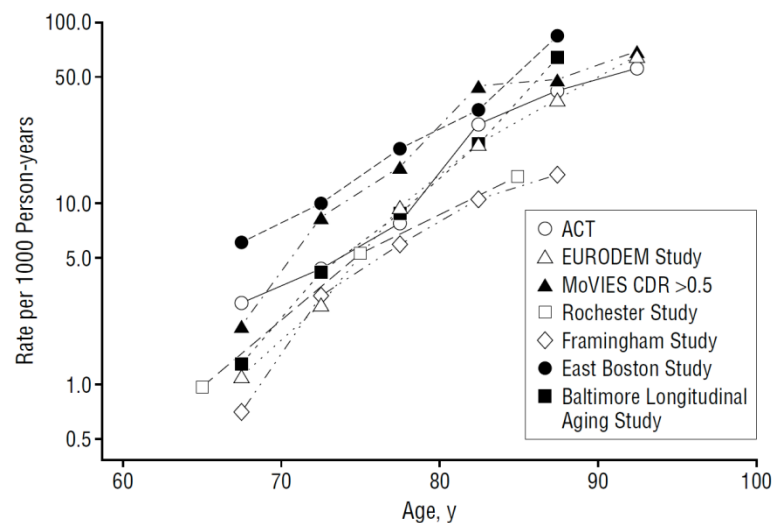


Abb. 2: Inzidenz der Alzheimer-Demenz je Alter

Die Inzidenz der Alzheimer-Demenz (Achse logarithmisch) – hier im Vergleich verschiedener Studien – zeigt ebenfalls einen fast exponentiellen Anstieg mit dem Alter. Aus [17].

In einer „überalternden“ Gesellschaft wie der Deutschen steigt daher die Prävalenz der Demenz und damit die immense Last auf das allgemeine Gesundheitssystem rasch an [17]. So ist sie Ursache für 11% der mit Behinderung gelebten Jahre bei über 60-Jährigen [18]. Das Fundament für die Pflege Demenzkranker bildet oft die eigene Familie, die dadurch wiederum selbst substantielle psychologische, praktische und ökonomische Belastungen erfährt [19].

Die Alzheimer-Krankheit ist die weitaus häufigste Form der Demenz. Sie ist alleine für etwa 50 - 56% der Fälle verantwortlich, das Mischbild aus Alzheimer- und vaskulärer Demenz für weitere 13 - 17% [1]. Als Folge ist die Alzheimer-Disease (AD) zur sechsthäufigsten Todesursache in den USA herangewachsen, bei den über 65 Jährigen ist sie sogar die fünft-häufigste. Jedoch gibt es bisher keine effektive Möglichkeit, ihre fatale Progression aufzuhalten oder sie gar zu heilen [10].

2.1.2.2 Risikofaktoren

Das Alter ist der wichtigste Risikofaktor für das Erkranken an der Alzheimer-Krankheit, auch wenn diese nicht zum physiologischen Vorgang des Alterns gehört [1] [10].

Daneben ist auch die familiäre Vorgeschichte entscheidend. Je mehr Angehörige ersten Grades an der AD leiden, desto höher ist die eigene Chance diese später zu entwickeln. Für den Fall des gehäuften Auftretens sollte daher die hereditäre Form, Umweltfaktoren oder beides in Betracht gezogen werden [10].

Die seltene familiäre Form von Alzheimer ist eine autosomal-dominante Erbkrankheit mit Beginn meist vor dem 65. Lebensjahr. Für eine geringe Zahl dieser Fälle ist eine Mutation auf dem Amyloid Precursor Protein (APP)-Gen verantwortlich, während Genmutationen von Presenilin-1 und -2 deutlich häufiger ursächlich sind [16] [20]. Presenilin- oder APP-Mutationen bewirken eine frühere und gesteigerte Produktion von Amyloid β (A β), das entscheidend am Pathomechanismus der AD beteiligt ist [20]. Da das APP-Gen auf Chromosom 21 liegt, gilt Trisomie 21 als wesentlicher Risikofaktor. Daher entwickeln Menschen mit drei strukturell normalen Genkopien die neuropathologischen Befunde der Alzheimer-Krankheit schon wesentlich zeitiger durch APP-Überexpression [8].

Bei der sporadischen Alzheimer-Form ist das Apolipoprotein E (APOE) ϵ 4-Gen ein entscheidender genetischer Faktor. Zumindest die Chance zu erkranken ist damit stark erhöht, auch wenn alleinig das Vorhandensein eines APOE ϵ 4-Allels es nicht garantiert. Allerdings ist das Manifestationsalter dann pro Allel um durchschnittlich 5 bis 10 Jahre gesenkt. [16] [20].

Geschätzt 30% der Menschen über 85 Jahren leiden an mild cognitive Impairment, einer Vorstufe zur Demenz ohne Beeinträchtigungen des Alltags. Diese haben ein stark erhöhtes Risiko eine Demenz – v.a. die AD – zu entwickeln [21].

Auch potentiell modifizierbare kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Atherosklerose, hohe Cholesterinwerte, Diabetes mellitus Typ 2, Bluthochdruck, Bewegungsmangel, Rauchen und Adipositas sind mit einem höheren Risiko für die AD verbunden [22] [23].

Viele Studien zeigten eine höhere Prävalenz bei Frauen, die vermutlich ihrer höheren Lebenserwartung geschuldet ist. Die Inzidenz lag dabei nur im sehr hohen Alter über der der Männer. Über diesen Sachverhalt wird jedoch noch kontrovers diskutiert [24].

2.2 Histopathologie und Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit

Die bereits von Alzheimer erkannten histopathologischen Veränderungen im AD-Gehirn sind u.a. durch die Akkumulation von Amyloidplaques und die Bildung von Neurofibrillen (vgl. Abb. 1, S. 5) gekennzeichnet, die zusätzlich von einem Zustand chronischer Inflammation begleitet werden [5] [6].

2.2.1 Herkunft des Amyloids

A β entsteht aus dem membranständigen APP, das sequentiell von verschiedenen Enzymen gespalten wird. Dadurch entstehen unterschiedliche Produkte (s. Abb. 3) [1].

Im nicht-amyloidogenen Weg wird das APP durch eine Protease mit α -Sekretase-Aktivität innerhalb der A β -Region geschnitten, so dass das lösliche (s=soluble) sAPP α entsteht. Dieses wird wiederum durch die γ -Sekretase prozessiert, woraus extrazellulär das Protein p3 und intrazellulär die APP intracellular Domain (AICD) hervorgehen [1]. Die γ -Sekretase besteht aus mehreren Teilen: Presenilin-1 oder -2, Nicastrin, PEN-2 und APH-1, wobei Presenilin wahrscheinlich das aktive Zentrum beheimatet [25].

Im amyloidogenen Weg führt die Spaltung des APP durch die β -Sekretase BACE1 zu sAPP β und C99. Die Schnittstelle der γ -Sekretase an C99 ist variabel, so dass einzelne A β -Peptide mit einer Länge zwischen 36 und 43 Aminosäuren und ebenfalls die AICD entstehen. Erst die Lipid Rafts stellen dabei die notwendige Plattform für den Aufbau und das Zusammenwirken der β - und γ -Sekretasen mit dem APP dar [1].

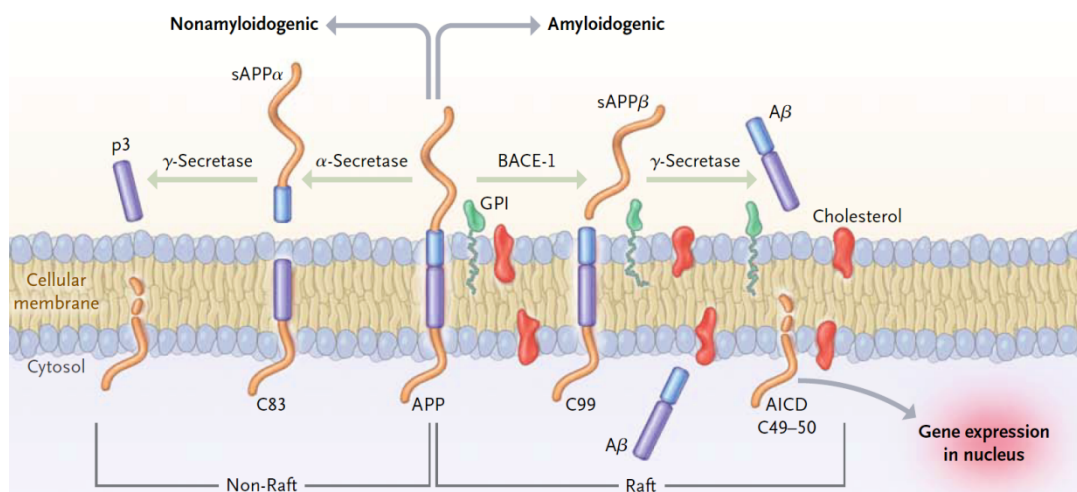


Abb. 3: Sequentielle Prozessierung des APP

Im nicht-amyloidogenen Weg entstehen Metabolite, die keine Plaque-Bildung zur Folge haben, im amyloidogenen Weg entstehen A β -Peptide unterschiedlicher Länge mit Fähigkeit zur Akkumulation. Aus [1].

2.2.2 Amyloid β

Unter den A β -Peptiden stellen diejenigen mit 40 und 42 Aminosäuren die wichtigsten Vertreter dar [5]. Das A β_{40} ist 40 Aminosäuren lang, allgemein häufiger und vornehmlich in zerebralen Gefäßen vorhanden [1]. In den amyloiden Plaques findet sich dagegen eher das A β_{42} , das aufgrund zweier zusätzlicher hydrophober Aminosäuren eine wesentlich höhere Aggregationsneigung besitzt [25]. Generell begünstigt eine Konformationsänderung von A β in das namensgebende β -Faltblatt dessen spontane Selbstaggregation [16]. Dabei kann es zu löslichen Oligomeren sowie zu unlöslichen Fibrillen heranwachsen (vgl. Abb. 4, S. 11). Eine umschriebene Akkumulation von Fibrillen im Interzellularraum formiert die senilen, neuritischen Plaques [1]. Diese sind von dystroph veränderten Nervenzellfortsätzen umgeben und rufen eine Immunantwort hervor, so dass sich aktivierte Mikroglia und reaktive Astrozyten in der Umgebung finden. Dagegen weisen die eher benignen, diffusen Plaques ohne Fibrillen diese neuritischen und glialen Zytopathologien nicht oder nur wenig auf [26] [27] [28]. Insgesamt scheinen jedoch die löslichen Oligomere die Form des A β zu sein, die den stärksten neurotoxischen Effekt aufweist. Neben ihrem löslichen Vorkommen können sie sich dynamisch an Fibrillen anheften oder aus diesen wieder herauslösen. Auf diese Weise dienen neuritische Plaques als Reservoir für die toxischen Oligomere [29] [30].

Die Amyloid-Peptide können intrazellulär in Kompartimenten entstehen oder mit Hilfe des low-density-lipoprotein-receptor-related-Proteins in diverse Zelltypen gelangen. Dort können sie u.a. wichtige Enzyme der Mitochondrien hemmen, wodurch diese funktionell beeinträchtigt werden. Oxidativer Stress, Freiwerden von Cytochrom c und Apoptose sind mögliche Folgen [1].

Indem die Oligomere die LTP inhibieren und die LTD fördern sowie die Anzahl an dendritischen Dornen reduzieren, vermindern sie die hippocampale synaptische Plastizität und damit die Fähigkeit zu lernen. In hohen Konzentrationen können sie auch die basale synaptische Übertragung unterdrücken, da zahlreiche Rezeptoren und die Ausschüttung von Neurotransmittern gestört werden [1] [30] [31].

A β -Peptide treten aber auch natürlicherweise auf. Ein physiologisches Niveau an synaptischem A β dämpft die exzitatorische Überleitung und verhindert somit neuronale Hyperaktivität. Normalerweise wird A β von den Proteasen Insulin-degrading-Enzyme und Neprilysin abgebaut, so dass ein Steady State entsteht. Ein Ungleichgewicht

zwischen Produktion und Clearance von A β mit nachfolgender Aggregation könnte ein Auslöser für die AD sein. Diese „Amyloid-Hypothese“ entwickelte sich auf Grundlage von Studien über die genetisch bedingten Varianten der AD, bei denen durch Mutation der APP- oder Presenilin-Gene die A β ₄₂-Produktion erhöht ist [1]. Bedenklich ist daran allerdings, dass auch viele gesunde ältere Menschen eine beachtliche Menge Amyloid in ihren limbischen und Assoziations-Kortices aufweisen. Dabei handelt es sich jedoch überwiegend um die Plaques des diffusen Typs [30].

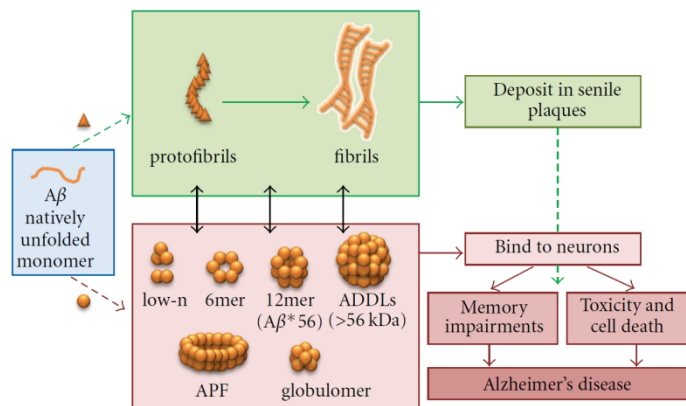


Abb. 4: Verschiedene Formen des Amyloid β

Nach seiner Bildung kann sich das A β in verschiedene Formen zusammenlagern, von denen die löslichen Oligomere die am stärksten toxische Form darstellen. Aus [32].

2.2.3 Neurofibrillen

Das Mikrotubuli assoziierte Protein Tau unterstützt im physiologischen Zustand die Bildung und Stabilisation von Mikrotubuli und den Vesikeltransport. Aus unklarer Ursache ist Tau bei der AD jedoch hyperphosphoryliert [1] [5]. Dies bewirkt eine Verringerung der Tau-Mikrotubuli-Wechselwirkung und damit eine Destabilisierung der Mikrotubuli als Teil des Zytoskeletts. Als Folge können sich Störungen des intrazellulären, v.a. des axonalen Transportes ergeben, wodurch die Nervenzell- und die synaptischen Funktionen beeinträchtigt werden und das Neuron degeneriert [33].

In seinem hyperphosphorylierten Zustand bildet Tau paarweise helikale Filamente (PHF) aus, die den Hauptbestandteil der Neurofibrillen darstellen [5]. Diese intrazellulären Aggregate werden auch neurofibrillary Tangles (NFT) genannt und treten bei der AD hauptsächlich in den Neuronen auf [34]. Ihren Anfang nimmt die Tau-Pathologie meist in den Neuronen der Transentorhinalregion und breitet sich dann über Hippocampus und Amygdala auf das neokortikale Assoziationsareal aus [35].

Die genaue Relevanz der Tau-Dysfunktion für die Ätiologie und Pathogenese der AD bleibt bisher noch unklar [5], da noch nicht abschließend gezeigt ist, ob die Tangle-Bildung Ursache oder Folge der Alzheimer-Erkrankung ist [16]. Es bestehen jedoch experimentelle Hinweise, dass die A β -Akkumulation der Tau-Aggregation vorangeht und diese anstößt [36] [37] [38]. Ferner ist für die A β -induzierte Degeneration von kultivierten Neuronen und für den kognitiven Abbau von Mäusen mit AD-ähnlicher Krankheit die Anwesenheit von endogenem Tau nötig [39] [40]. Weil zudem die Verteilung und Menge der Tau-Pathologie mit der Nervenzelldegeneration und der klinischen Symptomatik korreliert, besteht in jedem Fall der begründete Verdacht, dass diese Tau-Fehlfunktion relevanten Einfluss auf die Entwicklung der Demenz hat [34].

2.3 Neuroinflammation

Neben den neurotoxischen A β -Peptiden und den NFTs ist eine Entzündungsreaktion eine weitere wichtige Komponente, die aktiv zu Krankheitsgeschehen und Chronifizierung der AD beiträgt [41].

Eine Entzündung tritt im Zuge der Immunantwort des Organismus auf ein potentiell schädigendes Agens auf. Die chronifizierende Entzündungsreaktion, die mit neurodegenerativen Erkrankungen wie der AD einhergeht, wird Neuroinflammation genannt [42]. Während auch im physiologisch alternden Gehirn geringe Zeichen von Neuroinflammation nachgewiesen werden können, erfährt das Alzheimer-Gehirn eine viel stärkere entzündliche Reaktion, die auf einer erhöhten Anzahl oder qualitativ andersartigen Immunstimulanzen basieren dürfte [41]. So konnte in post mortem Studien in den betroffenen Regionen das Bild einer chronischen Entzündung gezeigt werden, das mit der Pathogenese der AD in direkten Zusammenhang gebracht wird [42].

Insbesondere durch die neurotoxischen, neuritischen Amyloid-Ablagerungen werden Mikrogliazellen aktiviert, die das A β phagozytieren und abbauen [1]. Durch chronische Aktivierung schütten sie jedoch eine Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren aus. Zu diesen gehören unter anderem Chemokine, eine Kaskade schädigender Zytokine, Komplementfaktoren, Akute-Phase-Reaktanten, freie Radikale und Stickoxide, welche einzeln oder im Zusammenspiel zur neuronalen Degeneration beitragen können [1] [43]. Der durch die proinflammatorischen Mediatoren entstehende Schaden kann wiederum weitere Mikroglia aktivieren [43]. Experimentell wurde gezeigt, dass die Chemokine

überdies die Migration von Monozyten aus dem peripheren Blut in das Alzheimer-Gehirn fördern; diese können durch Phagozytose jedoch auch an der Clearance der Plaques teilnehmen und so die Plaque-Last vermindern [44]. Zusätzlich rekrutieren die Mikrogliazellen Astrozyten, die die Entzündungsreaktion gegen die extrazellulären A β -Ablagerungen weiter verstärken und den entstehenden inflammatorischen Teufelskreis auf diese Weise untermauern [27]. Darüber hinaus wird die β APP-Prozessierung durch die entzündlichen Mediatoren beeinflusst und teils sogar gesteigert, so dass eine vermehrte A β -Bildung eine weitere Abwärtsspirale in Gang setzen könnte [41] [45]. Das beständige inflammatorische Milieu kann neuritische Schädigungen hervorbringen und teilweise den Zusammenbruch der vaskulären Blut-Hirn-Schranke herbeiführen [1].

2.3.1 Immunstimulation durch A β

Fibrilläres A β und extrazelluläre NFTs agieren als Stimulanzen der Immunantwort. Indem sie den Komplementfaktor C1q binden, können sie den klassischen Komplementweg auslösen. Dieser kann die Bildung des Membrane-Attack-Complex (MAC) herbeiführen und somit direkt Neuronenuntergang zur Folge haben [41] [46]. Weiterhin erfolgt durch die Komplementaktivierung auch die lokale Rekrutierung von Mikrogliazellen und Astrozyten. Da ein gewisses Maß an Fibrillierung des A β für die Aktivierung des Komplements und somit der Mikroglia notwendig ist, zeigen sich die chronisch-entzündlichen Reaktionen maßgeblich in der Nähe der neuritischen Plaques (vgl. 2.2.2), jedoch nicht in der Umgebung der diffusen Plaques. Bisher ist allerdings noch nicht abschließend geklärt, ob das Amyloid in Form von Plaques vorliegen muss oder ob die Mikrogliazellen nicht auch durch die gelösten, toxischen Oligomere aktiviert werden können [41].

Eine direkte Aktivierung der Mikroglia kann durch das Binden von A β an Rezeptoren für „Advanced Glycation Endproducts“ (RAGE) und Scavenger-Rezeptoren sowie durch Heterodimerisierung der Toll-like Rezeptoren (TLR) 2 und 4 erfolgen [41]. So zeigte sich in immunfluoreszenzgefärbten Gewebeschnitten von AD-Gehirnen eine ausgeprägte TLR4-Expression in der Umgebung der senilen Plaques [47]. Fibrilläres A β_{42} stimuliert Mikroglia und deren direkte Verwandte, die Monozyten, auch über Cluster of Differentiation (CD) 14, einen Rezeptor für Lipopolysaccharid (LPS). Damit gehen eine erhöhte Ausschüttung an Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Monocyte Chemoattractant

Protein (MCP)-1, Interleukin (IL)-6 und Stickoxiden sowie Neurotoxizität einher [41] [48] [49]. Da CD14 eine direkte intrazelluläre Signalkaskade fehlt, geht man davon aus, dass die A β ₄₂-Effekte an CD14 im Zusammenspiel mit TLR2 oder TLR4 übertragen werden [48] [50]. Abhängig von TLR2 [51] [52], TLR4 [47] [48] [53] und CD14 [49] erhöht fibrilläres A β ₄₂ somit die Produktion von Zytokin- und Stickstoffspezies in Mikroglia und Monozyten. Dies steigert in gewissen Krankheitsstadien zwar deren phagozytotische Plaque-Clearance, wirkt bei dauerhaft hohen Zytokinmengen jedoch auch neurotoxisch: bei niedrigen A β -Konzentrationen scheint CD14 nur die Phagozytose anzuregen, wogegen es bei höheren Amyloidkonzentrationen wahrscheinlich auch die zelluläre Aktivierung mit nachfolgender Neurotoxizität vermittelt [41] [49]. Somit ist die Phagozytose von A β durch Mikroglia und Monozyten abhängig von inflammatorischen Signalwegen [41]. Infolgedessen könnte das langjährige Vorhandensein von A β -Fibrillen über die o.g. Rezeptoren eine chronische Neuroinflammation unterhalten [48].

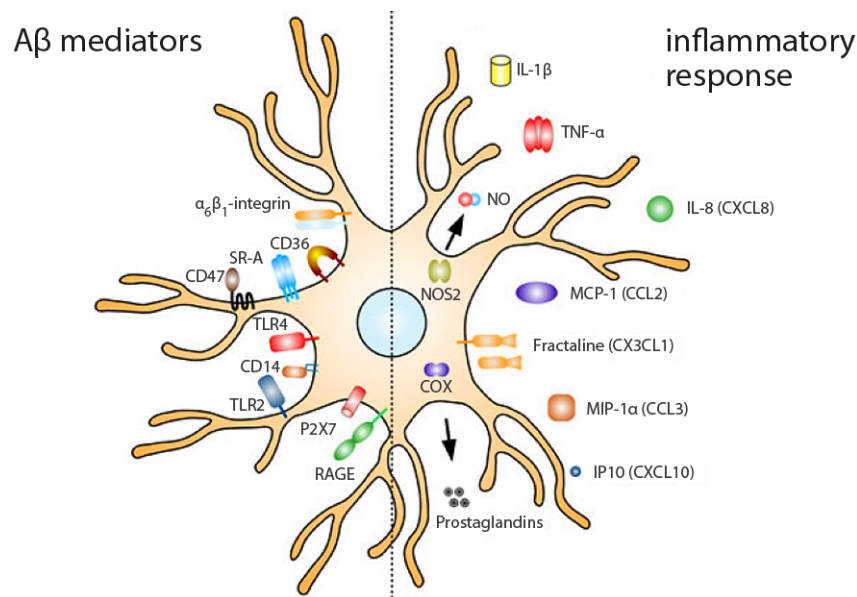


Abb. 5: A β -induzierte Aktivierung von Mikroglia und Monozyten

Mikroglia und Monozyten können über diverse Rezeptoren (links) A β binden, was zur Ausschüttung von verschiedenen Mediatoren (rechts) der Entzündungsreaktion führt. Aus [41].

2.3.2 Zelluläre Antwort

Die Neuroinflammation stützt sich hauptsächlich auf Elemente der angeborenen Immunantwort [42]. Dies deutet auch die Beteiligung von CD14, TLR2 und TLR4 an [48]. Auf zellulärer Ebene stellen Mikroglia, bei denen es sich um direkte Verwandte der Monozyten handelt, die Hauptvertreter dieser Entzündungsreaktion dar [42].

2.3.2.1 Rolle der Mikroglia

Während der Embryogenese wandern hämatopoetische myeloide Zellen aus den neu entstehenden Blutgefäßen in das sich entwickelnde Gehirn ein. Dort differenzieren sie sich zu Mikroglia, den ortsansässigen Makrophagen des ZNS [54]. Somit stellen sie einen wichtigen Vertreter des angeborenen Immunsystems in Gehirn und Rückenmark dar [41].

Mikroglia dienen der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirns und der neuronalen und synaptischen Funktionen. Bei pathologischen Veränderungen werden sie aktiviert und wandern in die Umgebung des geschädigten Gewebes ein – ähnlich wie Monozyten bzw. Makrophagen des peripheren Immunsystems. Anschließend tragen sie dazu bei, abgestorbene Neuronen und Zellüberreste zu entfernen [41] [55]. Als zentrale Immuneffektorzellen des ZNS verfügen sie über diverse Pattern-Recognition-Rezeptoren, zu denen auch die o.g. Scavenger- und Toll-like Rezeptoren sowie CD14 gehören. Diese sind für Mikroglia ein essentielles Werkzeug für das Auffinden und die schnelle Elimination von eindringenden Mikroorganismen und Fremdanitigenen [56].

Als Reaktion auf A β -Ablagerungen werden Mikroglia aktiviert, proliferieren und migrieren anschließend zu den Plaques [44]. CD14, TLR2 und TLR4 auf Mikroglia interagieren mit aggregiertem A β , was eine inflammatorische Reaktion auslöst und die Clearance von A β durch Mikroglia stimuliert. [56]. Die Fähigkeit von Mikroglia zur Phagozytose des Amyloids ist jedoch begrenzt, gleichzeitig sind sie aber Auslöser eines hohen Maßes an neurotoxischer Inflammation. Daher wird ihnen teilweise auch eine krankheitsfördernde Rolle in der Pathogenese der AD zugeschrieben. Dennoch können sie durch das Ausschütten von neurotrophen Molekülen auch positiv auf den Krankheitsverlauf einwirken [44].

Diese gegensätzlichen Funktionen der Mikroglia, die einerseits die A β -Ablagerungen beseitigen sollen, andererseits aber teils neurotoxische, proinflammatorische Produkte ausschütten, komplizieren mögliche Therapiestrategien [1].

2.3.2.2 Rolle peripherer Makrophagen im ZNS

Klassischerweise gilt das ZNS als immunprivilegiert. In letzter Zeit zeigte sich aber, dass eine geringe Zahl an peripheren Leukozyten sowohl physiologischerweise als auch im Verlauf von Krankheiten Teile des Parenchyms überwachen [54].

Zirkulierende mononukleäre Phagozyten sind dazu fähig, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und in das ZNS einzuwandern. Auch hier scheinen Chemokine eine wichtige Rolle zu spielen, indem sie die Migration dieser Monozyten aus dem Blut in das amyloidreiche Gehirn fördern. Dort können sie sich zu Mikroglia differenzieren, die zu geschädigten Gebieten wandern und A β -Plaques eingrenzen [44] [54] [56]. Somit verhalten sich diese neu rekrutierten Zellen in der Immunfunktion genauso wie die originären Mikroglia [56]. Experimentell wurde gezeigt, dass ein großer Teil der Plaque assoziierten Mikroglia ehemals aus dem Blut stammt. Diese Zellen werden insbesondere von den toxischen Formen A β ₄₀ und A β ₄₂ angezogen und aktiviert. Im Zuge der Immunantwort können sie die Amyloidablagerungen phagozytieren. Auf diese Weise wirken sie relevant dabei mit, die Progression der AD hinauszuzögern [44].

Bisher wird noch kontrovers darüber diskutiert, welche der beiden Arten der Mikroglia den größeren Anteil an der Beseitigung des A β hat. Wahrscheinlich haben die originären Mikroglia eine geringere Kapazität hinsichtlich der Clearance der A β -Ablagerungen als die rekrutierten Zellen [44] [56]. Denn obwohl angestammte Mikroglia und periphere Makrophagen den gleichen zellulären Ursprung haben, sind ihre Eigenschaften stark von der Umwelt, in der sie normalerweise leben, geprägt. Dabei verfügen die peripheren Makrophagen über ein größeres phagozytäres Potential als ihre ZNS-ständigen, eng regulierten Verwandten. Diese sorgen nämlich physiologischerweise für eine präzise Immunantwort, die an die fragilen Verhältnisse des ZNS angepasst sein muss [54]. Mit diesen Erkenntnissen wurde deutlich, dass rekrutierte Makrophagen eine relevante Rolle in der Mediation der Neuroinflammation spielen können. Daher liegt es nahe, ihre Funktion in den pathophysiologischen Vorgängen der AD zu beleuchten.

Während die originären Mikroglia eine verlängerte Lebensdauer bei nur begrenzter Teilungskapazität aufweisen, haben die monozytären Vorläufer, die sich zu Makrophagen differenzieren, einen dynamischeren Lebenszyklus. Daher und durch ihr physiologisches Vorkommen im Blut wären sie für experimentelle Zwecke und therapeutische Ansätze leicht und in großer Zahl zu erreichen [54].

Insofern wären periphere Monozyten nicht nur gut geeignet für ein *in vitro* Modell zur Erforschung der inflammatorischen Prozesse, die der AD zugrunde liegen. Dieses Wissen könnte auch dazu beitragen, therapeutische Strategien zu entwickeln, die jene spezifische Subpopulation aktivierter Makrophagen und ihre Funktionen modulieren.

2.3.3 Inflammatorische Mediatoren

Zytokine sind Signalpeptide in der Kommunikation der Zellen, die deren zentrale Funktionen regulieren. Dazu zählen Überleben, Proliferation, Differenzierung und Vermittlung der Immunantwort. Im Rahmen von Krankheiten, Gewebsschädigungen oder Infektionen steigt ihre Konzentration daher akut an [57]. Ihre chronische Produktion im ZNS führt jedoch zum pathologischen Bild der Neuroinflammation. Diese basiert u.a. auf einer Vielzahl inflammatorischer Mediatoren, die neurodegenerative und -protektive Effekte hervorrufen können. Ferner ist bei AD-Erkrankten die Konzentration von einigen Zytokinen wie TNF- α und IL-6 im Blut und von Chemokinen wie MCP-1 in Gehirn und Liquor erhöht. Die definitive Wirkung der beteiligten Mediatoren ergibt sich wahrscheinlich aber aus deren Zusammenspiel im lokalen, entzündlichen Milieu [58] [59] [60].

2.3.3.1 Rolle von TNF- α in der Neuroinflammation

Im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen gelten Mikroglia im ZNS als Hauptquelle von TNF- α , dessen Konzentration bei der AD in Serum, Liquor, Cortex und Gliazellen erhöht ist [57] [58] [59]. Die beschriebenen Effekte von TNF- α sind teils stark gegensätzlich. Einerseits agiert es wie in der Peripherie auch als präziser Koordinator der inflammatorischen Antwort. Darüber hinaus reguliert es einige wichtige physiologische Prozesse wie neuronale Entwicklung, Zellüberleben, synaptische Plastizität sowie Ionenhomöostase. Dementsprechend verhielt sich TNF- α im Tierversuch trophisch für hippocampale Neuronen und schützte kultivierte, primäre Neuronen vor den Auswirkungen von Glutamat, freien Radikalen und Amyloid β . Somit wirkt TNF- α *in vivo* und *in vitro* auch neuroprotektiv. Andererseits können im Rahmen der neuroinflammatorischen Dysregulation hohe Konzentrationen von TNF- α toxisch auf kortikale Neuronen wirken, die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöhen und die Rekrutierung von Leukozyten ins Gewebe verstärken. Konsequenterweise zeigen transgene Mäuse, die TNF- α überexprimieren, schwere Formen von Neuroinflammation, Neurodegeneration und Enzephalopathie. Ziele der mit TNF- α assoziierten Signalkaskade sind etwa der nukleäre Transkriptionsfaktor NF- κ B, der die Expression proinflammatorischer Elemente wie Komplement und Cyclooxygenase, aber auch gewisser Überlebensfaktoren reguliert. Auch über Aktivierung des JNK-Wegs

kann TNF- α auf Zellüberleben und Zelltod Einfluss nehmen. Der Gesamteffekt von TNF- α hängt wahrscheinlich von zahlreichen Faktoren ab wie spezifische Zellexpression, Timing, Ligandenkonzentration und Crosstalk verschiedener Signalwege [57] [58] [61].

2.3.3.2 Rolle von MCP-1 in der Neuroinflammation

Chemokine sind zytokinähnlich wirkende Botenstoffe, die im Rahmen von Entzündungen Chemotaxis, Extravasation und funktionale Modulation diverser Leukozytenarten induzieren. Sie vermitteln ihre biologische Aktivität über G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben transmembranären Helices. Das Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1 oder CCL2) ist eines der wichtigsten Chemokine für die Migration von Monozyten bzw. Makrophagen, die wiederum auch dessen Hauptquelle sind. So spielt es eine große Rolle in der physiologischen Immunüberwachung und -antwort. Chemokine samt Rezeptoren werden im Gesunden minimal exprimiert und erst als Antwort auf proinflammatorische Signale wie z.B. TNF- α oder IL-6 ausgeschüttet. Im AD-Gehirn sind die Chemokine und ihre Rezeptoren jedoch hochreguliert und tragen wahrscheinlich zur Plaque assoziierten Inflammation und Neurodegeneration bei. So wurde MCP-1 in reifen, senilen Plaques und in reaktiven Mikroglia lokalisiert. Außerdem wurde gezeigt, dass A β die Sekretion von MCP-1 aus humanen Monozyten und Mikroglia stimuliert. Als Folge können eine große Menge Mikroglia innerhalb des Gehirns und Monozyten aus dem Blut zum entzündlichen Focus rekrutiert werden, die so zur Neuroinflammation wesentlich beitragen können. MCP-1 und sein Rezeptor gelten bereits als möglicher Interventionspunkt zur Therapie verschiedener Krankheiten wie Multiple Sklerose, Rheumatoide Arthritis, Atherosklerose und Insulin resistenter Diabetes. So könnte es auch für die AD-Therapie einen erfolgversprechenden Ansatzpunkt darstellen [58] [62].

2.3.3.3 Rolle von IL-6 in der Neuroinflammation

IL-6 kann im ZNS neben Mikroglia auch von Astrozyten, Neuronen und Endothelien synthetisiert werden. Im erwachsenen ZNS weist es physiologisch eine sehr niedrige Konzentration auf. Diese steigt unter pathologischen Bedingungen stark an und ist in Cortex und Blut von AD-Patienten erhöht. Auch IL-6 werden im ZNS neben seiner

proinflammatorischen Rolle gegensätzliche trophische, neuroprotektive und antiapoptotische Wirkungen zugeschrieben. So wurde in Gegenwart von IL-6 eine Verbesserung des neuronalen Überlebens bei Hirnschäden und eine Reduktion von NMDA-vermittelter Toxizität beobachtet. Eine experimentell induzierte Überexpression von IL-6 erwies sich jedoch als schädlich und verschärfte die Neuroinflammation und ihre degenerativen Folgen [58] [59] [61]. Ziel der von IL-6 angeregten Signalkaskade ist unter anderem die Aktivierung von Janus-Kinasen. Diese stoßen verschiedene Transkriptionsfaktoren an, die u.a. die Proliferation und Hemmung der Apoptose über die Expression der dafür notwendigen Gene regulieren. Des Weiteren vermittelt IL-6 seine Effekte über MAP-Kinasen und den Ras/Raf-Signalweg, der beim Zellüberleben, aber auch bei Stressreaktionen der Zelle involviert ist. Ferner fördert IL-6 den PI3K/Akt Signalweg, wobei Akt das Zellüberleben über zelluläre Substrate, Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren und proapoptotische sowie antiapoptotische Proteine reguliert [57] [61].

2.4 Lipid Rafts

Lipid Rafts sind etwa 10-200 nm kleine, heterogene Mikrodomänen innerhalb der Plasmamembran, die reich an Sphingolipiden bzw. Gangliosiden und Cholesterin sind. Sie beheimaten und konzentrieren eine Vielzahl von Signal- und Transportproteinen. Somit stellen sie in der Membran funktionelle Kompartimente für lokal begrenzte Prozesse zur Verfügung und bieten eine Plattform für zelluläre Signalwege, die beispielsweise auch grundlegend für neuronale Funktionen sind. Aufgrund ihrer dynamischen Struktur ist ihre Protein- und Lipidkomposition stets variabel, so dass sich auch ihr Aufgabenbereich und die Art der übertragenen Signale ändern kann [32] [63].

Die Sphingolipide der Rafts interagieren über hydrophile Wechselwirkungen ihrer Kopfgruppen miteinander. Diese werden vom Cholesterin stabilisiert, das zusätzlich die Lücken zwischen den sperrigen Sphingolipiden füllt. Die straffe Interaktion zwischen Sphingolipiden und Cholesterin führt zur Separation von anderen Phospholipiden und zur lateralen Organisation dieser Mikrodomänen auf der Zellmembran [64] [65].

Wahrscheinlich sind es die enge Anordnung der Lipide und die entstehende Phasentrennung, die eine Unlöslichkeit der Lipid Rafts in nichtionischen Detergenzien wie Triton X-100 erzeugen. Durch diese Eigenschaft können Raft-Membrananteile aus Zellhomo-

genaten isoliert und aufgrund ihrer geringen Dichte von den restlichen Membranbestandteilen getrennt werden. Diese cholesterinreichen Produkte werden als Detergent-Resistant Membranes (DRM) bezeichnet und weisen typische Raft-Marker wie Flotillin und Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine auf [63] [66] [67]. Zu letzteren gehört auch der LPS-Rezeptor CD14, dem eine konstitutive Präsenz in Lipid Rafts nachgewiesen wurde [68]. Dagegen gilt das non-Raft-Protein Calnexin bei der DRM-Isolierung als Marker für die in Detergens löslichen Membranbestandteile [69] [70].

In der Pathogenese der AD wirken Lipid Rafts auf mehrere Arten mit. Sie begünstigen die Produktion von A β durch das Zusammenführen von APP mit BACE1 und γ -Sekretase-Komplex. Ihre beiden Komponenten Cholesterin und N-Acetylneuraminsäure enthaltende Ganglioside erleichtern zudem die Aggregation des A β , das in Folge an den Zellmembranen der Neuronen zu toxischen Oligomeren heranwächst. Außerdem beheimaten Lipid Rafts spezifische neuronale Rezeptoren wie PrP^C-, NMDA- und mGluR5-Rezeptoren. Über diese können die Oligomere neuronale Funktionsstörungen und Neurotoxizität vermitteln, die zur Abnahme der Gedächtnisleistungen und der kognitiven Fähigkeiten führen [32] [71].

Zur Signalübertragung greift das angeborene Immunsystem auch auf diese funktionellen Kompartimente zurück. So wurde gezeigt, dass die normalerweise nicht in Lipid Raft ansässigen Rezeptoren TLR2 und TLR4 nach Ligandenbindung durch laterale Diffusion in die Mikrodomänen rekrutiert und dort gehalten werden [68] [72] [73]. Vermutlich enthält die Zellmembran konstitutiv viele „kleine“ Rafts, die nach Stimulation miteinander verschmelzen und somit größere Domänen formen können. Diese Makrodomänen stellen dann eine wichtige Plattform für Signalwege dar, da sie über eine hohe lokale Konzentrierung dieser eben rekrutierten Rezeptoren – über ein sog. Clustering – verfügen, das die Signaltransduktion wesentlich erleichtern kann [66] [73] [74].

2.5 Saure Sphingomyelinase, Ceramid und Lipid Rafts

Die saure Sphingomyelinase (ASM) gehört zu einer Familie von Enzymen, die Sphingomyelin, das häufigste zelluläre Sphingolipid, unter Abspaltung von Phosphorylcholin zu Ceramid, einem weiteren Sphingolipid, hydrolysieren. Neben der ASM existieren mindestens drei weitere Sphingomyelinasen, die sich in pH-Optimum, der Verteilung in der Zelle oder der Abhängigkeit von einem Cofaktor unterscheiden [65] [75].

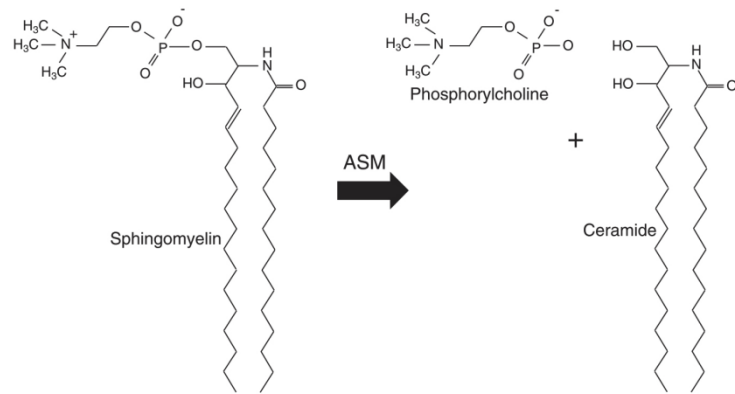


Abb. 6: Ceramidgeneration durch die saure Sphingomyelinase

Die ASM hydrolysiert Sphingomyelin zu Phosphorylcholin und dem bioaktiven Ceramid. Aus [75].

Von der ASM selbst existieren zwei Formen. Die sekretorische Variante s-ASM ist Zink abhängig und wahrscheinlich mit der Genese kardiovaskulärer Erkrankungen verbunden. Die für diese Arbeit relevante, intrazelluläre Form der ASM arbeitet hingegen Zink-unabhängig und befindet sich hauptsächlich in den sauren Lysosomen. Durch Zellstress oder Rezeptoraktivierung ausgelöst kann sich ihre Lokalisation jedoch zur Zelloberfläche hin verschieben. In der äußeren Schicht der Plasmamembran ist sie dann verantwortlich für die Initiierung verschiedener zellulärer Signalwege und kann so die Pathogenese diverser Krankheiten beeinflussen. Diese Funktion innerhalb der Signalwege kann sie v.a. durch ihre Fähigkeit ausüben, die Zellmembran neu zu organisieren [74] [75].

Dabei ändern die durch die ASM-Aktivität entstehenden Ceramidmoleküle die biophysikalischen Eigenschaften der Membran, indem sie sich spontan eng aneinanderlagern. Dieser Prozess findet höchstwahrscheinlich zu einem großen Teil in den bereits bestehenden Lipid Rafts statt, die reich an Cholesterin und an Sphingomyelin – dem Substrat der ASM – sind. Vermutlich verdrängen die weniger sperrigen und sehr dicht stehenden Ceramidmoleküle das Cholesterin von den Rafts. Diese werden so in ihrer Komposition erheblich verändert und entwickeln sich zu *ceramidreichen* Mikrodomänen [64] [65].

Innerhalb dieser Mikrodomänen wird durch die lokal veränderten biophysikalischen Eigenschaften der Membran oder auch durch direkte Interaktion zwischen Ceramid und Proteinen die Dichte der Proteine stark erhöht und auf diese Weise ein Clustering wichtiger Rezeptoren hervorgerufen [74] [75]. Zur Akkumulation der Rezeptoren trägt auch die Tendenz der ceramidreichen Mikrodomänen bei, spontan zu fusionieren und ceramidreiche Makrodomänen zu bilden [64] [65].

Ceramid, das u.a. durch die ASM produziert wurde, kann demzufolge zur Ausbildung, Stabilisation und Fusion von ceramidreichen Mikrodomänen beitragen, wodurch deren einzelne Pools an inaktiven mono- oder dimeren Signalproteinen zusammengeführt werden und aktive Oligomere entstehen [65] [75]. Zu diesen Signalproteinen gehören auch TLRs wie TLR2 und TLR4. Diese werden als Reaktion auf die Bindung eines Liganden durch Raft ständige Moleküle wie CD14 in die Rafts rekrutiert, wo sie größere Oligomere bzw. Cluster bilden. Dabei können sie wiederum auch heterotypisch mit CD14 assoziieren [72] [73]. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich aber zugleich auch um diejenigen, die für die Transduktion der A β -Toxizität mitverantwortlich sind [41]. Zusammenfassend besteht eine wesentliche, pathophysiologische Aufgabe der ASM auf der Zellmembran also darin, das Aufeinandertreffen von wichtigen Signalmolekülen innerhalb der Lipid Rafts zu organisieren, so dass die Schwelle für die Aktivierung diverser Signalwege – einschließlich der durch A β induzierten Effekte – herabgesetzt und die primären Signale amplifiziert werden [72] [74] [75].

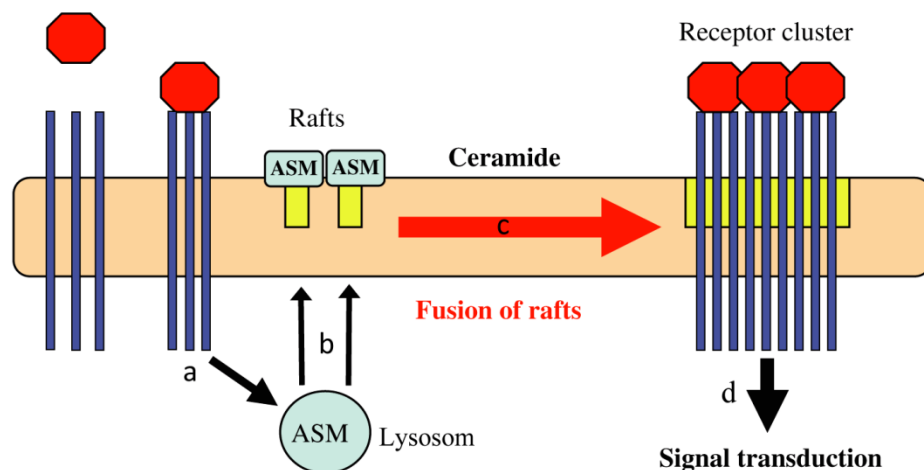


Abb. 7: Möglicher Mechanismus der Transduktion der A β -Toxizität durch die ASM

Als Reaktion auf Zellstress oder bestimmte Rezeptorsignale ist die ASM wahrscheinlich an der A β -induzierten Zytotoxizität beteiligt. Sie wird nach erfolgtem Stimulus (a) aus den Lysosomen auf die äußere Schicht der Zellmembran, insbesondere in die Lipid Rafts, verlagert (b). Dort produziert sie Ceramid, wodurch ceramidreiche Mikrodomänen entstehen und zu Makrodomänen verschmelzen (c). Auf diese Weise entstehen innerhalb dieser ceramidreichen Lipid Rafts Rezeptorcluster und inaktive monomere Signalproteine werden zu aktiven Oligomeren zusammengeführt. Als Folge kommt es zur Amplifikation des Primärsignals und teils toxischen Signalkaskaden (d). Modifiziert nach [74].

Für eine physiologische ZNS-Funktion scheint eine basale Aktivität der ASM jedoch essentiell zu sein. Die neuronale Bedeutung dieses Enzyms zeigt sich auch daran, dass seine Aktivität in den Gehirnen von Mäusen höher ist als in den anderen Organen.

Allerdings wurde in den Gehirnen von AD-Erkrankten im Vergleich mit denen altersgleicher Gesunder eine gesteigerte Aktivität der ASM und erhöhte Ceramidspiegel gefunden. Zusätzlich wurde in Versuchen an Ratten durch die Anwesenheit von A β eine stärkere Expression der ASM induziert. Daher gilt sie als mögliche Ursache für die erhöhten Ceramidspiegel und deren Folgen im ZNS von AD-Kranken [75] [76].

2.6 Fragestellung

Ein wesentliches Merkmal der AD ist die chronische Neuroinflammation, die zum Untergang von Nervenzellen führt. Ein besseres Verständnis der entzündlichen Reaktionen könnte Ansatzpunkte dazu liefern, wie ihre schädliche Wirkung auf die Neuronen reduziert und der Krankheitsverlauf gemildert werden kann.

Dafür soll anhand von Makrophagen, die Stimulation über TLR2/TLR1 und über TLR4 mit CD14 durch Pam3CSK4, LPS und humanes A β ₄₂ erfahren, erforscht werden, inwieweit eine Modulation der zellulären ASM-Aktivität eine Änderung der freigesetzten inflammatorischen Mediatoren und somit ihrer entzündlichen Reaktion hervorruft.

Aufgrund der reduzierten ASM-Aktivität sollte die Ceramidsynthese betroffen sein, was wiederum die Bildung der Lipid Rafts beeinflussen würde. Somit ist zu erwarten, dass sich auch die Eigenschaften der Lipid Rafts ändern.

- Wie wirkt sich also die Defizienz der sauren Sphingomyelinase in humanen THP-1-Makrophagen auf deren Produktion der inflammatorischer Mediatoren TNF- α , MCP-1 und IL-6 und somit das inflammatorische Milieu aus, wenn sie an den für die AD relevanten Rezeptoren TLR4 mit CD14 sowie TLR2 mit TLR1 stimuliert werden?
- Wie wirkt sich dazu die Defizienz der sauren Sphingomyelinase als Vergleich in murinen Bone Marrow-Derived Macrophages auf deren Produktion der inflammatorischer Mediatoren TNF- α und MCP-1 und somit das inflammatorische Milieu aus, wenn sie an den für die AD relevanten Rezeptoren TLR4 mit CD14 sowie TLR2 mit TLR1 stimuliert werden?
- Wie wirkt sich die Defizienz der sauren Sphingomyelinase auf die Dichte der Lipid Rafts als Anhaltspunkt für ihre Komposition aus?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Instrumente

Tab. 1: Verwendete Geräte und Instrumente

Bezeichnung	Firma
4K15 Tischkühlzentrifuge	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Deutschland
Accu-Jet Pipette Controller	BrandTech Scientific, Essex, USA
Axiovert 25 inverses Mikroskop	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Eclipse E600 Microscope	Nikon, Alzenau, Deutschland
Eismaschine	Eurfrigor Ice Makers Srl, Lainate, Italien
General Rotator, STR4	Stuart Scientific, Staffordshire, UK
HERAcell 150i CO2 Incubator	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
HERAsafe HS 12, mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse II	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kojair KR-200 mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse II	Kojair Tech Oy, Vilppula, Finnland
Midi agarose chamber, horizontal for gel size 12 x 14 cm	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Mini Trans-Blot cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Mini-PROTEAN 3 Cell electrophoresis system	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Multiband UV-Fluorescent Table	Peqlab, Karlsruhe, Deutschland
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Optima LE-80K Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Pipetten Research (0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PowerPac 200 power supply for electrophoresis system	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Rocky 3D	Labortechnik Fröbel, Lindau, Deutschland
Rotor SW 41 Ti, Swinging-Bucket, Titanium Head and Buckets, 6 x 13.2 ml	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Sunrise microplate reader for ELISA assays	TECAN, Männedorf, Schweiz
Thermoblock TDB-120	BioSan, Riga, Lettland
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen, Deutschland
Savant DNA 110 SpeedVac System for vacuum centrifuge	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland

3.1.2 Gebrauchsmaterialien

Tab. 2: Verwendete Gebrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma
Amersham Hyperfilm ECL chemiluminescence film	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Blaubrand-Zählkammer (Neubauer)	Brand, Wertheim, Deutschland
Blotting Paper Grade GB003	Whatman, Dassel, Deutschland
Deckgläschen 10 x10 mm	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Einmalkanüle Sterican (24G, 27G)	B. Braun Melsungen, Tuttlingen, Deutschland
Gewebekulturschalen 100 x 20 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikrotestplatte aus PS mit 96 flachen Vertiefungen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mini-PROTEAN 3 Short Plates	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Mini-PROTEAN 3 Spacer Plates with 1,5 mm spacers	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Mini-PROTEAN Comb (15-well; 1,5 mm Kamm)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Multiwell cell culture plate (24 well, 48 well)	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Parafilm M all-purpose laboratory film	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Protran Nitrocellulose transfer membrane (Protran BA83, 0.2 µm)	Whatman, Dassel, Deutschland
Reagenz- und Zentrifugenröhren mit konischem Boden, Schraubverschluss aus HD-PE (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safe-Lock Gefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen Injekt Solo (5 ml, 20 ml)	B. Braun Melsungen, Tuttlingen, Deutschland
Spritzenfilter 0,22 µm Rotilabo	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ultra-Clear Tubes 344059; 13,2 ml; 14 x 89 mm	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Zellkulturflaschen mit roter PE-Belüftungskappe (75 cm ² , 175 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

3.1.3 Antikörper, Sets und Enzyme

Tab. 3: Verwendete Antikörper, Sets und Enzyme

Bezeichnung	Firma
Antikörper 553738 Rat polyclonal IgG anti Mouse CD14	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Antikörper ab22595 Rabbit polyclonal IgG anti Calnexin	Abcam, Cambridge, UK

Bezeichnung	Firma
Antikörper ab41927 Rabbit polyclonal IgG anti Flotillin 1	Abcam, Cambridge, UK
Antikörper ab47840 Rabbit polyclonal IgG anti Mouse TLR2	Abcam, Cambridge, UK
Antikörper AF2616 Goat polyclonal IgG anti Human TLR2	R&D systems, Minneapolis, USA
Antikörper P0160 Rabbit polyclonal anti Goat IgG, HRP-conjugated	Dako, Hamburg, Deutschland
Antikörper P0450 Rabbit polyclonal anti Rat IgG, HRP-conjugated	Dako, Hamburg, Deutschland
Antikörper W4011 Goat polyclonal anti Rabbit IgG, HRP-conjugated	Promega, Madison, USA
BamHI Restriktionsendonuklease supplied with NEBuffer 3 (10X), BSA (100X)	New England Biolabs, Ipswich, USA
BglII Restriktionsendonuklease supplied with NEBuffer 3 (10X)	New England Biolabs, Ipswich, USA
Human IL-6 DuoSet ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse CCL2 (MCP-1) ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience, San Diego, USA
Mouse TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience, San Diego, USA
OptEIA Human MCP-1 ELISA Set	BD Biosciences, San Diego, USA
OptEIA Human TNF ELISA Set	BD Biosciences, San Diego, USA
Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

3.1.4 Substanzen und Chemikalien

Tab. 4: Verwendete Substanzen und Chemikalien

Bezeichnung	Firma
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs, Ipswich, USA
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese Lösung 30%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Amyloid β_{42}	B. Penke, Universität Szeged, Ungarn
Antibiotic-Antimycotic (100X) liquid	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Blasticidin S hydrochloride ($\geq 98.0\%$)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Bromophenol Blau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
CHAPSO (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

Bezeichnung	Firma
ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa) #P7709S	New England Biolabs, Ipswich, USA
Complete protease inhibitor cocktail tablets	Roche, Mannheim, Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), High Glucose, L-Glutamine, Phenol Red, Liquid	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid Lösung 1% (10 mg/ml)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FCS (Fetal calf serum)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
GBX Developer and Replenisher	Kodak, Rochester, USA
GBX Fixer and Replenisher	Kodak, Rochester, USA
Gel Loading Dye, Blue (6X)	New England Biolabs, Ipswich, USA
Gibco RPMI 1640 Medium, L-Glutamine, Phenol Red, Liquid	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin 2.0 (10 mM Glycine-HCl, pH2.0)	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ham's F12 Medium, L-Glutamine, 25 mM HEPES, 1,176 g/l NaHCO ₃ , without Phenol Red	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
HCl (Salzsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HFIP (1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol, ≥99,8%)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Isopropanol	Hedinger, Stuttgart, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
KCl (Kaliumchlorid, CELLPURE®)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat, ≥99 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
LPS von E. Coli (Serotype O111:B4)	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
MES (2-[N-Morpholino]-ethansulfonsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O (di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, ≥99,5 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na ₃ VO ₄ (Natrium orthovanadate)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
NaCl (Kochsalz; CELLPURE®)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaF (Natriumfluorid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaHCO ₃ (Natriumbicarbonat)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Bezeichnung	Firma
OptEIA TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences, San Diego, USA
Opti-MEM I Reduced Serum Medium, Liquid	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Pam3CSK4	InvivoGen, San Diego, USA
PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
PMSF (Phenylmethanesulfonylfluoride)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Rotiphorese 10x TBE-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Trypanblau-Lösung 0,4%, flüssig, steril-gefiltert	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05%	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
TWEEN 20	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Western lightning plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate: Oxidizing reagent plus and Enhanced luminol reagent plus	Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

3.1.5 Salzlösungen

Tab. 5: Salzlösungen bzw. -puffer

	PBS (in dH ₂ O)	TBS (in dH ₂ O)
NaCl	137 mM	150 mM
KCl	2,7 mM	-
Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	10 mM	-
KH ₂ PO ₄	2,0 mM	-
Tris-Base	-	50 mM
	MBS (in dH ₂ O)	
NaCl	150 mM	
MES	25 mM	

3.1.6 Stimulantien

Neben humanem Amyloid β_{42} wurden Pam3CSK4 und LPS als Stimulantien eingesetzt. Nach Herstellerangabe handelt es sich bei Pam3CSK4 um ein synthetisches tripalmitoyliertes Lipopeptid, das den acylierten Amino-Terminus von bakteriellen Lipoproteinen nachbildet. Die Erkennung von Pam3CSK4 wird über TLR2 vermittelt, welches die Signale zusammen mit TLR1 transduziert.

LPS ist eine Hauptkomponente der äußeren Zellwand von Gram(-)-Bakterien und ein starker Aktivator des Immunsystems. Die Erkennung von LPS wird mit Hilfe von CD14 v.a. über TLR4 vermittelt [50]. Nach Herstellerangabe wirkt das verwendete LPS als ein spezifischer Aktivator von TLR4 ohne Auswirkung auf TLR2.

3.1.7 Zelltypen und Organismen

3.1.7.1 THP-1-Zellen

Bei den THP-1-Zellen handelt es sich um Suspensionszellen einer Zelllinie, die von einer humanen Monozytenleukämie abstammen und ihre monozytären Eigenschaften beibehalten haben [77]. Sie wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen.

3.1.7.2 ASM-Mäuse

Zur Verfügung standen Mäuse mit verschiedenen Genexpressionen der ASM: Wild-Type (wt), (+/-) und (-/-). Die Mäuse stammen aus Labor eigener Zucht mit C57BL6/J-Hintergrund.

3.1.8 Plasmidvektoren

Freundlicherweise wurden die zwei erforderlichen Plasmide (basierend auf pcDNA™6.2-GW/EmGFP/miR Validated miRNA Vector; Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) mit Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen BamHI und BglII zur Verfügung gestellt. Beide Plasmidvektoren verfügten über einen Cytomegalievirus-Promoter (P_{CMV}). Durch die starke Affinität der RNA-Polymerase II zu diesem Promotor wird in den meisten Säugetierzellen eine hohe konstitutive Expression der gewünschten Gene erreicht. Zusätzlich befanden sich auf beiden Plasmiden eine Blasticidin-Resistenz zur Selektion der Zellen sowie das Emerald Green Fluorescent Protein (EmGFP) für den optischen Nachweis der Transfektion.

In das ASM-Knock-Down (KD)-Plasmid war ein sog. Insert kloniert, das die Basensequenz der pre-miRNA für den KD der ASM enthielt. Das Kontroll-KD-Plasmid enthielt eine pre-miRNA, die kein bekanntes Gen als Zielstruktur aufweist, und diente

dazu, die Bedingungen während der Experimente mit den zwei verschiedenen Zell-Typen anzugleichen.

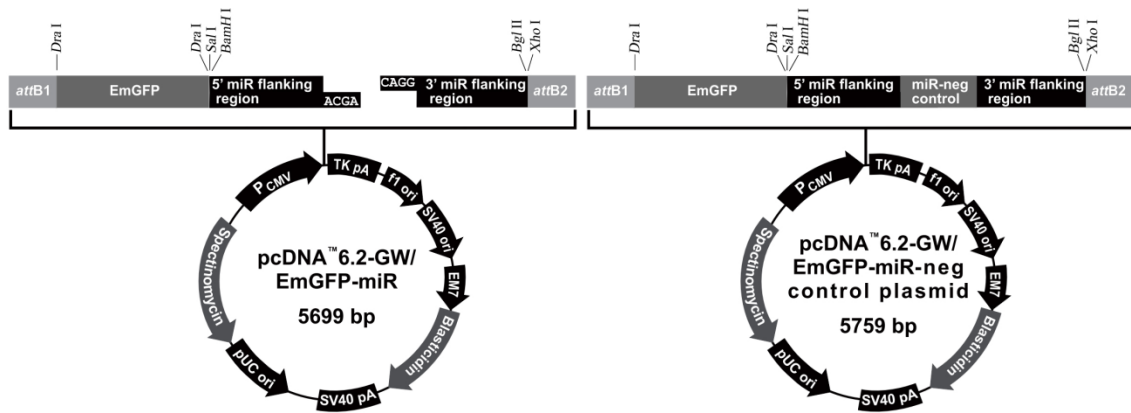


Abb. 8: Struktur der Plasmidvektoren

Gezeigt sind die Grundstrukturen der erworbenen Plasmide von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland). Map and Features des pcDNA™6.2-GW/ EmGFP-miR (linke Seite). Map and Features des pcDNA™6.2-GW/ EmGFP-miR-neg control plasmid (rechte Seite).

Tab. 6: Verwendete Restriktionsendonukleasen

	BamHI	BglII
Schnittstelle	5'...G GATCC...3'	5'...A GATCT...3'
	3'...CCTAGG...5'	3'...TCTAGA...5'

3.2 Methoden

3.2.1 Entwickeln von THP-1-Knockdown-Zellen

Die RNA-Interferenz (RNAi) ermöglicht es, die Expression von Genen zu vermindern und als Folge die Funktion von Proteinen in Zellen zu erforschen.

Auf posttranskriptioneller Ebene wurde die Produktion der sauren Sphingomyelinase verringert, indem ein Plasmid in die Zellen eingebracht wurde. Das ASM-Plasmid enthielt u.a. auch ein etwa 68 Basenpaare langes Insert, das neben einer sog. Haarnadelstruktur-Sequenz auch die Sequenz der ASM und deren komplementäre Basenreihenfolge beinhaltete. Nach der Transkription dieser Nukleotidsequenz bildete sich eine doppelsträngige RNA mit Haarnadelstruktur (shRNA). Diese pre-miRNA genannte Struktur wurde durch Ribonukleinasen zu kleinen einzelsträngigen miRNAs prozessiert, die in das RNA-induced silencing complex (RISC) aufgenommen wurden.

Das RISC wiederum sorgte nach Bindung der ASM-mRNA für deren Abbau und somit für eine verminderte Proteinexpression der ASM in der Zelle.

3.2.1.1 Insertionskontrolle der Plasmidvektoren - Agarose-Gelelektrophorese

Durch Agarose-Gelelektrophorese (AGE) können Nukleinsäurestränge entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Je größer ihre Masse ist, desto langsamer bewegen sie sich entlang eines elektrischen Feldes durch die Poren des Agarosegels.

Die AGE diente dem Nachweis der o.g. Insert-Nukleotide in den Plasmiden. Zur Herstellung des 1% Agarose-Gels wurden 1000 mg Agarosepulver in 100 ml Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) mit 2 µl 1%igem Ethidiumbromid vermischt.

Tab. 7: Restriction Digest der Plasmide durch BamHI und BglII

	Menge o. Konzentration
Plasmid-DNA	5 µg
NEBuffer 3 (10x)	3 µl
BSA (NEBiolabs)	100 µg/ml
BamHI	20 units bzw. 1µl
BglII	20 units bzw. 1µl
ddH ₂ O	Auf 25 µl aufgefüllt

Um die gesuchte Nukleotidsequenz aus dem Plasmid zu trennen, wurden die 25 µl Proben (s. Tab. 7) zur Verdauung durch die beiden Restriktionsendonukleasen an den o.g. Schnittpunkten an der Plasmidstruktur bei 37°C 2 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden je 10 µl der beiden Proben mit 2 µl Gel Loading Dye (6x) vermischt und neben der DNA Ladder in die Taschen des Agarosegels geladen. Das Gel wurde in eine mit TBE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und ca. 1 Stunde eine Spannung von 100 V angelegt. Die DNA-Banden wurden auf dem UV-Fluorescent Table betrachtet.

3.2.1.2 Transfektion der THP-1-Zellen

Das Transfizieren humaner Zellen mit Plasmid-DNA dient der Analyse funktionaler Mechanismen und wurde mit dem kommerziellen Reagenz Lipofectamine 2000 durchgeführt.

In zwei Vertiefungen einer 24-well Zellkulturschale wurden 5×10^5 THP-1-Wild-Type-Zellen in 500 µl sterilem Opti-MEM mit 10% FCS ausplattiert. In jeweils 50 µl Opti-MEM wurde 1 µg Plasmid-DNA eines Typs vorsichtig gelöst. 6 µl Lipofectamine 2000 Transfection Reagent wurden in 100 µl Opti-MEM vermengt und 5 Minuten bei

Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden je 50 µl der verdünnten DNA mit 50 µl Lipofectamine-Lösung vermischt und bei RT 20 Minuten inkubiert. Die jeweils 100 µl entstandenen Nukleinsäure-Lipofectamin-Komplexe wurden den THP-1-Wild-Type-Zellen zugegeben und diese 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Darauf wurden die Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen mit RPMI 1640 mit 10% FCS und 1% Antibiotic-Antimycotic kultiviert. Nach weiteren 24 Stunden wurde dem Medium zur Selektion und Etablierung einer stabilen transfizierten Zelllinie 12 µg/ml Blastocidin zugesetzt und für 4 Wochen beibehalten. Alle 3 Tage wurde das Medium gewechselt.

3.2.1.3 Nachweis der Transfektion - Fluoreszenzmikroskopie

Zum Nachweis der Transfektion der THP-1-Zellen wurden diese auf einen Objektträger geladen und unter dem Mikroskop (Nikon Eclipse E600 Microscope mit geeignetem Aufbau) betrachtet. Anschließend wurde ein Filter eingestellt, um nur das Licht der Wellenlänge 509 nm zu erhalten, das vom Emerald GFP der transfizierten Zellen emittiert wurde.

3.2.2 BMDM- und Gewebebegewinnung aus ASM-Mäusen

Zur Gewinnung von Bone Marrow-Derived Macrophages (BMDMs) und Hirngewebe wurden die Mäuse der o.g. Typen mit Isofluran eingeschlafert und in 70% Ethanol getaucht. Anschließend wurden sie zügig transkardial mit einer 24G-Nadel mit etwa 20 ml PBS perfundiert.

Um das Gehirn zu isolieren, wurde der Kopf abgetrennt und die Schädeldecke vorsichtig geöffnet. Daraufhin wurde das Gehirn entnommen und in einer Petrischale das Cerebellum abgetrennt. Anschließend wurde es in beide Hemisphären geteilt und diese jeweils in 1,5 ml Tubes schockgefroren und bis zur Nutzung bei -80°C gelagert.

Zur Isolierung der Makrophagen aus dem Knochenmark wurden die Beine der Maus von Beckenknochen und Fuß separiert und von den Weichteilen befreit. So wurden Femora und Tibiae entnommen. Diese wurden in PBS gesammelt und an den Enden aufgeschnitten. Das Knochenmark wurde mit einer 24G-Nadel in eine weitere Kulturschale mit PBS gegeben. Anschließend wurde es mit der Nadel im PBS suspendiert und für 8 min bei 300xg und 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Pellet mit 2 ml hypotonem

Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und 1 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 6 ml sterilem PBS wurde unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in DMEM + 10% FCS + 1% Antibiotic-Antimycotic resuspendiert und im Inkubator 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium durch dasselbe mit jedoch zusätzlich 20% L929 konditioniertem Medium ersetzt, um eine Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen zu erreichen. Nach etwa 2 Wochen konnten die BMDMs für Experimente genutzt werden.

Tab. 8: Zusammensetzung des Erythrozyten-Lysepuffers

	Konzentration
Ammoniumchlorid	0,156 M
Kaliumhydrogencarbonat	0,01 M
EDTA	0,1 mM

3.2.3 Präparation der A β -Peptide

Humanes Amyloid β_{42} wurde in gefriergetrockneter Form vom Department of Medical Chemistry der Universität Szeged zur Verfügung gestellt. Die Arbeitsgruppe um B. Penke veröffentlichte zu Synthese und Charakterisierung des A β eine ausführliche Beschreibung [78]. Zuerst wurde das A β_{42} deaggregiert, indem 1 mg A β_{42} für 1 Stunde in 0,5 ml HFIP gelöst wurde. Anschließend wurde das HFIP durch Vakuum-Zentrifugation im SpeedVac-System für 2,5 Stunden bei RT entfernt. Die Peptide wurden in 40 μ l DMSO gelöst und danach auf die Konzentration von 100 μ M in Ham's F12 Medium verdünnt. Nach 1 Woche Inkubation bei 37°C wurden sie für die Experimente genutzt.

3.2.4 Zellkulturarbeit

Tab. 9: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Zellkulturmedium RPMI: (THP-1-KD-Zellen)	RPMI 1640 Medium	445 ml
	FCS	50 ml
	Antibiotic-Antimycotic	5 ml
Zellkulturmedium DMEM (BMDMs)	DMEM	345 ml
	FCS	50 ml
	Antibiotic-Antimycotic	5ml
	L929-Zell-Überstand	100 ml

Das FCS wurde mit einem 0,22 μ m Spritzenfilter gefiltert und das Medium bei 4°C gelagert.

3.2.4.1 THP-1-KD-Zellen

Beide Typen der transfizierten THP-1-Zellen wurden in RPMI-Zellkulturmedium mit 6 µg/ml Blasticidin bei 37°C und 5% CO₂ in Zellkulturflaschen mit 75cm² und 175 cm² kultiviert. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt, vor Versuchen 1 Tag vorher.

Zur Stimulierung der beiden Zelllinien wurden pro Zelltyp jeweils 500 µl Zellsuspension, bestehend aus RPMI-Medium mit 10 nM PMA und 6 x 10⁵ THP-1-Zellen, in eine Vertiefung der 48-well Mikrottestplatte pipettiert. Die Platten wurden anschließend 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, so dass sich die Zellen zu Makrophagen differenzierten und am Boden der Vertiefung adhärten. Danach wurde der Überstand entfernt und jeweils 500 µl Zellmedium für weitere 24 Stunden Inkubation hineinpipettiert. Nach erneutem Entfernen des Überstands wurden je Vertiefung 200 µl Zellkulturmedium als Kontrolle und zur Stimulation mit zusätzlich 1,0 µg/ml Pam3CSK4, 1,0 µg/ml LPS oder 10 µM Aβ₄₂ hineingegeben und 24 Stunden bis zum ELISA inkubiert.

3.2.4.2 Murine BMDMs

Die BMDMs wurden in DMEM-Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ in 10 cm Gewebekulturschalen kultiviert. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt, vor Versuchen 1 Tag vorher. Für Experimente wurden die Zellen mit PBS gewaschen und ca. 8 min mit 0,05% Trypsin-EDTA von der Kulturschalen-Oberfläche gelöst.

Die Stimulierung der BMDMs erfolgte im Vorfeld zum ELISA nach demselben Prinzip wie bei den THP-1-Zellen. Dazu wurden pro Vertiefung 2 x 10⁵ Zellen auf eine 48-well Mikrottestplatte in 200 µl DMEM-Medium zur Kontrolle und zur Stimulation mit jeweils 1,0 ng/ml sowie 10 ng/ml Pam3CSK4 bzw. LPS oder 5 µM sowie 10 µM Aβ₄₂ ausgesät.

3.2.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Durch das antikörperbasierte Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) können durch enzymatische Farbreaktion Antigene nachgewiesen werden.

Mit Hilfe kommerziell erhältlicher ELISA-Sets konnte die Konzentrationen von TNF-α, MCP-1 und IL-6 im Überstand der stimulierten THP-1-Zellen sowie die Konzentrationen von TNF-α und MCP-1 im Überstand der stimulierten BMDMs ermittelt werden.

Dies geschah gemäß den Protokollen des entsprechenden Herstellers. Für das Verdünnungsverhältnis der jeweiligen Antikörper bzw. der Standardverdünnungsreihe wurden die chargenspezifischen Instruktionen herangezogen.

1 Tag vor der Messung wurden je 100 µl Capture-Antikörper gelöst im Coating-Puffer in die Vertiefungen der 96-well Mikrowelltestplatten pipettiert. Diese wurden mit Parafilm versiegelt und so über Nacht bei 4°C gecoatet.

Nach Absaugen der Wells wurden sie 3-mal mit mindestens 300µl Wash-Puffer gewaschen, wobei nach jedem Mal der Puffer möglichst komplett entfernt wurde. Nach dem letzten Waschgang wurden die Platten umgedreht und auf Papiertüchern abgeklopft.

Anschließend wurden die Testplatten mit 200 µl Assay-Diluent pro Vertiefung befüllt, versiegelt und so 1 Stunde bei RT geblockt.

Danach wurden sie 5-mal nach dem o.g. Prinzip gewaschen. In die für die Proben vorgesehenen Vertiefungen wurden 50 µl des Assay-Diluent pipettiert und diese in Folge mit je 50 µl des Überstands der stimulierten Zellen aufgefüllt. Jeweils 100 µl der Standardverdünnungsreihe (0 - 500 pg/ml) wurden in die dafür zugewiesenen Wells pipettiert. Danach wurden die Platten versiegelt und 2 Stunden bei RT inkubiert.

Die Platten wurden 5-mal gewaschen. Darauf wurden 100 µl des Detection-Antikörpers und Streptavidin-HRPs in Assay-Diluent verdünnt und in die entsprechenden Vertiefungen gegeben. Die Platten wurden versiegelt und 1 Stunde bei RT inkubiert.

Nachfolgend wurden sie 7-mal gewaschen. In jede Vertiefung wurden 100 µl der Substratlösung gegeben, die Platten anschließend zum Mischen vorsichtig angetippt und 30 Minuten bei RT im Dunkeln bebrütet.

Anschließend wurden zusätzlich 50 µl Stop-Lösung in jede Vertiefung pipettiert und innerhalb von 30 Minuten die Absorption bei 450 nm ausgelesen. Die Referenzmessung erfolgte bei 570 nm und wurde von den Ergebnissen mit 450 nm subtrahiert. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte anhand der Standardverdünnungskurve jeweils mit Hilfe der in den Ergebnissen angegebenen Software.

Beim Human IL-6 DuoSet von R&D wurde der Detection-Antikörper separat in 100 µl Assay-Diluent hinzugegeben und nach Versiegeln 24 Stunden lang bei 4°C inkubiert. Nach 5-maligem Waschen wurden die Platten dann mit 100 µl Streptavidin-HRP in Assay-Diluent 20 Minuten bei RT im Dunkeln bebrütet.

Bei den eBioscience-Sets wurde der Detection-Antikörper ebenso separat in 100 µl Assay-Diluent hinzugegeben und 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach 5-maligem Waschen wurden die Platten mit 100 µl Avidin-HRP in Assay-Diluent 30 Minuten bei RT im Dunkeln bebrütet.

Beim OptEIA human TNF Set wurden aufgrund eines schwachen Signals 100 µl anstelle 50 µl des Zellüberstandes verwendet, die Proben also nicht verdünnt.

Tab. 10: Puffer und Lösungen für ELISA

	BD OptEIA Sets	R&D DuoSet
Coating-Puffer	0,1 M Natriumbicarbonat	PBS
Assay Diluent	PBS + 10% FCS	PBS + 1% BSA
Wash-Puffer	PBS + 0,05% TWEEN 20	PBS + 0,05% TWEEN 20
Substratlösung	TMB Substrate Reagent Set	TMB Substrate Reagent Set
Stop-Lösung	2 N H ₂ SO ₄	2 N H ₂ SO ₄

Bei den eBioscience-Sets gehörten Coating Buffer, Assay Diluent und Substratlösung zum Lieferumfang, Wash-Puffer und Stop-Lösung wurden dieselben wie bei BD oder R&D genutzt.

3.2.6 Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) mit Saccharose

Für die Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) wurden 40 Millionen THP-1-Zellen oder jeweils die linke Hemisphäre der o.g. Mäuse herangezogen. Zur Isolierung der Lipid Rafts wurde das Zellmaterial auf Eis mit 4°C kühlen Puffern bearbeitet. Beide Probenarten wurden zügig in TBS mit 1% Triton X-100 und die Hemisphären daneben auch in MBS mit 1% CHAPSO homogenisiert. Zur Proteaseninhibition wurde den Puffern je 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail, 1mM PMSF, 5mM NaF und 1mM Na₃VO₄ zugesetzt.

Die Proben wurden zur Homogenisierung jeweils 20-mal durch eine 24G-Nadel gezogen und anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden sie 10 Minuten bei 1000xg und 4°C zentrifugiert und der postnukleäre Überstand entnommen. Nachfolgend wurde der gesamte Überstand in ein Safe-Lock Gefäß transferiert und entweder bei -80°C eingefroren oder direkt für die DGZ genutzt.

Nachdem 1 ml des postnukleären Überstandes auf den Boden der Ultrazentrifugen-Tubes pipettiert worden waren, wurde dieser mit 1 ml 83% Lösung (w/v) von Saccharose in – je nach zuvor genutztem Puffer – TBS oder MBS vermischt. Ein diskontinuierlicher 5-35-41,5% Saccharose-Gradient wurde erstellt, indem 6 ml einer 35% Saccharose in TBS/MBS-Lösung und anschließend 4 ml einer 5% Saccharose in

TBS/MBS-Lösung aufgeschichtet wurden. Im Anschluss wurden die befüllten Tubes 18 Stunden bei $38.000 \text{ U} \times \text{min}^{-1}$ und 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Nachfolgend wurden den Tubes von oben nach unten insgesamt 12 Fraktionen von je 1 ml entnommen und entweder bei -80°C eingefroren oder direkt weiter prozessiert.

3.2.7 Proteinbestimmung in den DGZ-Fraktionen des Maus-Großhirns

Mit Hilfe des Protein Assays nach der photometrischen Methode von Bradford [79] wurde die Konzentration der löslichen Proteine in den DGZ-Fraktionen der Maus-Hemisphären bestimmt. Als Standard diente das bovine Serum-Albumin.

Von der Standardverdünnungsreihe (0 – 500 $\mu\text{g/ml}$) und den Proben aus den einzelnen Fraktionen wurden je 10 μl in eine Vertiefung einer 96-well Mikrowelltestplatte pipettiert und mit je 200 μl des Dye Reagents (1x) sorgfältig vermischt. Die Absorption wurde bei 595 nm mit dem Microplate Reader ausgelesen und die Auswertung erfolgte anhand der Standardverdünnungskurve mit Hilfe von Microsoft Excel 2010.

3.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der Natrium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine anhand ihrer elektrophoretischen Mobilität voneinander getrennt werden. Durch Behandeln der Proteine mit SDS weisen sie dieselbe negative Ladung pro Masse auf. Daher bewegen sie sich im elektrischen Feld abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell durch die Gelmatrix und können so aufgetrennt werden.

Ein 1,5 mm dickes Gel bestand aus dem oberen Anteil des Stacking Gels zum Beladen und dem unteren Anteil des Separating Gels für die Auftrennung der Proteine. Zuerst wurde das Separating Gel gegossen und Isopropanol darüber geschichtet, um später eine glatte Trennlinie zwischen den beiden Gelarten zu erhalten. Nach der Polymerisation des Separating Gels wurde das Isopropanol entfernt und das Stacking Gel aufgeschichtet. Nachdem die Mini-PROTEAN 3 Elektrophoresekammer mit SDS-PAGE Puffer befüllt wurde, wurden zwei Gele geladen.

20 μl Probe aus den jeweiligen Fraktionen der DGZ wurden mit 10 μl Sample Loading Buffer (3x) vermischt und 5 Minuten bei 95°C im Thermoblock erhitzt. Anschließend wurden die SDS behandelten Proben kurz auf Eis abgekühlt und etwaige Reste aus dem Deckel des Safe-Lock Gefäßes zentrifugiert.

Die Taschen der Gele wurden mit 10 μ l Proteinmarker (ColorPlus Prestained Protein Marker, New England Biolabs, P7709) bzw. je 30 μ l SDS behandelte Proben beladen und die Kammer mit 120 V bei $V=\text{const.}$ und ca. 0,20 A etwa 120 Minuten betrieben.

Tab. 11: Zusammensetzung des SDS-PAGE Gels

	Stacking Gel 5%	Separating Gel 10%
Acrylamid/Bisacrylamid 30%	630 μ l	3,225 ml
Tris HCl pH 6,8	1,41 ml	0
Tris HCl pH 8,8	0	3,75 ml
H ₂ O bidest.	1,65 ml	2,475 ml
20% SDS	18,8 μ l	48,75 μ l
TEMED	4,5 μ l	12 μ l
10x APS	37,5 μ l	97,5 μ l

Die angegebene Menge wurde für die Anfertigung eines Gels genutzt.

Tab. 12: Zusammensetzung des SDS-PAGE Puffers (10x)

	Konzentration	Menge
Tris-Base	0,25 M	30,3 g
Glycin	1,92 M	144,1 g
SDS	1 %	10 g
ddH ₂ O		Auf 1 Liter auffüllen

Bei 4°C gelagert. Für Elektrophorese auf 1x mit ddH₂O verdünnt.

Tab. 13: Zusammensetzung des SDS-PAGE Sample Loading Puffers (3x)

	Menge
1M Tris-Cl pH 6.8	2,4 ml
20% SDS	3 ml
100% Glycerol	3 ml
β -Mercaptoethanol	1,6 ml
Bromophenol Blau	0,006 g

Bei 4°C gelagert. β -Mercaptoethanol wurde jeweils frisch zugeben.

3.2.9 Western Blot

Durch Western Blot können die aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen, mit spezifischen Antikörpern markiert und mit einer nachgeschalteten Reaktion sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe eines Proteinmarkers kann ihre Größe grob abgeschätzt werden. Bei bekannter Proteingröße kann so nach bestimmten Proteinen gesucht werden.

Nachdem die Proteine mit der SDS-PAGE voneinander getrennt worden waren, wurden sie auf eine Whatman-Nitrozellulosemembran mit der Porengröße 0,20 μ m transferiert. Das dazu notwendige Blotting-Sandwich wurde ohne SDS-Gel in einer Schale mit Transferpuffer vorbereitet und wenige Minuten eingelegt. Danach wurde das Gel im

Transferpuffer den beiden Glasplatten entnommen und an seinen Platz im Blotting-Sandwich übergeben.

Tab. 14: Zusammensetzung des Blotting-Sandwich

Schwarze Seite / Minuspol	Schwamm Whatman-Papier SDS-Gel Nitrozellulosemembran Whatman-Papier
Durchsichtige Seite / Pluspol	Schwamm

Das möglichst blasenfreie Sandwich wurde in die Mini Trans-Blot Cell eingelegt und Transferpuffer sowie ein Kühlaggregat hinzugegeben. Im Anschluss wurden die Proteine mit 200 mA bei $I=const$ und ca. 120 V 80 Minuten auf die Membran transferiert.

Danach wurde die Membran entnommen, ihre Seitenorientierung markiert und bei RT 1 Stunde mit dem Blockpuffer auf dem Rotator geblockt. Nachdem die Membran 2-mal 5 Minuten in PBS auf dem Rocky 3D gewaschen wurde, wurde sie mit den beiden ersten Primärantikörpern (s. Tab. 17 für THP-1 und Tab. 18 für Maus-Homogenate) in der angegebenen Verdünnung über Nacht bei 4°C auf dem Rotator inkubiert.

Die Membran wurde durch 5-mal 10 Minuten Waschen in PBS auf dem Rocky 3D von den ungebundenen Antikörpern befreit. Anschließend wurde sie 2 Stunden bei RT auf dem Rotator mit dem ersten Sekundärantikörper inkubiert, der mit Horseradish-Peroxidase (HRP) konjugiert war.

Nach erneutem 4-mal 10-minütigem Waschen nach o.g. Prinzip wurde auf die Membran gleichmäßig das Western Lightning Solution (Oxidizing Reagent Plus und Enhanced Luminol Reagent Plus im Verhältnis 1:1) gegeben und die Membran so 1 Minute lang entwickelt. Danach wurde im Dunkeln zügig der Chemilumineszenz-Film auf die Membran gebracht und je nach Bedarf zwischen 1 und 30 Minuten belichtet. Der Film wurde dann mit Hilfe der Developer- und der Fixer-Lösung entwickelt.

Nachdem die Membran wieder 2-mal 5 Minuten gewaschen worden war, wurde sie mit dem 2. Sekundärantikörper 2 Stunden bei RT auf dem Rotator inkubiert. Die Membran wurde erneut 4-mal 10 Minuten gewaschen und anschließend nach o.g. Methode entwickelt.

Dieses Prinzip wurde für die weiteren Antikörper fortgesetzt, sofern sich die Signale nicht überschneiden. Nach dem Entwickeln wurde die Membran jeweils 2-mal 5 Minuten gewaschen und anschließend 1 Stunde bei RT mit dem Blockpuffer geblockt.

Nach erneutem 2-mal 5-minütigem Waschen wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Anschließend wurde die Membran 5-mal 10 Minuten gewaschen und mit dem zugehörigen Sekundärantikörper 2 Stunden bei RT auf dem Rotator inkubiert. Nach 4-mal 10-minütigem Waschen wurde die Membran wieder entwickelt.

Die Auswertung der gescannten Filme und die Densitometrie der Flotillin-1-Banden der THP-1-Homogenate wurden mit der ImageJ-Software V1.45 durchgeführt.

Tab. 15: Zusammensetzung des Transferpuffers

		Menge
Stock (10x) (4°C)	Tris-Base	30,3 g
	Glycin	144,1 g
	ddH ₂ O	Auf 1 Liter auffüllen
Transfer-Puffer	Stock (10x)	100 ml
	Methanol	200 ml
	ddH ₂ O	Auf 1 Liter auffüllen

Tab. 16: Zusammensetzung des Blockpuffers

	Menge
Milchpulver	5 g
PBS	50 ml

Tab. 17: Antikörper für Western Blot (THP-1)

	Antikörper	Verdünnung
1./2. Primärantikörper (beide zusammen)	Rabbit anti Flotillin 1	1:1000 in PBS + 1% Milchpulver (w/v)
	Goat anti Human TLR2	1:1000 in PBS + 1% Milchpulver (w/v)
1. Sekundärantikörper	Goat anti Rabbit IgG (HRP-conjugated)	1:5000 in PBS + 0,5% Milchpulver (w/v)
2. Sekundärantikörper	Rabbit anti Goat IgG (HRP-conjugated)	1:2500 in PBS + 2% Milchpulver (w/v)
3. Primärantikörper	Rabbit anti Calnexin	1:500 in PBS + 1% Milchpulver (w/v)
3. Sekundärantikörper	Goat anti Rabbit IgG (HRP-conjugated)	1:5000 in PBS + 0,5% Milchpulver (w/v)

Tab. 18: Antikörper für Western Blot (Maus-Großhirn)

	Antikörper	Verdünnung
1./2. Primärantikörper (beide zusammen)	Rabbit anti Flotillin 1	1:1000 in PBS + 1% Milchpulver (w/v)
	Rat anti Mouse CD14	1:500 in PBS + 1% Milchpulver (w/v)
1. Sekundärantikörper	Goat anti Rabbit IgG (HRP-conjugated)	1:5000 in PBS + 0,5% Milchpulver (w/v)
2. Sekundärantikörper	Rabbit anti Rat IgG (HRP-conjugated)	1:1000 in PBS + 1% Milchpulver (w/v)
3. Primärantikörper	Rabbit anti Mouse TLR2	1:1000 in PBS + 1% Milchpulver (w/v)
3. Sekundärantikörper	Goat anti Rabbit IgG (HRP-conjugated)	1:5000 in PBS + 0,5% Milchpulver (w/v)
4. Primärantikörper	Rabbit anti Calnexin	1:500 in PBS + 1% Milchpulver (w/v)
4. Sekundärantikörper	Goat anti Rabbit IgG (HRP-conjugated)	1:5000 in PBS + 0,5% Milchpulver (w/v)

4 Ergebnisse

4.1 Insertionskontrolle der Plasmidvektoren

Zum Nachweis der Inserts wurden die Plasmide mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und BglIII verdaut, um die Inserts auszuschneiden. Im Anschluss wurden die Fragmente durch Gelelektrophorese mit einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Dabei zeigte sich bei beiden Plasmiden bei etwa 200 bp eine Bande, bei denen es sich um die Inserts handelt (s. Abb. 9).

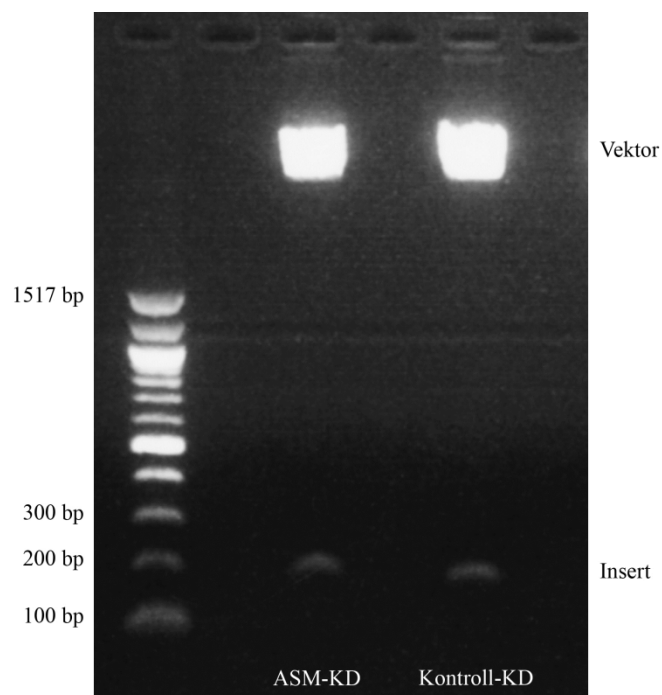


Abb. 9: Insertionskontrolle der Plasmidvektoren

Nachweis der Inserts in den Plasmiden mittels 1% Agarose-Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid. Betrachtung auf dem Multiband UV-Fluorescent Table. Auf der linken Seite befinden sich die Banden der 100 bp DNA Ladder, in der Mitte diejenigen des ASM-KD-Plasmids und auf der rechten Seite diejenigen des Kontroll-KD-Plasmids. Im Bereich von ca. 200 bp befinden sich bei beiden Plasmiden sichtbare Banden. Bei diesen handelt es sich um die jeweiligen Inserts, die die ASM-KD-miRNA bzw. die Kontroll-miRNA enthalten.

4.2 Nachweis der Transfektion der THP-1-Zellen

Das Plasmid der transfizierten THP-1-Zellen beinhaltet u.a. die DNA für ein EmGFP-Gen, dessen codiertes Protein bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge 487 nm solches mit einer Wellenlänge von 509 nm emittiert.

Die Expression von EmGFP und der damit verbundenen grünen Fluoreszenz in Kontroll-KD- und ASM-KD-Zellen diente der Überprüfung der Transfektionseffizienz. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass ein großer Anteil der Zellen das Plasmid aufgenommen hatte und erfolgreich transfiziert wurde.

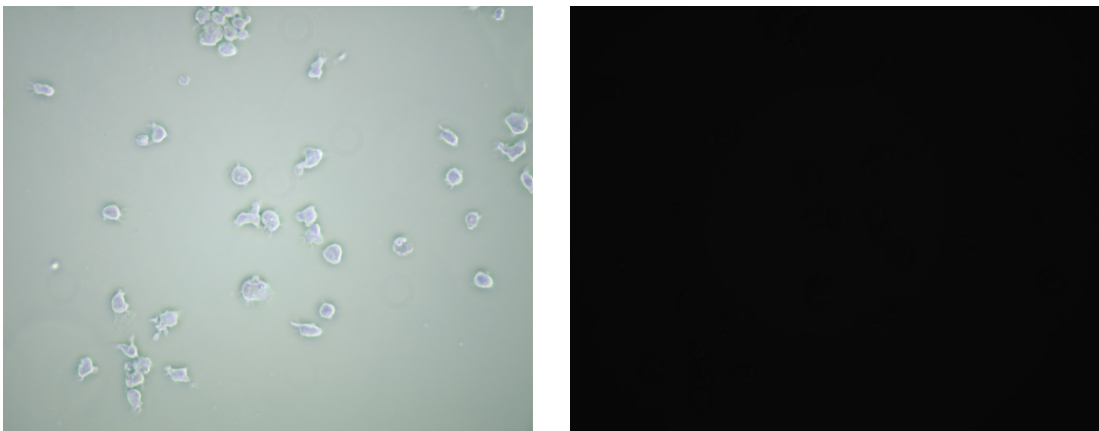


Abb. 10: Fluoreszenzmikroskopie von Wild-Type-THP-1-Zellen

Aufnahmen von Wild-Type-THP-1-Zellen unter Durchlichtmikroskopie (linkes Bild) sowie unter Fluoreszenzmikroskopie (rechtes Bild), bei der kein emittiertes grünes Licht registriert werden konnte.

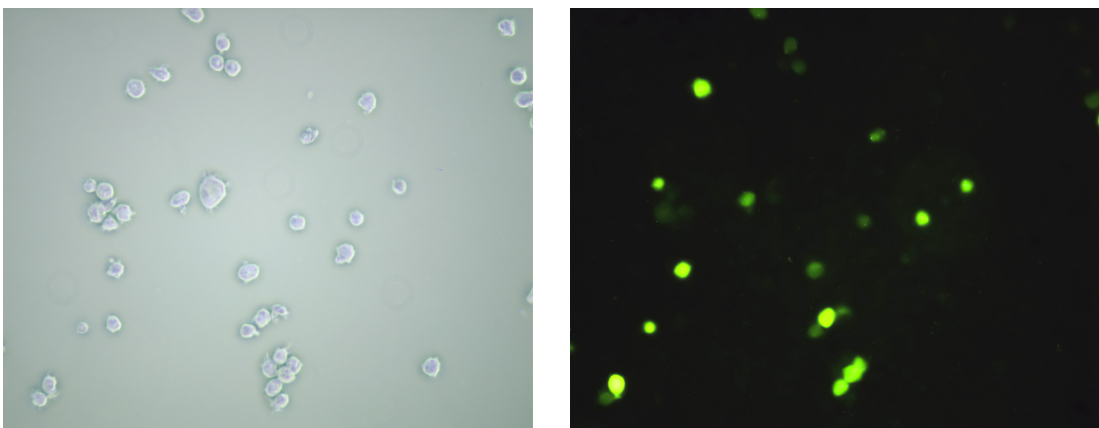


Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopie von Kontroll-KD-THP-1-Zellen

Aufnahmen von Kontroll-KD-THP-1-Zellen unter Durchlichtmikroskopie (linkes Bild) sowie unter Fluoreszenzmikroskopie (rechtes Bild) mit emittiertem Licht von 509 nm Wellenlänge.

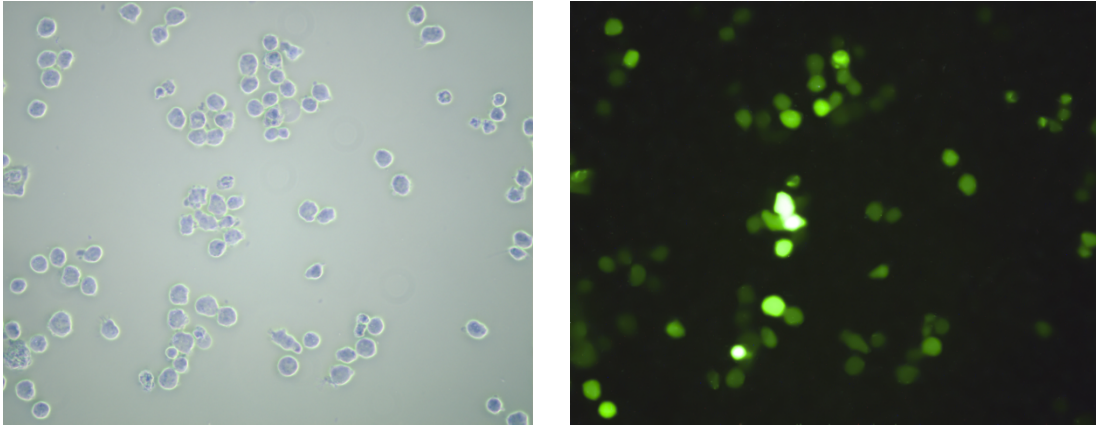


Abb. 12: Fluoreszenzmikroskopie von ASM-KD-THP-1-Zellen

Aufnahmen von ASM-KD-THP-1-Zellen unter Durchlichtmikroskopie (linkes Bild) sowie unter Fluoreszenzmikroskopie (rechtes Bild) mit emittiertem Licht von 509 nm Wellenlänge.

4.3 Einfluss der ASM auf die Sekretion inflammatorischer Mediatoren

Um den Einfluss der ASM auf die Sekretion inflammatorischer Mediatoren durch Makrophagen und somit das lokale, entzündliche Milieu zu analysieren, wurden die unterschiedlichen ASM-KD- bzw. ASM-Genotypen von THP-1-Zellen bzw. murinen BMDMs mit Pam3CSK4, LPS und humanem A β ₄₂ stimuliert. Die Konzentration dieser Mediatoren im Zellüberstand wurde mit Hilfe kommerziell erhältlicher ELISA-Sets ermittelt.

4.3.1 Einfluss der ASM auf die Sekretion inflammatorischer Mediatoren durch humane THP-1-Makrophagen

Unter Anregung der THP-1-Makrophagen mit 10 μ M A β ₄₂ konnte keine signifikant gesteigerte Freisetzung der untersuchten Mediatoren nachgewiesen werden (vgl. Abb. 13 - Abb. 15). Die Stimulation mittels Pam3CSK4 führte jedoch zu einer jeweils signifikant erhöhten Konzentration der inflammatorischen Marker. Daher wurden die Experimente an den THP-1-Makrophagen unter Anregung mit Pam3CSK4 und LPS im Anschluss fortgeführt.

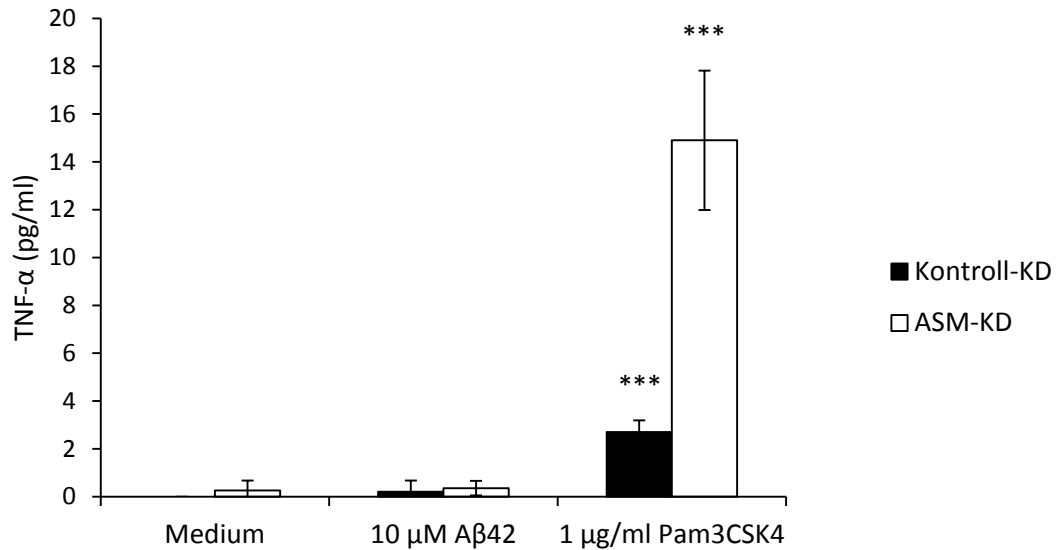


Abb. 13: Konzentration von TNF- α im Überstand A β 42- und Pam3CSK4-stimulierter THP-1-Makrophagen

Humane THP-1-Makrophagen wurden 24 h mit A β 42 und Pam3CSK4 stimuliert. Im Überstand wurde dann die Konzentration von TNF- α mit ELISA-Sets gemessen. Gezeigt sind die Konzentrationen von Kontroll-KD-Zellen (schwarze Balken) und ASM-KD-Zellen (weiße Balken) als Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen. Das Signifikanzniveau liegt bei *** = $p < 0,001$ für die Werte unter Stimulation mit Pam3CSK4 gegenüber den Medium-Werten desselben KD-Typs. Es wurde mit Hilfe eines 2-seitigen t-Tests in Microsoft Excel 2010 ermittelt. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 2$.

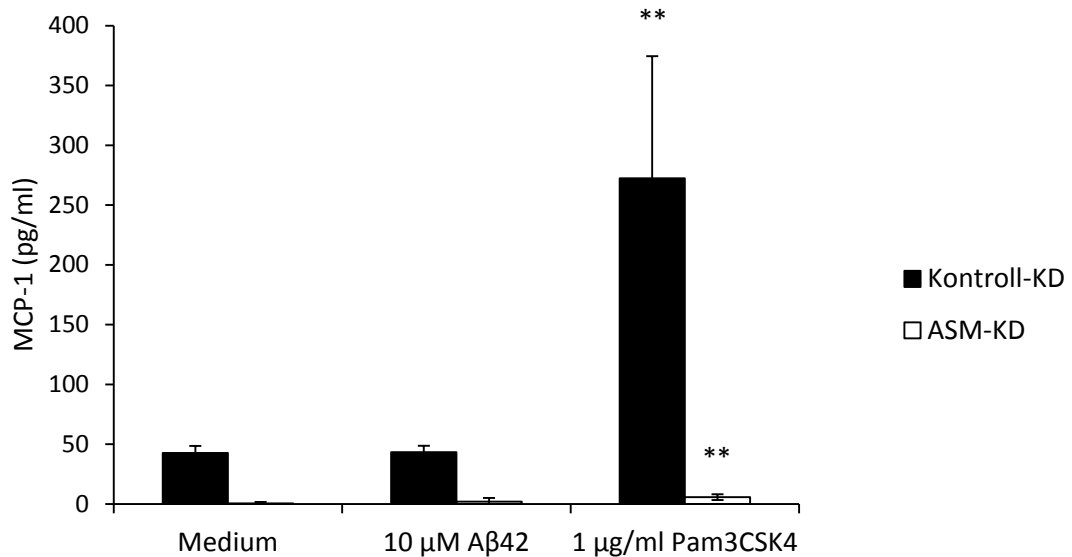


Abb. 14: Konzentration von MCP-1 im Überstand A β 42- und Pam3CSK4-stimulierter THP-1-Makrophagen

Humane THP-1-Makrophagen wurden 24 h mit A β 42 und Pam3CSK4 stimuliert. Im Überstand wurde dann die Konzentration von MCP-1 mit ELISA-Sets gemessen. Gezeigt sind die Konzentrationen von Kontroll-KD-Zellen (schwarze Balken) und ASM-KD-Zellen (weiße Balken) als Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen. Das Signifikanzniveau liegt bei ** = $p < 0,01$ für die Werte unter Stimulation mit Pam3CSK4 gegenüber den Medium-Werten desselben KD-Typs. Es wurde mit Hilfe eines 2-seitigen t-Tests in Microsoft Excel 2010 ermittelt. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 2$.

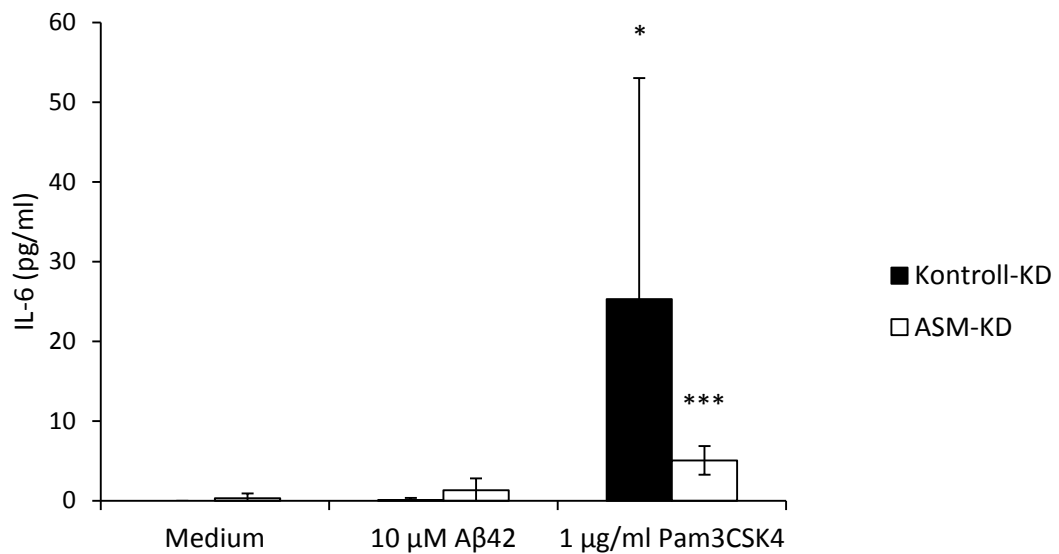


Abb. 15: Konzentration von IL-6 im Überstand Aβ42- und Pam3CSK4-stimulierter THP-1-Makrophagen

Humane THP-1-Makrophagen wurden 24 h mit Aβ42 und Pam3CSK4 stimuliert. Im Überstand wurde dann die Konzentration von IL-6 mit ELISA-Sets gemessen. Gezeigt sind die Konzentrationen von Kontroll-KD-Zellen (schwarze Balken) und ASM-KD-Zellen (weiße Balken) als Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen. Das Signifikanzniveau liegt bei * = $p < 0,05$ und *** = $p < 0,001$ für die Werte unter Stimulation mit Pam3CSK4 gegenüber den Medium-Werten desselben KD-Typs. Es wurde mit Hilfe eines 2-seitigen t-Tests in Microsoft Excel 2010 ermittelt. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 2$.

4.3.1.1 Einfluss der ASM auf die TNF-α-Sekretion durch THP-1-Makrophagen

Um die KD-spezifischen Unterschiede in der Makrophagen-Antwort auf Stimulation mit Pam3CSK4 und LPS zu ermitteln, wurde die Konzentration von TNF-α im Überstand der beiden Zelltypen gemessen.

Unter Stimulation der Zellen mit Pam3CSK4 und LPS stieg die Konzentration von TNF-α im Vergleich zu den nur mit Medium behandelten Zellen gleichen Typs als Referenz signifikant an. Die Mittelwerte der Konzentration von TNF-α bei den ASM-KD-Zellen erreichten unter Stimulation mit Pam3CSK4 sowie LPS etwa das 4-fache der Werte der Kontroll-KD-Zellen.

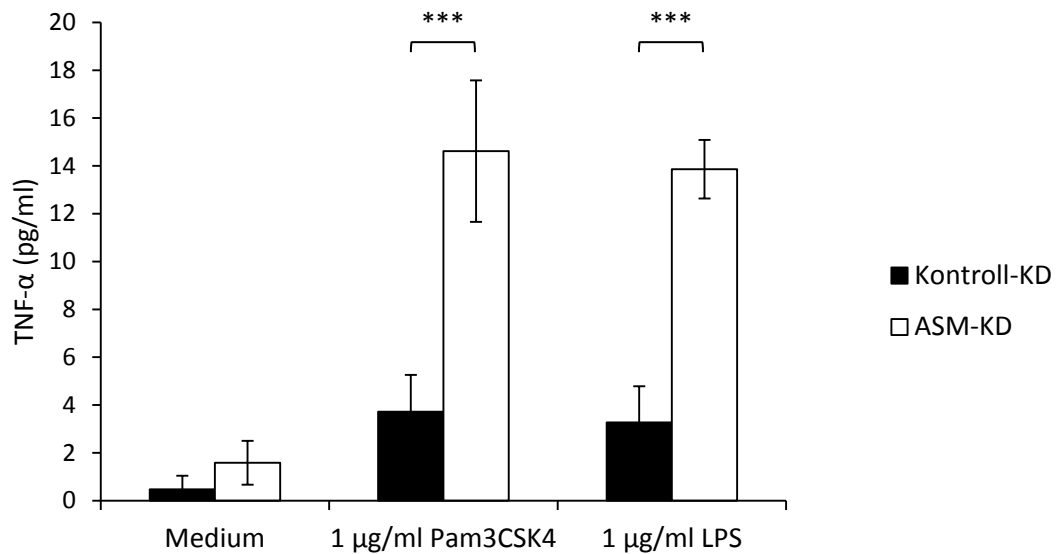


Abb. 16: Konzentration von TNF- α im Überstand Pam3CSK4- und LPS-stimulierter THP-1-Makrophagen

Humane THP-1-Makrophagen wurden 24 Stunden mit Pam3CSK4 und LPS stimuliert. Der Überstand wurde entnommen und die Konzentration von TNF- α mit ELISA-Sets gemessen. Gezeigt ist die Konzentration für Kontroll-KD-Zellen (schwarze Balken) sowie für ASM-KD-Zellen (weiße Balken). Dabei sind jeweils die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen abgebildet. Das Signifikanzniveau liegt bei *** = $p < 0,001$ und wurde mit Hilfe eines 2-seitigen t-Tests in Microsoft Excel 2010 ermittelt. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 5$.

Somit erhöhte der KD der ASM in den THP-1-Makrophagen die Ausschüttung des inflammatorischen Mediators TNF- α als Reaktion auf Stimulation an TLR4 und CD14 bzw. TLR2 und TLR1 signifikant.

4.3.1.2 Einfluss der ASM auf die MCP-1-Sekretion durch THP-1-Makrophagen

Zur Charakterisierung der KD-spezifischen Makrophagen-Antwort auf Stimulation mit Pam3CSK4 und LPS wurde ebenso die Konzentration von MCP-1 (CCL2) im Überstand der beiden Zelltypen gemessen.

Unter Stimulation stieg die Konzentration von MCP-1 zumindest bei den Kontroll-KD-Zellen im Vergleich zu den nur mit Medium behandelten Zellen gleichen Typs signifikant an, bei den ASM-KD-Zellen zeigte sich kein signifikanter Effekt nach Stimulation. Die mit LPS stimulierten Kontroll-KD-Zellen zeigten eine höhere Ausschüttung von MCP-1 als diejenigen mit Pam3CSK4. Die Mittelwerte der Konzentration dieses Chemokins lagen bei den Kontroll-KD-Zellen bei Stimulation mit

Pam3CSK4 mehr als 10-fach und bei Stimulation mit LPS mehr als 18-fach über den Werten der ASM-KD-Zellen.

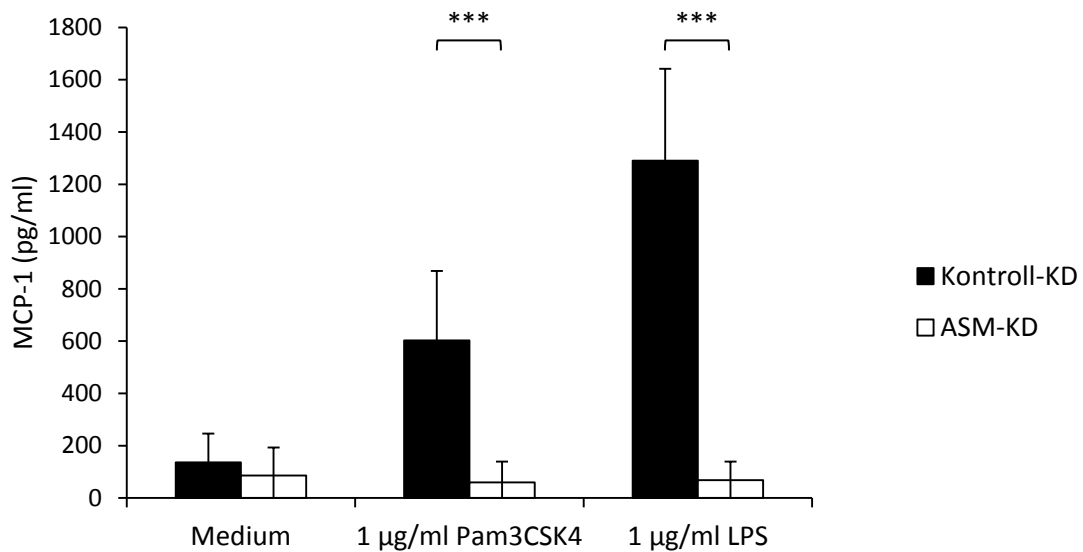


Abb. 17: Konzentration von MCP-1 im Überstand Pam3CSK4- und LPS-stimulierter THP-1-Makrophagen

Humane THP-1-Makrophagen wurden 24 Stunden mit Pam3CSK4 und LPS stimuliert. Der Überstand wurde entnommen und die Konzentration von MCP-1 (CCL2) mit ELISA-Sets gemessen. Gezeigt ist die Konzentration für Kontroll-KD-Zellen (schwarze Balken) sowie für ASM-KD-Zellen (weiße Balken). Dabei sind jeweils die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen abgebildet. Das Signifikanzniveau liegt bei *** = $p < 0,001$ und wurde mit Hilfe eines 2-seitigen t-Tests in Microsoft Excel 2010 ermittelt. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 5$.

Dementsprechend erniedrigte der KD der ASM in den THP-1-Makrophagen die Ausschüttung des inflammatorischen Chemokins MCP-1 als Reaktion auf Stimulation an TLR4 und CD14 bzw. TLR2 und TLR1 signifikant.

4.3.1.3 Einfluss der ASM auf die IL-6-Sekretion durch THP-1-Makrophagen

Ferner wurde bei der THP-1-Zelllinie zur Einschätzung der KD-spezifischen Unterschiede in der Makrophagen-Antwort auf Stimulation mit Pam3CSK4 und LPS auch die Konzentration von IL-6 im Überstand der beiden Zelltypen gemessen.

Unter Stimulation der Zellen stieg die Konzentration von IL-6 bei den Kontroll-KD-Zellen im Vergleich zu den nur mit Medium behandelten Zellen gleichen Typs signifikant an. Die Stimulation mit LPS erwirkte eine höhere IL-6-Ausschüttung als die Stimulation mit Pam3CSK4. Die Mittelwerte der Konzentration von IL-6 lagen bei den

Kontroll-KD-Zellen bei Stimulation mit Pam3CSK4 mehr als 5-fach und bei Stimulation mit LPS mehr als 12-fach über den Werten der ASM-KD-Zellen.

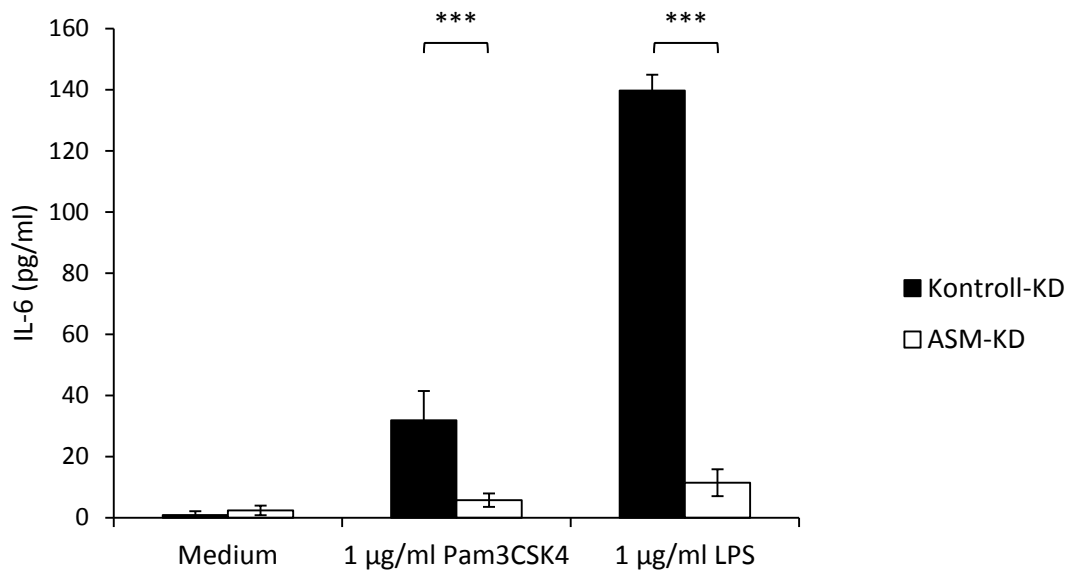


Abb. 18: Konzentration von IL-6 im Überstand Pam3CSK4- und LPS-stimulierter THP-1-Makrophagen

Humane THP-1-Makrophagen wurden 24 Stunden mit LPS und Pam3CSK4 stimuliert. Der Überstand wurde entnommen und die Konzentration von IL-6 mit ELISA-Sets gemessen. Gezeigt ist die Konzentration für Kontroll-KD-Zellen (schwarze Balken) sowie für ASM-KD-Zellen (weiße Balken). Dabei sind jeweils die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen abgebildet. Das Signifikanzniveau liegt bei *** = $p < 0,001$ und wurde mit Hilfe eines 2-seitigen t-Tests in Microsoft Excel 2010 ermittelt. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 3$.

Folglich erniedrigte der KD der ASM in den THP-1-Makrophagen die Ausschüttung des Zytokins IL-6 als Reaktion auf Stimulation an TLR4 und CD14 bzw. TLR2 und TLR1 signifikant.

4.3.2 Einfluss der ASM auf die Sekretion inflammatorischer Mediatoren durch murine Bone Marrow-Derived Macrophages

4.3.2.1 Einfluss der ASM auf die TNF- α -Sekretion durch BMDMs

Zur Ermittlung der ASM-Genotyp-spezifischen Unterschiede in der Makrophagen-Antwort auf Stimulation mit Pam3CSK4, LPS und A β ₄₂ wurde die Konzentration von TNF- α im Überstand der BMDMs gemessen.

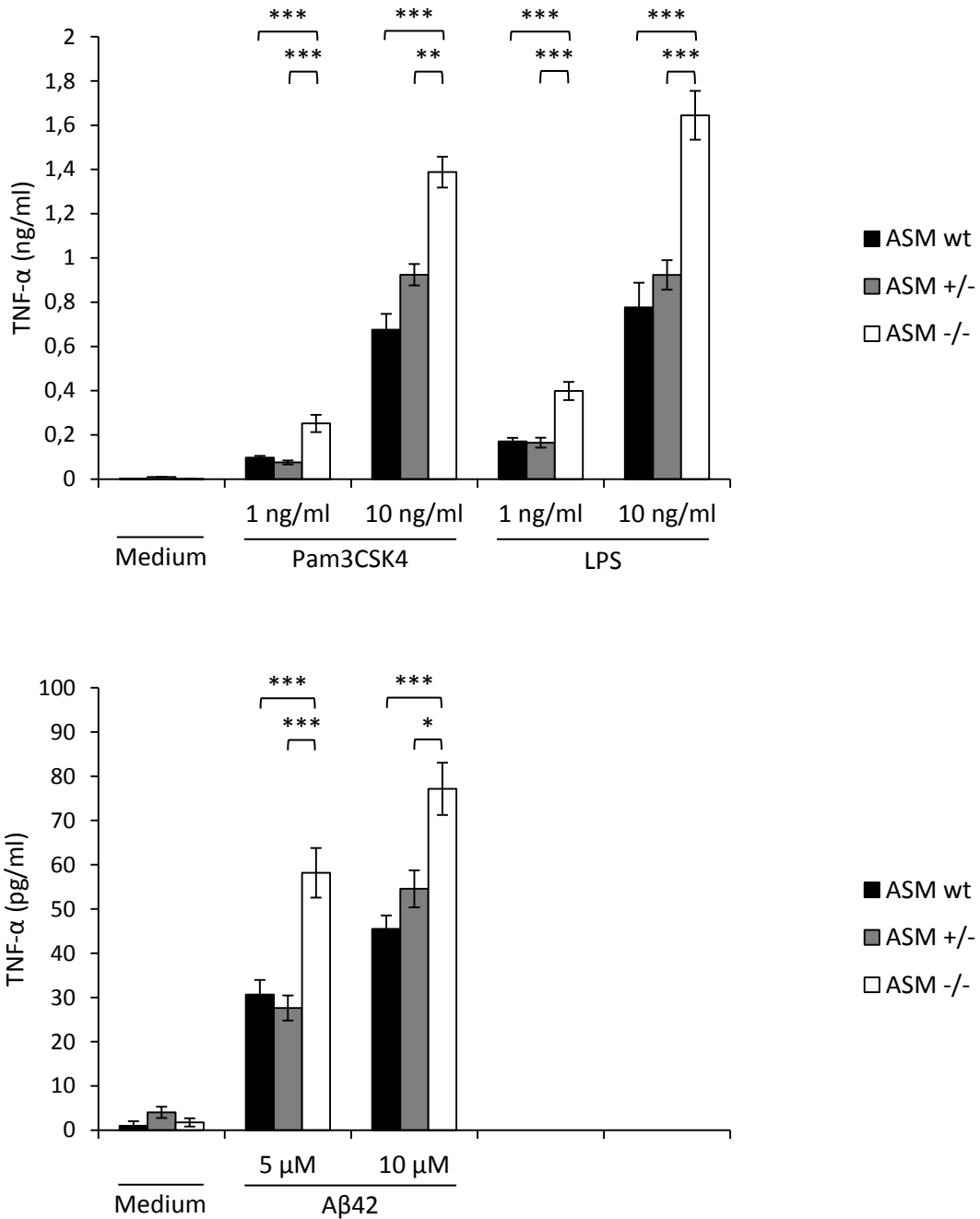


Abb. 19: Konzentration von TNF- α im Überstand Pam3CSK4-, LPS- und A β 42-stimulierter muriner BMDMs

Murine BMDMs wurden 24 Stunden mit Pam3CSK4, LPS und A β 42 stimuliert. Die Konzentration von TNF- α im Überstand wurde mit ELISA-Sets gemessen. Gezeigt ist die Konzentration für (+/+)-Wild-Type-Zellen (schwarze Balken), (+/-)-Zellen (graue Balken) sowie für (-/-)-Zellen (weiße Balken). Oben: Angabe in Nanogramm. Unten: Angabe in Pikogramm. Dabei sind jeweils die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardfehlern abgebildet. Das Signifikanzniveau ist mit * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ angegeben und wurde mit Hilfe von one way anova mit Bonferroni Korrektur in SPSS V16.0 ermittelt. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 8$.

Nach Behandlung der Zellen mit Pam3CSK4, LPS oder A β 42 stieg die Konzentration von TNF- α bei allen Genotypen im Vergleich zu den mit Medium behandelten Zellen

gleichen Typs als Referenz signifikant an. Dabei zeigten sich nach Stimulation mit beiden Konzentrationen von Pam3CSK4, LPS oder $A\beta_{42}$ jeweils signifikante Erhöhungen der TNF- α -Konzentrationen bei ASM-(-/-)-Zellen im Vergleich zu den ASM-(+/-)-Zellen und ASM-wt-Zellen. Teilweise ergaben sich auch für die ASM-(+/-)-Zellen erhöhte Werte im Vergleich mit den ASM-wt-Zellen ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen.

Demnach wurde durch die Defizienz der ASM im Genotyp der BMDMs die Ausschüttung des Zytokins TNF- α als Reaktion auf Stimulation an TLR4 und CD14 bzw. TLR2 und TLR1 sowie durch $A\beta_{42}$ signifikant erhöht.

4.3.2.2 Einfluss der ASM auf die MCP-1-Sekretion durch BMDMs

Die ASM-Genotyp-spezifischen Unterschiede in der Makrophagen-Antwort auf Stimulation mit Pam3CSK4, LPS und $A\beta_{42}$ wurden ebenso mit Hilfe der Konzentration von MCP-1 im Überstand der drei BMDM-Typen ermittelt.

Nach Behandlung der Zellen mit je zwei Konzentrationen an Stimulanz stieg die Konzentration von MCP-1 bei allen Genotypen, die mit 10 ng/ml Pam3CSK4 oder LPS sowie beiden Konzentrationen $A\beta_{42}$ behandelt wurden, im Vergleich zu den mit Medium behandelten Zellen gleichen Typs als Referenz signifikant an. Nach Stimulation mit beiden Konzentrationen von Pam3CSK4, LPS oder $A\beta_{42}$ lagen die MCP-1-Konzentrationen der ASM-(-/-)-Zellen jeweils signifikant über den Werten der ASM-wt-Zellen. Zum Teil erreichten die Werte für die ASM-(-/-)-Zellen ebenfalls ein signifikant höheres Niveau gegenüber den ASM-(+/-)-Zellen.

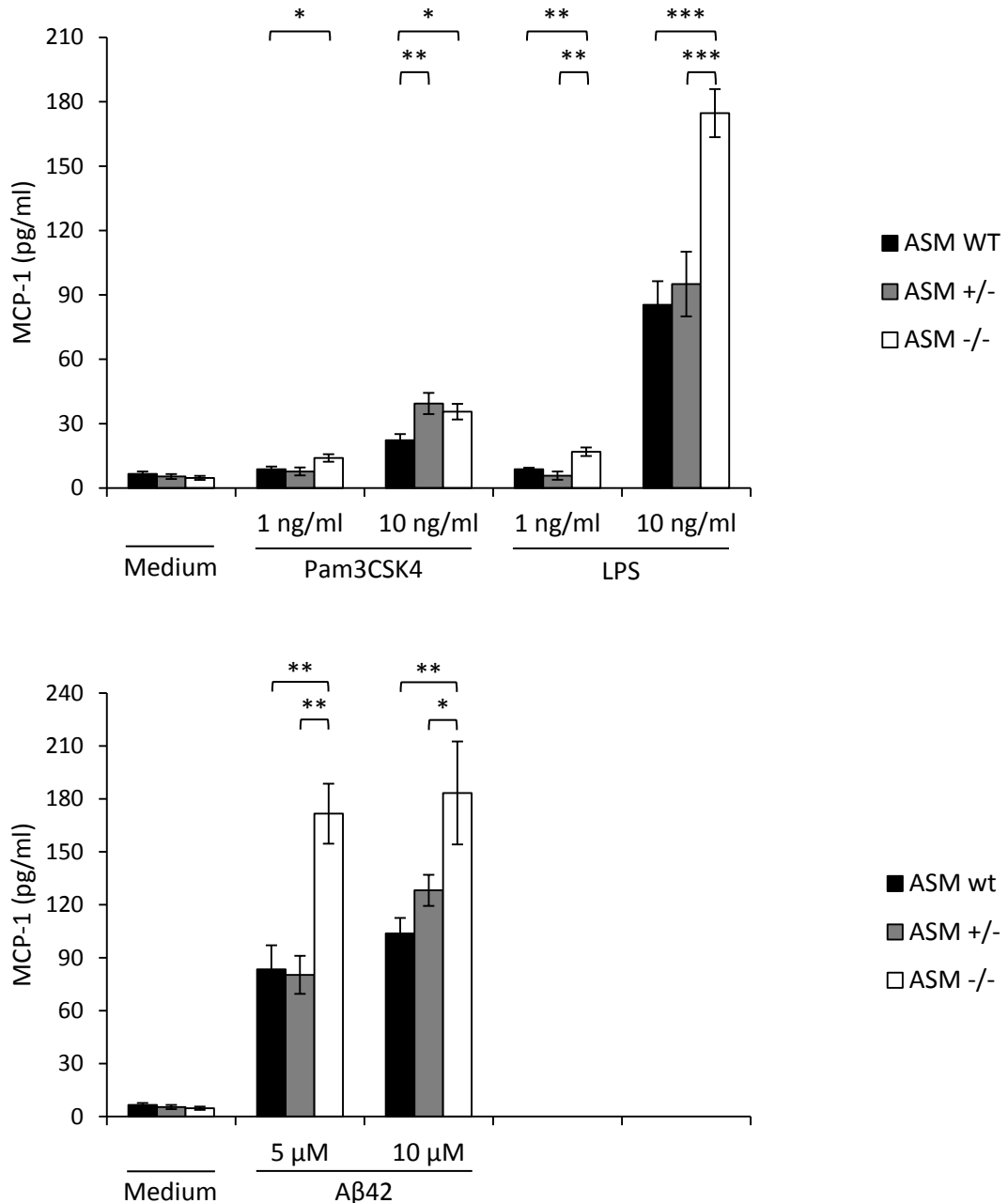


Abb. 20: Konzentration von MCP-1 im Überstand Pam3CSK4-, LPS- und Aβ42-stimulierter muriner BMDMs

Murine BMDMs wurden 24 Stunden mit Pam3CSK4, LPS und Aβ42 stimuliert. Die Konzentration von MCP-1 (CCL2) im Überstand wurde mit ELISA-Sets gemessen. Gezeigt ist die Konzentration für (+/+)-Wild-Type-Zellen (schwarze Balken), (+/-)-Zellen (graue Balken) sowie für (-/-)-Zellen (weiße Balken). Dabei sind jeweils die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardfehlern abgebildet. Das Signifikanzniveau ist mit * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ angegeben und wurde mit Hilfe von one way anova mit Bonferroni Korrektur in SPSS V16.0 ermittelt. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 8$.

Demzufolge wurde durch die Defizienz der ASM im Genotyp der BMDMs auch die Ausschüttung des Zytokins MCP-1 als Reaktion auf Stimulation an TLR4 und CD14 bzw. TLR2 und TLR1 signifikant erhöht.

4.4 Änderungen der Lipid-Raft-Eigenschaften durch ASM-Modulation

Durch ASM-Defizienz konnte eine signifikante Veränderung der Produktion diverser inflammatorischer Mediatoren nachgewiesen werden. In der Mediation dieser entzündlichen Antwort dürften auf zellulärer Ebene Lipid Rafts eine wesentliche Rolle spielen. Da deren Bildung vom Ceramid abhängt, das u.a. durch die ASM erzeugt wird, wurden als Folge der Defizienz dieses Enzyms veränderte Eigenschaften der Lipid Rafts erwartet. Um die Lipid Rafts in Form von DRMs zu isolieren, wurden THP-1-Monozyten und jeweils die linke Hemisphäre von Mäusen unterschiedlicher KD- bzw. ASM-Typen in Detergens supplementierten Puffern homogenisiert. Nach anschließender DGZ zeigte sich bei den Proben in beiden Detergenzien etwa auf Höhe der ursprünglichen 5% / 35% Saccharose-Grenzschicht ein milchiger Schleier, bei dem es sich um die Raft-Fraktionen handelte. Die DGZ-Fraktionen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend in Western Blots weiter prozessiert.

4.4.1 Western Blot der DGZ-Fraktionen der THP-1-Zellen (TBS/Triton X-100)

Um die Lokalisation der DRMs innerhalb der DGZ-Fraktionen der THP-1-Homogenate zu bestimmen, wurde ein Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen den Raft-Marker Flotillin-1 ausgeführt. Dabei wurden die DRMs mit Hilfe von Flotillin-1 bei beiden ASM-Typen in den low-density-Fraktionen 4-5 nachgewiesen, die mit dem milchigen Schleier etwa auf Höhe der ursprünglichen 5% / 35% Saccharose-Grenzschicht korrespondierten (s. Abb. 21 a). Zusätzlich wurde Flotillin-1 auch in den high-density-Fraktionen 11-12 ermittelt.

Zur Abgrenzung der DRM enthaltenden Fraktionen gegenüber Fraktionen mit Detergens-löslichen Membranbestandteilen und zum Nachweis, dass die non-Raft-Anteile durch Triton X-100 gelöst wurden, wurde ein Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen Calnexin durchgeführt. Dieses non-Raft-Protein aus dem Endoplasmatischen Retikulum konnte bei beiden ASM-Typen in den low-density-Fraktionen 4-5 nicht gezeigt werden und konzentrierte sich ausschließlich in den high-density-Fraktionen 10-12 (s. Abb. 21 b).

Zur weiteren Spezifität gegenüber Membranen aus Zellorganellen wurde die Lokalisation des für die AD relevanten Zellmembran-ständigen non-Raft-Rezeptors TLR2 innerhalb der DGZ-Fraktionen mit Hilfe spezifischer Antikörper im Western Blot

bestimmt. Dieser konzentrierte sich genauso innerhalb der high-density-Fraktionen 10-12 und somit außerhalb der DRM-Fraktionen (s. Abb. 21 c).

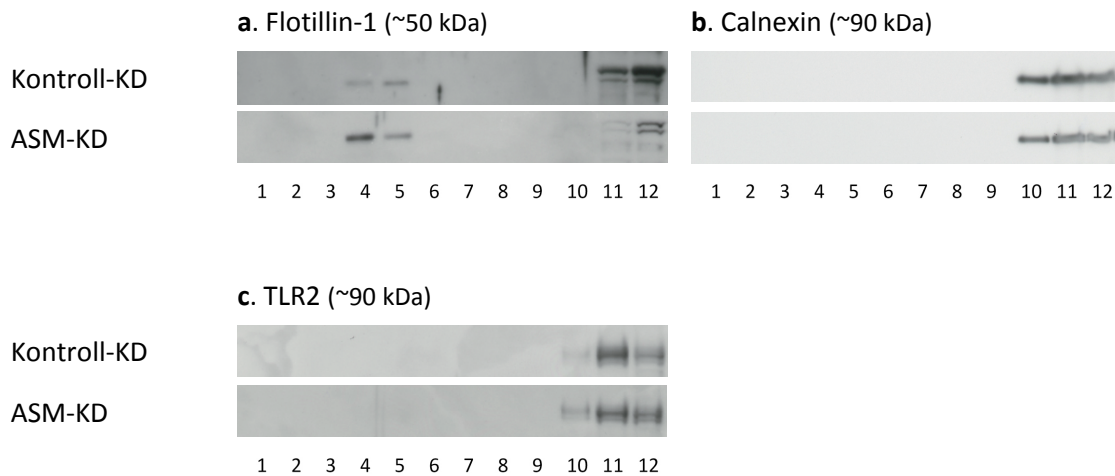


Abb. 21: Western Blot der DGZ-Fraktionen (THP-1, TBS/Triton X-100)

Homogenate von THP-1-Zellen in TBS + 1% Triton X-100 wurden durch DGZ fraktioniert. Nach Auftrennung gleicher Volumina jeder DGZ-Fraktion per SDS-PAGE wurden diese durch Western Blot mit Antikörpern zu den angegebenen Proteinen analysiert. Die Proteinmasse wurde mit Hilfe des Protein-Markers abgeschätzt. Unterhalb: Angabe der DGZ-Fraktionen 1 (low-density) bis 12 (high-density).

Die beiden ASM-Typen unterschieden sich beim Western Blot dennoch auch innerhalb ihrer low-density-DRM-Fraktionen 4-5. Für Flotillin-1 zeigte sich bei den Kontroll-KD-Homogenaten eine stärkere Ausprägung der Bande in Fraktion 5. Diese Bande war jedoch für die ASM-KD-Homogenate in Fraktion 4 deutlich stärker ausgebildet. Somit wurde durch die Defizienz der ASM ein Shift der Flotillin-1-Bande von Fraktion 5 nach Fraktion 4 ausgelöst.

Die Flotillin-1-Banden wurden durch Densitometrie quantitativ gemessen und die relative Verteilung des Flotillin-1 innerhalb der Banden 4-5 ermittelt (s. Abb. 22). Dabei bestätigte sich die Annahme, dass durch die ASM-Defizienz ein Shift des Maximums innerhalb der Raft-Banden von Fraktion 5 nach Fraktion 4 und somit zu einer weniger dichten Fraktion hin verschob.

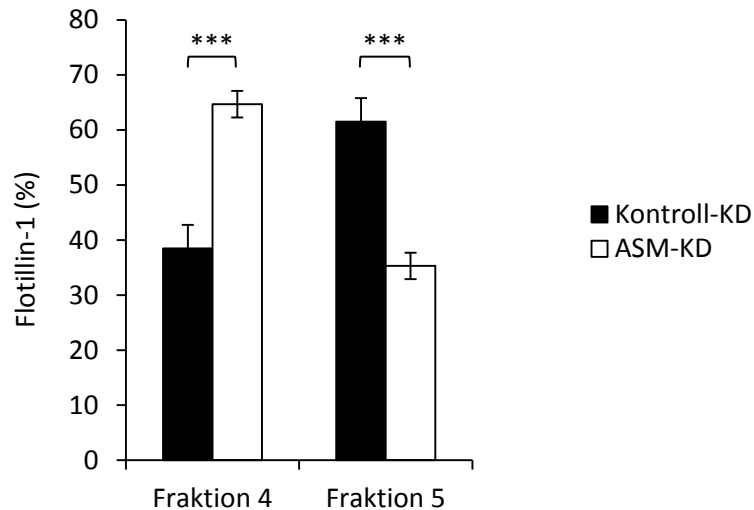


Abb. 22: Flotillin-1-Verteilung in den Raft-Fraktionen 4-5 (THP-1, TBS/Triton X-100)

Dargestellt ist die relative Verteilung von Flotillin-1 innerhalb der Raft-Fraktionen 4 und 5 der THP-1-Homogenate in TBS + 1% Triton nach Densitometrie mit ImageJ V1.45. Das Signifikanzniveau ist mit *** = $p < 0,001$ angegeben und wurde mit Hilfe eines 2-seitigen t-Tests in Microsoft Excel 2010 ermittelt. Die Anzahl der Experimente betrug $n = 4$.

4.4.2 Proteinbestimmung in den DGZ-Fraktionen des Maus-Großhirns

In den einzelnen DGZ-Fraktionen der ASM-Maus-Hemisphären wurde zuerst die Proteinkonzentration mit dem Protein Assay bestimmt.

4.4.2.1 Homogenate in TBS/Triton X-100

Für die Hemisphären-Homogenate in TBS/Triton X-100 zeigte sich ein Maximum der Proteinkonzentration bei den low-density-Fraktionen 4-5, bei dem es sich wieder um die DRMs gehandelt haben dürfte, und eines bei den high-density-Fraktionen 10-12, in denen sich die non-Raft-Proteine befinden haben müssten (s. Abb. 23). Dabei lag der Hauptanteil der Proteine in den Fraktionen 10-12.

Allerdings unterschieden sich die einzelnen ASM-Genotypen in der relativen Verteilung der Proteine innerhalb des low-density-Maximums der Fraktionen 4-5. Während das Maximum innerhalb der Fraktionen 4-5 für die ASM-wt-Homogenate in der 5. Fraktion lag, verschob es sich für die ASM-defizienten Genotypen stark in Richtung 4. Fraktion. Dies dürfte mit dem Flotillin-1-Switch von Fraktion 5 in Richtung Fraktion 4 nach ASM-KD korrelieren, der im Western Blot der THP-1-Homogenate gezeigt werden konnte.

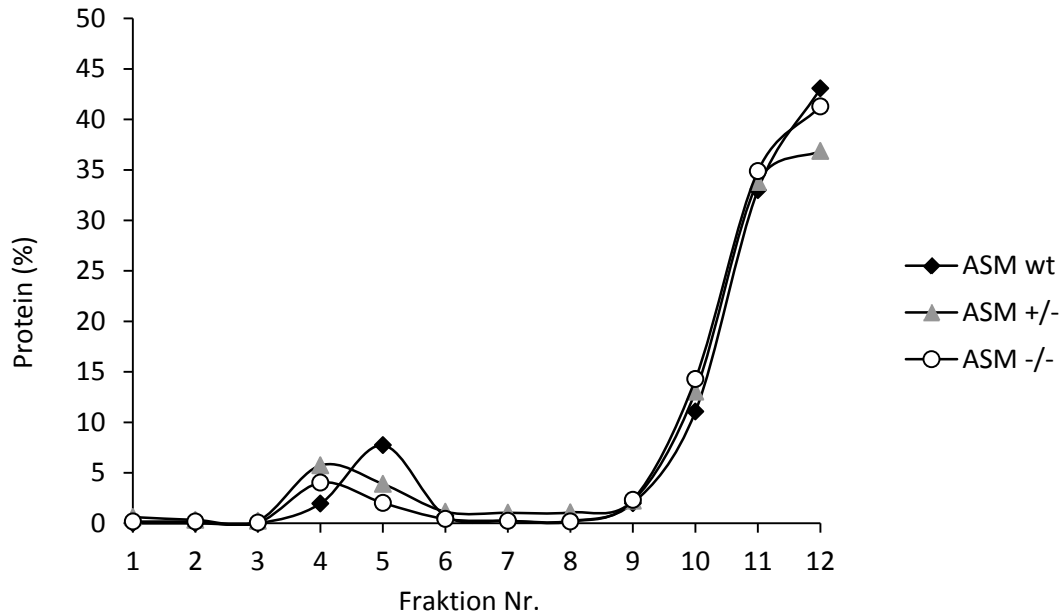


Abb. 23: Proteinverteilung in den Fraktionen des Maus-Großhirns (TBS/Triton X-100)

Nach Homogenisierung von ASM-Maus-Hemisphären in TBS + 1% Triton X-100 und anschließender DGZ wurde in den einzelnen DGZ-Fractionen die Konzentration der Proteine bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde für die jeweiligen ASM-Typen relativ im Verhältnis der einzelnen Fraktionen zueinander aufgetragen. Fraktion 1 = low-density, Fraktion 12 = high-density. Die Auswertung erfolgte anhand der Standardverdünnungskurve mit Hilfe von Microsoft Excel 2010.

4.4.2.2 Homogenate in MBS/CHAPSO

Ebenso ergab sich für die Hemisphären-Homogenate in MBS/CHAPSO ein Maximum der Proteinkonzentration innerhalb der low-density-Fractionen 4-5, bei dem es sich um die DRMs gehandelt haben dürfte, und bei den high-density-Fractionen 10-12, in denen die non-Raft-Proteine gelegen haben müssten (s. Abb. 24). Der Hauptanteil der Proteine befand sich wieder in den Fraktionen 10-12.

Im Vergleich mit der Homogenisierung in PBS/Triton X-100 fielen die Unterschiede für die ASM-Typen innerhalb der low-density-Fractionen 4-5 weniger gravierend aus. Lediglich die Homogenate der ASM-(-/-)-Mäuse wiesen eine relevante Proteinkonzentration in der 4. Fraktion auf, die dennoch niedriger war als in der zugehörigen Fraktion 5. Somit ergab sich für die ASM-defizienten Homogenate in MBS/CHAPSO keine wesentliche Verschiebung in Richtung Fraktion 4.

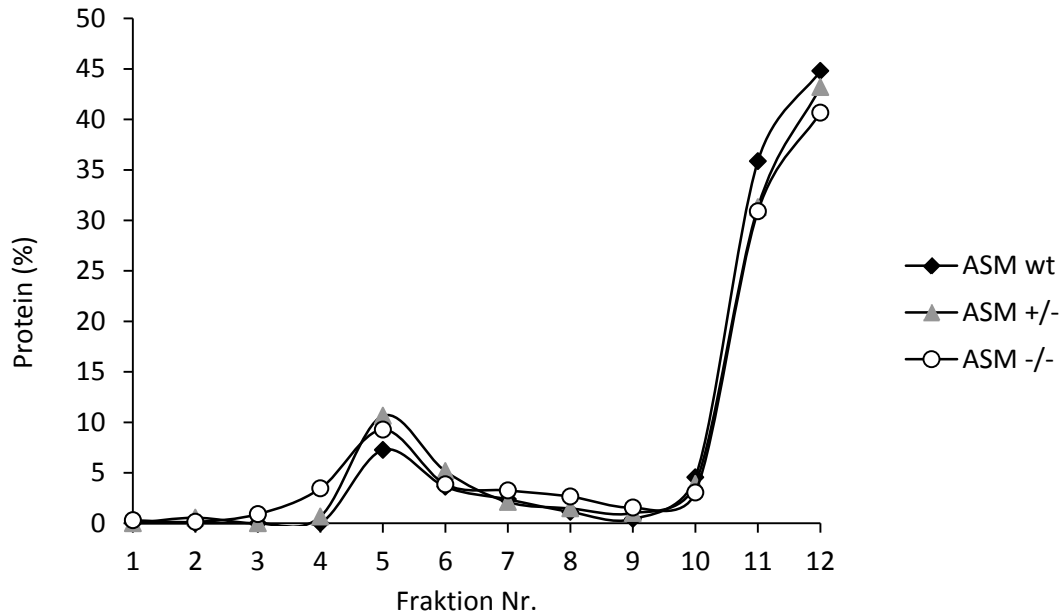


Abb. 24: Proteinverteilung in den Fraktionen des Maus-Großhirns (MBS/CHAPSO)

Nach Homogenisierung von ASM-Maus-Hemisphären in MBS + 1% CHAPSO und anschließender DGZ wurde in den einzelnen DGZ-Fractionen die Konzentration der Proteine bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde für die jeweiligen ASM-Typen relativ im Verhältnis der einzelnen Fraktionen zueinander aufgetragen. Fraktion 1 = low-density, Fraktion 12 = high-density. Die Auswertung erfolgte anhand der Standardverdünnungskurve mit Hilfe von Microsoft Excel 2010.

4.4.3 Western Blot der DGZ-Fractionen des Maus-Großhirns

Nach erfolgreicher Etablierung der Methode an THP-1-Zellen wurden die Western Blots ebenso mit den DGZ-Fractionen der Maus-Hemisphären durchgeführt, die zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennt worden waren.

4.4.3.1 Homogenate in TBS/Triton X-100

Die Lokalisierung der DRMs innerhalb der DGZ-Fractionen erfolgte wieder durch Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen den Raft-Marker Flotillin-1. Dabei wurden die DRMs bei allen ASM-Typen in den low-density-Fractionen 4-5 und schwach auch in Fraktion 6 nachgewiesen (s. Abb. 25 a). Die Fractionen 4-5 korrespondierten abermals mit dem milchigen Schleier etwa auf Höhe der ursprünglichen 5% / 35% Saccharose-Grenzschicht. Zudem wurde Flotillin-1 auch in geringem Maße in den high-density-Fractionen 10-12 ermittelt.

Zur Abgrenzung der DRM-enthaltenden Fractionen gegenüber Fractionen mit anderen Membranbestandteilen und zum Nachweis, dass die non-Raft-Anteile durch Triton

X-100 gelöst wurden, diente erneut ein Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen das non-Raft-Protein Calnexin. Dieses konzentrierte sich hauptsächlich in den high-density-Fraktionen 10-12 und nur in geringem Maß in den Fraktionen 4-5 (s. Abb. 25 b).

Zur weiteren Spezifität gegenüber Membranen aus Zellorganellen wurde die Lokalisation des Zellmembran-ständigen TLR2 innerhalb der DGZ-Fraktionen im Western Blot bestimmt. Dieser für die Pathogenese der AD relevante Rezeptor konzentrierte sich ausschließlich innerhalb der high-density-Fraktionen 10-12 und somit außerhalb der DRM-Fraktionen (s. Abb. 25 d).

Zusätzlich wurde bei den Maus-Homogenaten ein Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen das ebenfalls für die AD-Pathogenese relevante, Raft-ständige Glykoprotein CD14 ausgeführt. Ähnlich dem Raft-Marker Flotillin-1 zeigte sich CD14 hauptsächlich im Bereich der DRM-Fraktionen 4-5 (s. Abb. 25 c).

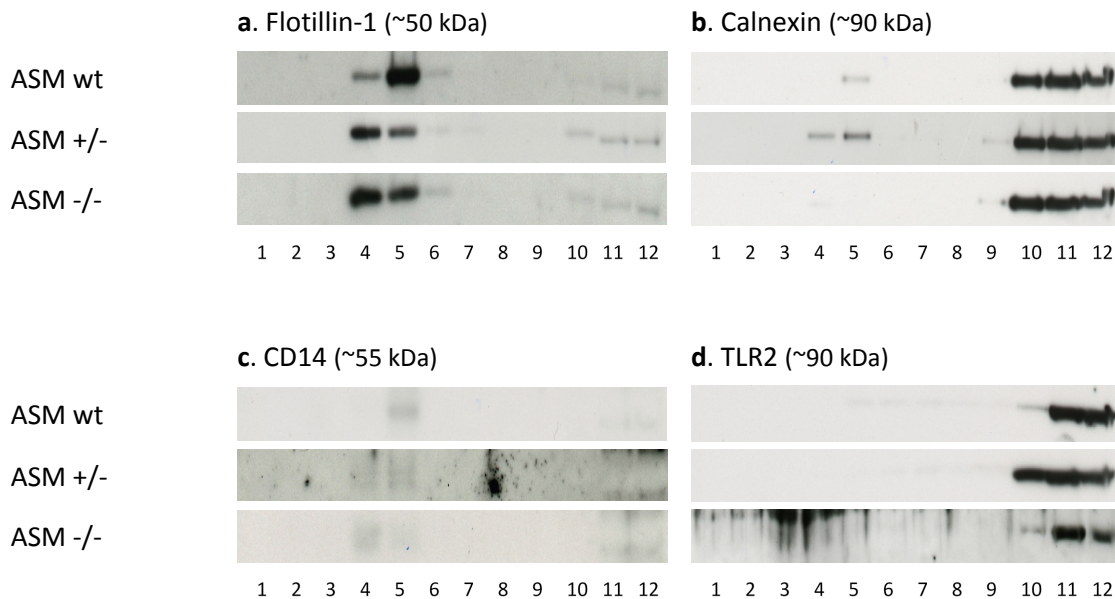


Abb. 25: Western Blot der DGZ-Fraktionen (Maus-Großhirn, TBS/Triton X-100)

Homogenate von ASM-Maus-Hemisphären in TBS + 1% Triton X-100 wurden durch DGZ fraktioniert. Nach Auftrennung gleicher Volumina jeder DGZ-Fraktion per SDS-PAGE wurden diese durch Western Blot mit Antikörpern zu den angegebenen Proteinen analysiert. Die Proteinmasse wurde mit Hilfe des Protein-Markers abgeschätzt. Unterhalb: Angabe der Fraktionen 1 (low-density) bis 12 (high-density).

Die Homogenate der verschiedenen ASM-Typen unterschieden sich beim Western Blot innerhalb der low-density-DRM-Fraktionen 4-5 ähnlich den THP-1-Blots. Dabei führte

die Defizienz der ASM wieder zum Shift der Flotillin-1-Banden von einer stärkeren Ausprägung in Fraktion 5 bei den ASM-wt-Homogenaten hin zu einer stärkeren Ausprägung in Fraktion 4 bei den ASM-(-/-)-Proben. In gleicher Weise wie Flotillin-1 verschob sich durch die ASM-Defizienz auch die Ausprägung der Banden des Raft-ständigen CD14 von Fraktion 5 bei den ASM-wt-Homogenaten hin zu Fraktion 4 bei den ASM-(-/-)-Proben.

4.4.3.2 Homogenate in MBS/CHAPSO

Mit spezifischen Antikörpern gegen den Raft-Marker Flotillin-1 wurde die Position der DRMs innerhalb der DGZ-Fraktionen durch Western Blot bestimmt. Die DRMs zeigten sich bei allen ASM-Typen im Wesentlichen im low-density-Bereich etwa der Fraktionen 4-6 (s. Abb. 26 a). Zusätzlich wurde Flotillin-1 auch in geringem Maße in angrenzenden Fraktionen und in den high-density-Fraktionen 10-12 ermittelt.

Die Abgrenzung der DRM enthaltenden Fraktionen gegenüber Fraktionen mit anderen Membranbestandteilen und der Nachweis, dass die non-Raft-Anteile durch CHAPSO gelöst wurden, erfolgte wieder mit Hilfe des non-Raft-Proteins Calnexin. Dieses konzentrierte sich bei allen ASM-Typen fast ausschließlich in den high-density-Fraktionen 11-12 (s. Abb. 26 b).

Zur weiteren Spezifität gegenüber Membranen aus Zellorganellen wurde die Lokalisation des Zellmembran-ständigen TLR2 innerhalb der DGZ-Fraktionen im Western Blot bestimmt. Dieser für die Pathogenese der AD relevante Rezeptor konnte ausschließlich innerhalb der high-density-Fraktionen 11-12 und somit außerhalb der DRM-Fraktionen nachgewiesen werden (s. Abb. 26 d).

Im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen das ebenfalls für die AD-Pathogenese relevante, Raft-ständige Glykoprotein CD14 konzentrierten sich die Banden ähnlich dem Raft-Marker Flotillin-1 hauptsächlich im Bereich der low-density-DRM-Fraktionen 4-6 (s. Abb. 26 c).

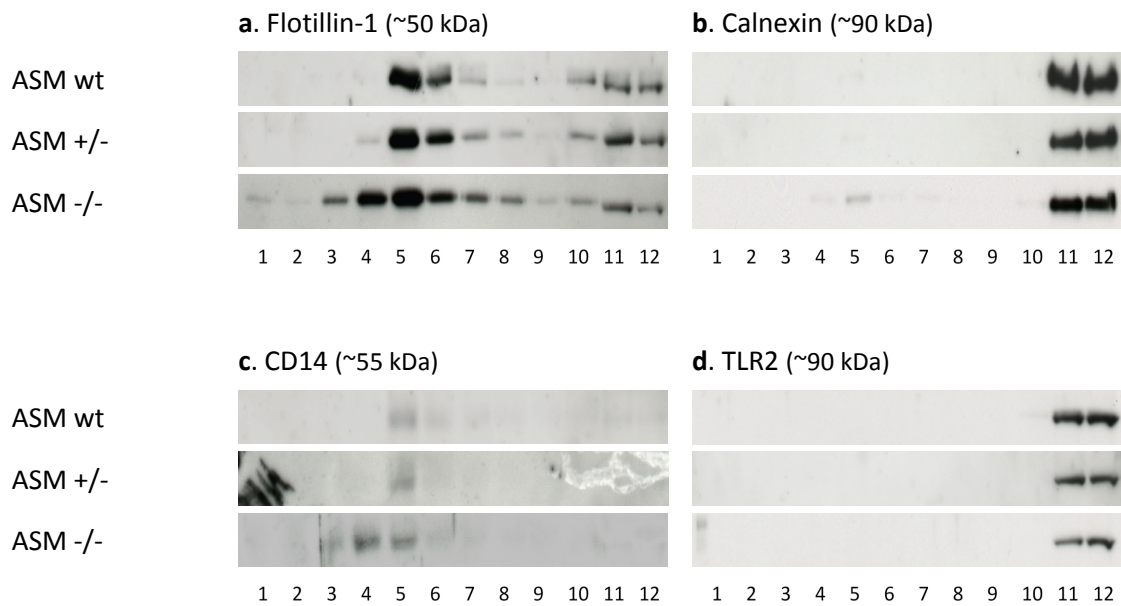


Abb. 26: Western Blot der DGZ-Fractionen (Maus-Großhirn, MBS/CHAPSO)

Homogenate von ASM-Maus-Hemisphären in MBS + 1% CHAPSO wurden durch DGZ fraktioniert. Nach Auftrennung gleicher Volumina jeder DGZ-Fraktion per SDS-PAGE wurden diese durch Western Blot mit Antikörpern zu den angegebenen Proteinen analysiert. Die Proteinmasse wurde mit Hilfe des Protein-Markers abgeschätzt. Unterhalb: Angabe der Fraktionen 1 (low-density) bis 12 (high-density).

Die Homogenate der verschiedenen ASM-Typen unterschieden sich beim Western Blot innerhalb der low-density-DRM-Fractionen 4-6 ähnlich den vorigen Blots. Dabei führte die Defizienz der ASM ebenso zum Shift der Flotillin-1-Banden von einer stärkeren Ausprägung in den Fraktion 5-6 bei den ASM-wt-Homogenaten hin zu einer größeren Ausprägung in den Fraktion 3-5 bei den ASM-(-/-)-Proben. In gleicher Weise wie Flotillin-1 verschob sich durch die ASM-Defizienz auch die Ausprägung der Banden des Raft-ständigen CD14 von den Fraktion 5-6 bei den ASM-wt-Homogenaten hin zu den Fraktionen 3-5 bei den ASM-(-/-)-Proben.

5 Diskussion

Neuroinflammation ist eines der wesentlichen pathophysiologischen Merkmale der AD und ist wahrscheinlich substanziell an den neurodegenerativen Auswirkungen dieser Erkrankung beteiligt [41] [42] [58]. Bei Betroffenen sind die Spiegel diverser inflammatorischer Mediatoren teilweise in Blut und Liquor erhöht [59] [60]. Die für die AD typischen fibrillären Amyloid-Ablagerungen stimulieren sowohl eingewanderte als auch originäre Mikroglia und ebenso die direkt verwandten Makrophagen an CD14 [49], TLR2 [51] [52] und TLR4 [47] [48] [53]. Indem sie auf diese Weise eine entzündliche Reaktion hervorrufen, dürften die A β -Peptide die Ausbildung eines chronisch-inflammatorischen Milieus anregen [41] [46] [48].

Zwar wäre der perfekte Zelltypus zum Erforschen der entzündlichen AD-Pathophysiologie die vollständig differenzierte, originäre, humane Mikrogliazelle. Aber die Schwierigkeiten bei Beschaffung und Kultivierung dieses menschlichen Gewebes erschweren dessen experimentellen Einsatz. Gleichzeitig wird die Vergleichbarkeit von Mikroglia mit Monozyten oder monozytären Zelllinien als Modell für die Erforschung A β -induzierter Effekte gestützt durch die gemeinsamen Charakteristika dieser Zellarten. Zu diesen gehören Phagozytose, Chemotaxis, Expression von MHC-Glycoproteinen und Sekretion von Zytotoxinen, Superoxid-Anionen sowie Zytokinen. Daher werden Mikroglia auch als ortsständige Makrophagen des ZNS angesehen [80].

Zusätzlich existieren im ZNS neben diesen originären Mikroglia ebenso solche, die als mononukleäre Vorläuferzellen aus dem Blut in das Gehirn einwandern. Dort können sie sich zu voll funktionsfähigen Mikroglia differenzieren und so von erheblicher pathophysiologischer Relevanz sein [44] [54]. Somit sollten sich die gut zugänglichen Monozyten bzw. monozytären Zelllinien nicht nur als nützliches *in vitro* Modell erweisen, um die Effekte von A β -Peptiden auf die Funktion humaner Mikroglia und die Auswirkungen auf das entzündliche Milieu zu erforschen. Gleichzeitig könnten sie auch einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen.

5.1 Bedeutung der ASM in der inflammatorischen Funktion humaner THP-1-Makrophagen als Modell der entzündlichen AD-Pathophysiologie

Der Einfluss der ASM auf die zelluläre Reaktion bei Stimulation an den AD-relevanten Rezeptoren TLR2/TLR1 und TLR4/CD14 durch Pam3CSK4 und LPS wurde an Makrophagen aus der humanen THP-1-Zelllinie untersucht. Diese hat sich als *in vitro* Modell für die A β -induzierte, inflammatorische Reaktion menschlicher primärer Mikroglia bereits bewährt [81] [82] [83] und sich bei Stimulation mit fibrillärem A β ähnlich wie Mikroglia verhalten [84].

Die untersuchten inflammatorischen Mediatoren TNF- α , MCP-1 und IL-6 werden im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung hochreguliert [41] [58] und sind teils auch im Blut [59] vermehrt nachweisbar. Daher ist *in vitro* nach Stimulation an den relevanten Rezeptoren ebenso eine erhöhte Konzentration der Mediatoren im Überstand zu erwarten.

Tatsächlich ergaben sich als Reaktion auf Stimulation an TLR2/TLR1 durch den synthetischen Liganden Pam3CSK4 und an CD14/TLR4 durch LPS für alle betrachteten Mediatoren signifikant erhöhte Konzentrationen im Überstand der Kontroll-KD-Zellen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die angestrebte Stimulation durch die spezifischen Liganden grundsätzlich erfolgt ist. Dieses Ergebnis lässt sich in Bezug auf TNF- α [81] [82] [85] und IL-6 [83] [85] mit Resultaten anderer Studien an THP-1-Zellen gut vereinbaren. Das gleichsinnige Verhalten der THP-1-Zellen in Bezug auf TNF- α bei Stimulation mit A β ₄₀ [83] und A β ₄₂ [81] [86] und in Bezug auf IL-6 bei Anregung mit A β ₄₀ [83] spricht für die Robustheit des experimentellen Ansatzes. Ferner konnten Lue et al. an kultivierten, humanen Mikroglia aus Schnellautopsien zeigen, dass die Konzentrationen von TNF- α , MCP-1 und IL-6 nach Stimulation mit A β ₄₂ im Überstand der Zellen signifikant anstiegen [87]. Dies spricht ebenfalls dafür, dass das verwendete Modell für die Erforschung der inflammatorischen Reaktionen bei der AD gut geeignet sein sollte.

Als Ansatz für eine mögliche Therapie wurde eine Defizienz der ASM in Betracht gezogen, die in diesem *in vitro* Modell durch RNAi erreicht wurde. Dieses Enzym ist sowohl in der Mediation als auch der Amplifikation entzündlicher, zellulärer

Signalwege involviert, indem es die Bildung ceramidreicher Mikrodomänen fördert und so ein Rezeptorclustering ermöglicht [74] [75]. Dementsprechend ist zu erwarten, dass der Knockdown der ASM in den THP-1-Zellen eine verringerte Ausschüttung der inflammatorischen Mediatoren als Reaktion auf Stimulation zur Folge hat.

TNF- α : Die Ausschüttung von TNF- α durch die THP-1-Makrophagen stieg dennoch nach KD der ASM hoch signifikant an. Die Mittelwerte der Konzentration von TNF- α erreichten bei den ASM-KD-Zellen unter Stimulation mit Pam3CSK4 oder mit LPS jeweils etwa das 4-fache der Mittelwerte der Kontroll-KD-Zellen.

Rozenova et al. regten Peritonealmakrophagen aus ASM-Mäusen mit 100 ng/ml LPS an. Dabei erreichte die Konzentration von TNF- α im Überstand der ASM-(-/-)-Makrophagen bis zu 2-fache und somit signifikant höhere Werte verglichen mit dem Überstand der ASM-(+/+)-Makrophagen. Dementsprechend wurden von Rozenova et al. dieselben Tendenzen in Bezug auf den Einfluss der ASM auf die Sekretion von TNF- α durch mononukleäre Phagozyten ermittelt. Diese führen die Autoren auf eine durch ASM-Defizienz gesteigerte Aktivität des TNF- α Converting Enzymes zurück, das den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der TNF- α -Synthese darstellt [88].

Nach Stimulation transfizierter J774-Macrophage-like-Zellen mit 1 ng/ml und 100 ng/ml LPS beschrieben Józefowski et al. sowohl bei den ASM-KD- als auch bei den neutralen Sphingomyelinase (NSM)-KD-Zellen eine signifikant erhöhte TNF- α -Sekretion. Damit wurde für die ASM-KD-Zellen dieselbe Tendenz wie in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen. Dieser Trend wurde von der o.g. Arbeitsgruppe auch nach Vorbehandlung nicht transfizierter J774-Zellen mit Imipramin als Inhibitor von ASM und NSM erreicht. Als Ursachen hierfür nennt die Arbeitsgruppe das von ASM und NSM produzierte Ceramid sowie dessen phosphoryliertes Derivat Ceramid-1-Phosphat, die als negativer Regulator der TNF- α -Produktion wirken [89].

Sakata et al. stimulierten nicht transfizierte THP-1-Makrophagen ebenfalls über 24 h mit 1 μ g/ml LPS. Dabei wurde den Zellen zur Inkubation das Sphingomyelin-Analogon SMA-7 zugesetzt, bei dem es sich auch um einen Inhibitor von ASM und NSM handelt. Unter diesem Setting wurde, im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, ein Abfall der Sekretion von TNF- α als Folge der Sphingomyelinasen-Hemmung nachgewiesen. Zusätzlich konnten Sakata et al. diese Wirkung des SMA-7 an einer Zelllinie von humanen mononukleären Zellen aus peripheren Blut (HPBMC) verifizieren [85].

Die konträren Ergebnisse von Sakata et al. werfen zweifellos Fragen über die Auswirkungen der unterschiedlichen Methoden zur Hemmung der ASM-Aktivität auf. Ferner deutet sich aber bei Sakata et al. und Józefowski et al. eine relevante Implikation der NSM in der inflammatorischen Signaltransduktion an. Diese könnte demnach ein weiteres aufschlussreiches Forschungsgebiet darstellen.

MCP-1: Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei TNF- α führte der Knock-Down der ASM zu einer signifikant verringerten Ausschüttung von MCP-1 durch die THP-1-Makrophagen. Dies entspricht in diesem Fall der ursprünglichen Erwartung. Die Mittelwerte der Konzentration von MCP-1 erreichten bei den Kontroll-KD-Zellen unter Stimulation mit Pam3CSK4 mehr als das 10-fache und unter Stimulation mit LPS mehr als das 18-fache der Mittelwerte der ASM-KD-Zellen. Die Auswirkungen der ASM-Defizienz auf die Sekretion von MCP-1 durch Makrophagen sind im Gegensatz zu TNF- α bislang noch nicht untersucht worden. Daher ist ein Vergleich dieser Ergebnisse mit weiteren Modellen der zellulären, inflammatorischen Reaktion auf Stimulation an AD-relevanten Rezeptoren durchaus sinnvoll.

IL-6: Der Knock-Down der ASM führte ebenso zu einer signifikant reduzierten Ausschüttung von IL-6. Die Mittelwerte der Konzentration von IL-6 erreichten bei den Kontroll-KD-Zellen unter Stimulation mit Pam3CSK4 mehr als das 5-fache und unter Stimulation mit LPS mehr als das 12-fache der Mittelwerte der ASM-KD-Zellen.

Sakata et al. zeigten anhand ihres Modells mit THP-1-Makrophagen eine ebenfalls signifikant reduzierte Ausschüttung von IL-6, wenn unter Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS über 24 Stunden die ASM mit SMA-7 supprimiert wurde [85]. Zumindest für dieses Zytokin ergibt sich bei Sakata et al. also eine gleichsinnige Veränderung der Ausschüttung wie in der vorliegenden Arbeit. Dennoch bleibt der Einfluss der möglicherweise veränderten Aktivität der neutralen Sphingomyelinase oder weiterer Enzyme in diesem Setting fraglich, auch wenn Sakata et al. bei diesem Experiment keine Beeinflussung der Aktivität der neutralen Sphingomyelinase ermitteln konnten.

Es wäre dennoch vorteilhaft, wenn ein direkter Vergleich zwischen den Ergebnissen der Stimulation mit Pam3CSK4 und LPS und Ergebnissen einer Stimulation mit A β möglich wäre. Bei beiden an dieser Stelle verwendeten Stimulantien handelt es sich um

Liganden an Rezeptoren, über die A β mit den Zellen interagiert. Somit sollten die Versuchsbedingungen zwar ein geeignetes Modell zur Erforschung der inflammatorischen Reaktion der Makrophagen darstellen. A β könnte die Reaktion der Zellen aber über weitere Rezeptoren und Signalwege [41] [90] (s.a. Abb. 5, S. 14) unvorhergesehen beeinflussen. So konnten beispielsweise an primären, humanen Mikroglia unter Stimulation mit LPS eine erhöhte Expression und Sekretion von IL-6 nachgewiesen werden, die sich bei Anregung mit A β_{25-35} nicht wiederholten [91].

Die Ergebnisse zur Inkubation der THP-1-Makrophagen mit 10 μ M A β_{42} waren jedoch nicht hinreichend aussagekräftig. Unter den beschriebenen Bedingungen ließ sich keine signifikante Veränderung der Konzentration der entzündlichen Mediatoren als Reaktion auf A β nachweisen. Da allerdings durch Pam3CSK4 eine statistisch relevante Stimulation gezeigt werden konnte, kann zumindest von einem korrekten Versuchsablauf ausgegangen werden. Retrospektiv betrachtet kann dies mehrere Ursachen haben.

Udan et al. wiesen im Überstand einer THP-1-Zelllinie eine signifikant erhöhte TNF- α -Konzentration als Antwort auf aggregiertes A β_{42} nach. Dabei wurden zur Stimulation der THP-1-Zellen allerdings 15 μ M A β_{42} eingesetzt. Zudem wiesen die Autoren darauf hin, dass A β_{42} -Konzentrationen unter 15 μ M die TNF- α -Sekretion von THP-1-Zellen nicht effektiv induzierten [81]. Somit könnte die A β_{42} -Konzentration von 10 μ M in der vorliegenden Arbeit zu niedrig sein, um eine signifikante Änderung der untersuchten entzündlichen Mediatoren zu bewirken.

Ferner merkten Udan et al. an, dass frisch resuspendierte A β_{42} -Monomere für die Stimulation der THP-1-Zellen ein gewisses Maß an Fibrillisierung benötigen, das aufgrund der Selbstaggregation zeitlich variiert. Das Maximum der zellulären Reaktion auf A β_{42} lag zwischen 48 und 96 Stunden A β_{42} -Inkubation bei 4°C in sterilem Wasser [81]. Ajit et al. gaben bei ähnlicher A β -Präparation ein optimales Zeitfenster der Stimulationsfähigkeit von A β_{42} von 48-72 Stunden Inkubation an [86]. Ein ungünstiger Fibrillierungsgrad während der Experimente könnte dementsprechend die THP-1-Zelllinie nicht ausreichend angeregt haben. Dies dürfte auch in Einklang damit stehen, dass sich aktivierte Mikroglia hauptsächlich in der Nähe von senilen Plaques finden, die über ein gewisses Maß an Fibrillen verfügen, und nicht in der Nähe von amorphen A β -Ablagerungen [26] [27] [28].

Klegeris et al. konnten durch Stimulation von THP-1-Monozyten durch 2 μ M und 6,6 μ M A β_{40} eine signifikante Erhöhung der Konzentration von TNF- α im Überstand

nachweisen. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit behandelten sie die THP-1-Monozyten dafür explizit nicht mit PMA vor. Denn in einer zweiten Gruppe THP-1-Zellen, die mit 50 ng/ml PMA vorbehandelt worden waren, konnten sie nach Stimulation mit A β ₄₀ keine signifikanten Veränderungen der TNF- α -Produktion mehr nachweisen [82]. Ebenso erzielten Udan et al. die signifikante Steigerung der TNF- α -Sekretion durch A β ₄₂ ohne Vorbehandlung der THP-1-Monozyten [81]. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Vorbehandlung zwar nur etwa 6 ng/ml PMA eingesetzt, dies könnte die Produktion der inflammatorischen Mediatoren als Reaktion auf A β ₄₂ dennoch wesentlich beeinflusst haben.

5.2 Bedeutung der ASM in der inflammatorischen Funktion muriner BMD-Makrophagen als Modell der entzündlichen AD-Pathophysiologie

Neben der THP-1-Zelllinie wurde der Einfluss der ASM auf die zelluläre Reaktion bei Stimulation an AD-relevanten Rezeptoren auch an murinen BMD-Makrophagen untersucht. Da es sich bei den BMDMs um Primärzellen aus ASM-Mäusen handelte, war bei diesem Modell keine weitere Manipulation der Zellen erforderlich, um eine verminderte ASM-Aktivität zu erreichen. Demnach ermöglichen die primären BMDMs auch eine Verifikation der bisherigen Ergebnisse an THP-1-Makrophagen.

Entsprechend ihrer Hochregulation in der AD [41] [58] ist für die an dieser Stelle betrachteten inflammatorischen Mediatoren TNF- α und MCP-1 wieder eine erhöhte Konzentration im Zellüberstand zu erwarten.

Für beide betrachteten Mediatoren ergaben sich nach Stimulation mit humanem A β ₄₂, Pam3CSK4 oder LPS bei allen höheren Ligandenkonzentrationen signifikant gestiegene Konzentrationen im Überstand der wt-Zellen. Somit kann angenommen werden, dass die beabsichtigte Stimulation der BMDMs durch die Liganden prinzipiell erfolgt ist. Damit besteht eine gleichsinnige Reaktion der BMDMs mit den THP-1-Makrophagen. Diese Ergebnisse lassen sich für beide Mediatoren mit den Resultaten an primären humanen Monozyten bei Stimulation mit A β ₄₂ [92], A β ₂₅₋₃₅ [93] und LPS [93] gut vereinbaren. Ebenso zeigte die Stimulation von murinen Peritonealmakrophagen mit LPS

eine signifikant erhöhte TNF- α -Sekretion [88]. Zugleich entsprechen diese Ergebnisse wieder den Resultaten der Stimulation von primären humanen Mikroglia mit A β ₄₂ [87]. Die Defizienz der ASM diene erneut als möglicher therapeutischer Ansatz. Als Folge daraus ist zwar prinzipiell eine erniedrigte entzündliche Antwort der Makrophagen auf Stimulation zu erwarten – allerdings unter dem Vorbehalt der erhöhten Sekretion von TNF- α durch die THP-1-ASM-KD-Makrophagen.

TNF- α : Durch Vermindern der Expression der ASM stieg die Sekretion von TNF- α für alle höheren Konzentrationen der Stimulantien wieder hoch signifikant an. Damit reagieren die BMDMs in derselben Weise wie die THP-1-Makrophagen. So konnte an zwei geeigneten Modellen eine zwar unerwartete, aber dennoch gleichsinnige Reaktion auf die Defizienz der ASM nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den THP-1-Makrophagen konnte auch unter Anregung der BMDMs mit A β ₄₂ durch die reduzierte ASM-Expression eine signifikante Erhöhung der TNF- α -Ausschüttung gezeigt werden. Diese Ergebnisse entsprechen wieder den Resultaten von Rozenova et al. an LPS-stimulierten, primären Peritonealmakrophagen aus ASM-Mäusen [88] und den Ergebnissen von Józefowski et al. an transfizierten J774-Macrophage-like-Zellen nach KD der ASM [89]. Dem gegenüber steht erneut die erniedrigte TNF- α -Sekretion von Sakata et al. an LPS stimulierten THP-1- und HPBMC-Zelllinien [85].

Sofern die Ergebnisse von Sakata et al. aufgrund der schlechteren Vergleichbarkeit des Settings vernachlässigt werden, ist die derzeit vorherrschende Meinung von Rozenova et al. und Józefowski et al. durchaus zu teilen, dass die ASM bzw. das von ihr produzierte Ceramid als negativer Regulator der TNF- α -Sekretion durch Makrophagen fungiert [88] [89]. Denn diese Überlegungen lassen sich zudem gut mit den kongruenten und signifikanten Resultaten, die in der vorliegenden Arbeit sowohl an THP-1- als auch an BMD-Makrophagen erzielt wurden, in Einklang bringen.

MCP-1: Nach Vermindern der ASM-Expression ist die MCP-1-Sekretion bei Anregung mit Pam3CSK4, LPS und A β ₄₂ entgegen der Erwartung signifikant gestiegen. Dies weicht zudem von den Ergebnissen an den THP-1-ASM-KD-Makrophagen ab, die nach Stimulation eine signifikant erniedrigte Sekretion von MCP-1 im Vergleich zu den THP-1-Kontroll-KD-Makrophagen gezeigt haben. Die Stimulation der beiden unterschiedlichen Zellarten erfolgte auf dieselbe Weise und bis auf eine unterschiedliche

Charge des A β ₄₂ wurden dieselben Stimulantien eingesetzt. Insofern scheint in diesem Fall die Auswahl des Zell-Modells für die A β -induzierte inflammatorische Reaktion eine entscheidende Rolle gespielt zu haben. Eine Aussage darüber, warum sich die humane THP-1-Zelllinie von den primären Makrophagen aus den verwendeten ASM-Mäusen in Bezug auf ihre Chemokinproduktion unterscheidet, ist jedoch anhand der durchgeführten Versuche nicht möglich. In der Literatur fanden sich zum Einfluss der ASM auf die Sekretion von MCP-1 durch mononukleäre Phagozyten unglücklicherweise keine weiteren Vergleichsmöglichkeiten.

IL-6: Aufgrund der kontroversen Ergebnisse für MCP-1 wäre es durchaus interessant gewesen, wenn auch für IL-6 ein Vergleich zwischen den Resultaten an THP-1-Makrophagen mit den BMDMs zur Verfügung stünde. Mangels einer ausreichenden Zahl an BMDMs konnte jedoch für IL-6 kein ELISA durchgeführt werden.

5.3 Schlussfolgerung: Bedeutung der ASM in der inflammatorischen Funktion von Makrophagen als Modell der entzündlichen AD-Pathophysiologie

Die inflammatorischen Mediatoren, die von reaktiven Mikroglia ausgeschüttet werden, werden als ein entscheidender Faktor in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie der AD angesehen [41] [58]. Zudem stieg die Freisetzung der untersuchten Mediatoren als Reaktion auf Kontakt mit A β ₄₂ bzw. mit Pam3CSK4 oder LPS jeweils signifikant an. Aufgrund ihrer Aufgaben in der Signaltransduktion inflammatorischer Stimuli wurde erwartet, dass das Vermindern der ASM-Aktivität zu einer niedrigeren entzündlichen Aktivität der mononukleären Phagozyten führen würde.

Dies konnte zwar wegen der gesteigerten Sekretion von TNF- α und widersprüchlicher Ergebnisse bei MCP-1 nicht gezeigt werden. Aber unabhängig von der Richtung, in die sich die Sekretion bei ASM-Defizienz veränderte, scheint dieses Enzym in jedem Fall für die Mechanismen der Pam3CSK4-, LPS- und A β ₄₂-induzierten Ausschüttung dieser inflammatorischen Mediatoren relevant zu sein. Damit bietet sich die ASM zweifellos als mögliches Zielmolekül für zukünftige therapeutische Interventionen bezüglich der Alzheimer-Erkrankung an.

In diesem Zusammenhang wäre es im Rahmen weiterer Experimente interessant, wie sich als Gegenstück zur vorliegenden Arbeit ein zelluläres Modell mit ASM-Überex-

pression verhielte. In der vorliegenden Arbeit wurde die Konzentration von Mediatoren als Ergebnis der Ligandenbindung gemessen. Daher sollte weitergehend untersucht werden, über welche Signalwege die zelluläre Stimulation jeweils vermittelt wird und in welcher Weise diese durch ASM-Defizienz beeinflusst werden können. Zu den Signalwegen dürften z.B. Phosphorylierungen diverser mitogen-activated Protein (MAP)-Kinasen gehören. Allerdings führte die ASM-Defizienz bei CD8⁺ T-Zellen auch zu Defekten der Freisetzung von Effektormolekülen im Zusammenhang mit der Vesikel-Membranfusion [94]. Dies könnte möglicherweise die Konzentration der sekretierten entzündlichen Mediatoren beeinflussen und sollte daher ausgeschlossen werden.

5.4 Auswirkung der ASM auf die Eigenschaften der Lipid Rafts

Die inflammatorische Antwort der Mikroglia bzw. Makrophagen auf A β wird wesentlich über Veränderungen der Struktur der Zellmembran vermittelt [68] [72]. Nach Rezeptorstimulation oder Zellstress wird die ASM auf das äußere Blatt der Zellmembran verlagert, wo sie die Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid katalysiert [74] [75]. Diese Reaktion findet wahrscheinlich zu einem großen Teil innerhalb bestehender sphingolipid- und cholesterinreicher Lipid Rafts statt. Der daraufhin gestiegene Ceramidanteil verdrängt das Cholesterin aus den Rafts, die sich daher in ihrer Komposition erheblich verändern und zu ceramidreichen Mikrodomänen entwickeln [64] [65]. Dieser Wandel dürfte zu einem selektiven Einfangen von Rezeptoren innerhalb der Mikrodomänen beitragen, die zusätzlich über die Tendenz verfügen, spontan zu verschmelzen. Die so entstehenden ceramidreichen Makrodomänen verfügen folglich auch über fusionierte Pools an Rezeptoren und können daher die Interaktionen der Rezeptoren untereinander in sog. Clustern erleichtern [64] [65] [74]. Auf diese Weise wird die Signaltransduktion diverser Signalwege – einschließlich der durch A β induzierten Effekte – wesentlich begünstigt [72] [74] [75]. Um den Einfluss der ASM auf die Komposition der Lipid Rafts zu untersuchen, wurden diese in Form von DRMs aus THP-1-Zellen und Maus-Großhirnen verschiedener ASM-Typen isoliert.

Da für eine DGZ mit konsekutiver Prozessierung im Western Blot 40 Millionen Zellen notwendig sind, konnte dabei nicht auf BMDMs zurückgegriffen werden. Eine ähnlich hohe Zellzahl wäre pro Versuch nur mit etwa 10 Mäusen gleichen Genotyps und

gleichen Alters zu erreichen gewesen. Daher wurde neben den THP-1-Makrophagen jeweils die linke Hemisphäre der ASM-Mäuse verwendet.

Bei der Proteinbestimmung in den Homogenaten der Maus-Großhirne lag der Hauptanteil der Proteine in den letzten drei Fraktionen. Davon getrennt befand sich ein weiterer Anteil v.a. in den low-density-Fraktionen 4-5. Ein ähnliches Bild ergaben die Experimente von Williamson et al. an kultivierten Rattenneuronen [69].

Sowohl an den THP-1- als auch an den Maus-Homogenaten konnte im Western Blot mit Hilfe von Flotillin-1-Antikörpern als Raft-Marker gezeigt werden, dass die Fraktionen 4-5 die DRMs enthielten. Zusätzlich wurde das GPI-verankerte Protein CD14, das sich konstitutiv in den Lipid Rafts befindet, in diesen Fraktionen gefunden. Zur Abgrenzung gegenüber den Fraktionen 10-12, in denen sich teilweise auch Flotillin-1-Banden zeigten, diente der Western Blot mit Antikörpern gegen Calnexin. Dieses non-Raft-Protein aus dem Endoplasmatischen Retikulum, das als Marker für zelluläre Membranen gilt, wurde fast ausschließlich in den Banden 10-12 nachgewiesen. Auch TLR2 als Raft ferner Rezeptor der Plasmamembran, der erst nach Stimulation in die Rafts rekrutiert wird, wurde nur in den letzten 3 Fraktionen gezeigt. Somit erfolgte die Isolation der Rafts in Form von DRMs spezifisch gegenüber den anderen Bestandteilen der Homogenate.

Ferner zeigte sich bei der Proteinbestimmung in den Maushirn-Proben nach ASM-Defizienz ein Shift des lokalen Maximums der DRMs von Fraktion 5 in Richtung der niedriger dichten Fraktion 4. Diese Veränderung war in den Homogenaten in Triton X-100 besonders deutlich. In den Western Blots der THP-1- und der Maushirn-Proben wiederholte sich eben dieses Shift der Raft-Fraktionen hin zu einer niedrigeren Dichte bei ASM-Defizienz sowohl bei den Flotillin-1- als auch bei den CD14-Banden. Verdeutlicht wurde diese Verschiebung darüber hinaus anhand des statistisch signifikanten Unterschieds zwischen den beiden ASM-Typen in der Quantifizierung der Flotillin-1-Banden der THP-1-Proben. Somit änderte sich in beiden Probenarten und bei den Maus-Homogenaten zudem in zwei verschiedenen Detergenzien jeweils die Dichte der DRMs durch die erniedrigte Aktivität der ASM in Richtung der low-density-Fraktionen, also hin zu einer niedrigeren physikalischen Dichte.

Diese geringere Dichte der Lipid Rafts könnte auf eine geringere Ceramidsynthese infolge der verminderten ASM-Aktivität zurückzuführen sein. Hierdurch sollte sich

deren Komposition weniger in Richtung ceramidreicher Domänen verschieben. Damit ginge eine größere Anzahl von Lipid Rafts in Form sphingolipid- und cholesterinreicher Domänen einher, die aufgrund der sperrigeren Sphingolipide wiederum auch weniger dicht gepackt sind. Zusätzlich würden Rekrutierung und Clustern von Proteinen und Rezeptoren nur noch in geringerem Umfang möglich sein. Insgesamt dürften nach verminderter ASM-Aktivität also Rekrutierung, Clustern und Reorganisation der Rafts abnehmen, was dementsprechend eine veränderte Komposition und Dichte der Lipid Rafts zur Folge hätte.

Da bereits in frühen Stadien der AD sowohl eine erhöhte ASM-Aktivität als auch eine Anreicherungen von Ceramid nachgewiesen wurden [76], wäre nach Vermindern dieser überhöhten Enzymaktivität als mögliche therapeutische Intervention von einer Normalisierung des Ceramid-Haushaltes und der nachfolgenden Effekte auf die zelluläre Membranstruktur auszugehen. Dies würde die Schwelle für die Aktivierung diverser Signalwege – einschließlich der durch A β induzierten Effekte – wieder erhöhen und der Amplifizierung der primären Signale entgegenwirken.

In diesem Zusammenhang wäre ein Versuchsaufbau interessant, in dem die THP-1-Zellen erst nach Stimulation mit A β ₄₂ homogenisiert werden. Damit ließe sich untersuchen, inwieweit die durch ASM-Defizienz induzierte Verringerung der Dichte der DRMs als Anhaltspunkt für die Komposition der Lipid Rafts weiterhin besteht.

Weiterhin stellen die Lipid Rafts auch die Plattform für den Aufbau des γ -Sekretase-Komplexes sowie für dessen Zusammenspiel mit der β -Sekretase zur Verfügung [1] [32]. Insofern müsste auch erforscht werden, in wie weit durch die Änderungen in der Komposition der Lipid Rafts zusätzlich zur veränderten inflammatorischen Situation eine Beeinflussung der A β -Synthese und somit auch der A β -Last erreicht werden kann.

Je nach weiterer Ergebnislage könnte die Entwicklung von Modulatoren der ASM-Aktivität zukünftig neue Möglichkeiten in der Therapie des Morbus Alzheimer und anderer chronisch-inflammatorischer Erkrankungen erschließen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] H. W. Querfurth und F. M. LaFerla, „Alzheimer's Disease - Mechanisms of Disease,“ *N Engl J Med*, pp. 362:329-344, 2010.
- [2] A. Alzheimer, „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde,“ *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin*, Bd. 64, 1907.
- [3] E. Kraepelin, *Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. II. Band, Klinische Psychiatrie.*, Verlag Johann Ambrosius Barth, Leipzig.
- [4] A. Alzheimer, *Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters*, 1911.
- [5] M. Goedert und M. G. Spillantini, „A Century of Alzheimer's Disease,“ *Science*, pp. 314:777-781, 2006.
- [6] J. L. Cummings, H. V. Vinters, G. M. Cole und Z. S. Khachaturian, „Alzheimer's disease - Etiologies, pathophysiology, cognitive reserve and treatment opportunities,“ *Neurology*, pp. 51:S2-S17, 1 July 1998.
- [7] C. Priller, „Funktion des Amyloid Precursor Proteins und dessen Spaltprodukten bei der synaptischen Übertragung, Dissertation,“ *Ludwig-Maximilians-Universität München*, 2006.
- [8] J. L. Cummings, "Alzheimer's Disease,“ *N Engl J Med*, pp. 351:56-67, 2004.
- [9] J. L. Cummings und G. Cole, „Alzheimer Disease,“ *J Am Med Assoc*, pp. 287(18):2335-2338, 2002.
- [10] Alzheimer's Association, „Alzheimer's Association Report - 2012 Alzheimer's disease facts and figures,“ 2012.
- [11] M. S. Mega, J. L. Cummings, T. Fiorello und J. Gornbein, „The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease,“ *Neurology*, pp. 46:130-135, 1996.

- [12] A. Mirakhor, D. Craig, D. J. Hart, S. P. McIlroy und A. P. Passmore, „Behavioural and psychological syndromes in Alzheimer's disease,“ *Int J Geriatr Psych*, pp. 19:1035-1039, 2004.
- [13] C. P. Ferri, M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P. R. Menezes, E. Rimmer und M. Scazufca, „Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study,“ *Lancet*, pp. 366: 2112-17, 2005.
- [14] Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung, „Demenz-Report - Wie sich die Regionen in Deutschland, Österreich und der Schweiz auf die Alterung der Gesellschaft vorbereiten können,“ 2011.
- [15] C. Kawas, S. Gray, R. Brookmeyer, J. Fozard und A. Zonderman, „Age-specific incidence rates of Alzheimer's disease - The Baltimore Longitudinal Study of Aging,“ *Neurology*, pp. 54:2072-2077, 2000.
- [16] K. Blennow, M. J. de Leon und H. Zetterberg, „Alzheimer's disease,“ *Lancet*, pp. 368:387-403, 2006.
- [17] W. A. Kukull, R. Higdon, J. D. Bowen, W. C. McCormick, L. Teri, G. D. Schellenberg, G. van Belle, L. Jolley und E. B. Larson, „Dementia and Alzheimer Disease Incidence - A Prospective Cohort Study,“ *Arch Neurol*, pp. 59:1737-1746, 2002.
- [18] World Health Organisation, „World Health Report 2003 - Shaping the future,“ 2003.
- [19] J. Schneider, J. Murray, S. Banerjee und A. Mann, „EURO CARE: a cross-national study of co-resident spouse carers for people with Alzheimer's Disease: I - factors associated with carer burden,“ *Int J Geriatr Psych*, pp. 44:651-661, 1999.
- [20] R. L. Nussbaum und C. E. Ellis, „Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease,“ *N Engl J Med*, pp. 348:1356-1364, 2003.

- [21] O. L. Lopez, W. J. Jagust, S. T. DeKosky, J. T. Becker, A. Fitzpatrick, C. Dulberg, J. Breitner, C. Lyketsos, B. Jones, C. Kawas, M. Carlson und L. H. Kuller, „Prevalence and Classification of Mild Cognitive Impairment in the Cardiovascular Health Study Cognition Study - Part 1,“ *Arch Neurol*, pp. 60:1385-1389, 2003.
- [22] M. Kivipelto, T. Ngandu, L. Fratiglioni, M. Viitanen, I. Kareholt, B. Winblad, E. L. Helkala, J. Tuomilehto, H. Soininen und A. Nissinen, „Obesity and Vascular Risk Factors at Midlife and the Risk of Dementia and Alzheimer Disease,“ *Arch Neurol*, pp. 62:1556-1560, 2005.
- [23] G. Tsivgoulis, A. V. Alexandrov, V. G. Wadley, F. W. Unverzagt, R. C. P. Go, C. S. Moy, B. Kissela und G. Howard, „Association of higher diastolic blood pressure levels with cognitive impairment,“ *Neurology*, pp. 73:589-595, 2009.
- [24] M. Ganguli und W. A. Kukull, „Lost in Translation,“ *Arch Neurol*, pp. 67:107-111, 2010.
- [25] T. Iwatsubo, A. Odaka, N. Suzuki, H. Mizusawa, N. Nukina und Y. Ihara, „Visualization of A β 42(43) and A β 40 in Senile Plaques with End-Specific A β Monoclonals: Evidence That an Initially Deposited Species Is A β 42(43),“ *Neuron*, pp. 13:45-53, 1994.
- [26] D. W. Dickson, „The pathogenesis of senile plaques,“ *J Neuropathol Exp Neurol*, pp. 56:321-339, 1997.
- [27] M. Heneka und M. O'Banion, „Inflammatory processes in Alzheimer's disease,“ *J Neuroimmunol*, pp. 184:69-91, 2007.
- [28] M. Stalder, A. Phinney, A. Probst, B. Sommer, M. Staufenbiel und M. Jucker, „Association of Microglia with Amyloid Plaques in Brains of APP23 Transgenic Mice,“ *Am J Pathol*, pp. 154:1673-1684, 1999.
- [29] D. M. Walsh und D. J. Selkoe, „A β Oligomers - a decade of discovery,“ *J Neurochem*, pp. 101:1172-1184, 2007.

- [30] C. Haass und D. J. Selkoe, „Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimers amyloid β -peptide,“ *Nature Rev Mol Cell Biol*, pp. 8:101-112, 2007.
- [31] G. M. Shankar, L. Shaomin, T. H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N. E. Shepardson, I. Smith, F. M. Brett, M. A. Farrell, M. J. Rowan, C. A. Lemere, C. M. Regan, D. M. Walsh, B. L. Sabatini und D. J. Selkoe, „Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory,“ *Nature Med*, pp. 14:837-842, 2008.
- [32] J. V. Rushworth und N. M. Hooper, „Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid- β Production, Aggregation and Toxicity at Neuronal Membranes,“ *Int J Alzheimers Dis*, 2011.
- [33] K. Iqbal, A. d. C. Alonso, S. Chen, M. O. Chohan, E. El-Akkad, C. X. Gong, S. Khatoon, B. Li, F. Liu, A. Rahman, H. Tanimukai und I. Grundke-Iqbal, „Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies,“ *Biochim Biophys Acta*, pp. 1739:198-210, 2005.
- [34] H. Braak und E. Braak, „Neuropathological staging of Alzheimer-related changes,“ *Acta Neuropathol*, pp. 82:239-259, 1991.
- [35] E. Braak, K. Griffling, K. Arai, J. Bohl, H. Bratzke und H. Braak, „Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer?,“ *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, Nr. 249: Suppl.3, 14-22, 1999.
- [36] J. Götz, F. Chen, J. van Dorpe und R. M. Nitsch, „Formation of Neurofibrillary Tangles in P301L Tau Transgenic Mice Induced by A β 42 Fibrils,“ *Science*, pp. 293:1491-1495, 2001.
- [37] S. Oddo, A. Caccamo, J. D. Shepherd, M. P. Murphy, T. E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M. P. Mattson, Y. Akbari und F. M. LaFerla, „Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A β and Synaptic Dysfunction,“ *Neuron*, pp. 39:409-421, 2003.

- [38] M. Jin, N. Shepardson, T. Yang, G. Chen, D. Walsh und D. J. Selkoe, „Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration,“ *Proc Natl Acad Sci USA*, pp. 108:5819-5824, 2011.
- [39] E. D. Roberson, K. Scarce-Levie, J. J. Palop, F. Yan, I. H. Cheng, T. Wu, H. Gerstein, G. Q. Yu und L. Mucke, „Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid β -Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model,“ *Science*, pp. 316:750-754, 2007.
- [40] M. Rapoport, H. N. Dawson, L. I. Binder, M. P. Vitek und A. Ferreira, „Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity,“ *Proc Natl Acad Sci USA*, pp. 90:6364-6369, 2002.
- [41] M. T. Heneka, M. K. O'Banion, D. Terwel und M. P. Kummer, „Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease,“ *J Neural Transm*, pp. 117:919-947, 2010.
- [42] T. Wyss-Coray, „Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response?,“ *Nature Med*, pp. 12:1005-1015, 2006.
- [43] W. Griffin, J. Sheng, M. Royston, S. Gentleman, J. McKenzie, D. Graham, G. Roberts und R. Mraz, „Glial-Neuronal Interactions in Alzheimer's Disease: The Potential Role of a 'Cytokine Cycle' in Disease Progression,“ *Brain Pathol*, pp. 8:65-72, 1998.
- [44] A. Simard, D. Soulet, G. Gowing, J. Julien und S. Rivest, „Bone Marrow-Derived Microglia Play a Critical Role in Restricting Senile Plaque Formation in Alzheimer's Disease,“ *Neuron*, pp. 49:489-502, 2006.
- [45] I. Blasko, F. Marx, E. Steiner, T. Hartmann und B. Grubeck-Loebenstein, „TNF α plus IFN γ induce the production of Alzheimer β -amyloid peptides and decrease the secretion of APPs,“ *FASEB J*, pp. 13:63-68, 1999.
- [46] E. McGeer, K. Yasojima, C. Schwab und P. McGeer, „The pentraxins: possible

- role in Alzheimer's disease and other innate inflammatory diseases," *Neurobiol Aging*, pp. 22:843-848, 2001.
- [47] S. Walter, M. Letiembre, Y. Liu, H. Heine, B. Penke, W. Hao, B. Bode, N. Manietta, J. Walter, W. Schulz-Schäffer und K. Faßbender, „Role of the Toll-Like Receptor 4 in Neuroinflammation in Alzheimer's Disease," *Cell Physiol Biochem*, pp. 20:947-956, 2007.
- [48] K. Faßbender, S. Walter, S. Kühl, R. Landmann, K. Ishii, T. Bertsch, A. K. Stalder, F. Muehlhauser, Y. Liu, A. J. Ulmer, S. Rivest, A. Lentschat, E. Gulbins, M. Jucker, M. Staufenbiel, K. Brechtel, J. Walter, G. Multhaup, B. Penke, Y. Adachi, T. Hartmann und K. Beyreuther, „The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease," *FASEB J*, pp. 18:203-205, 2004.
- [49] Y. Liu, S. Walter, M. Stagi, D. Cherny, M. Letiembre, W. Schulz-Schaeffer, H. Heine, B. Penke, H. Neumann und K. Faßbender, „LPS receptor (CD14): a receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide," *Brain*, pp. 128:1778-1789, 2005.
- [50] R. Jerala, „Structural biology of the LPS recognition," *Int J Med Microbiol*, pp. 297:353-363, 2007.
- [51] S. Liu, Y. Liu, W. Hao, L. Wolf, A. J. Kiliaan, B. Penke, C. E. Rube, J. Walter, M. T. Heneka, T. Hartmann, M. D. Menger und K. Faßbender, „TLR2 Is a Primary Receptor for Alzheimer's Amyloid β Peptide To Trigger Neuroinflammatory Activation," *J Immunol*, pp. 188:1098-1107, 2012.
- [52] M. Jana, C. A. Palencia und K. Pahan, „Fibrillar Amyloid- β Peptides Activate Microglia via TLR2: Implications for Alzheimer's Disease," *J Immunol*, pp. 181:7254-7262, 2008.
- [53] E. G. Reed-Geaghan, J. C. Savage, A. G. Hise und G. E. Landreth, „CD14 and Toll-Like Receptors 2 and 4 Are Required for Fibrillar A β -Stimulated Microglial Activation," *J Neurosci*, pp. 29(38):11982-11992, 2009.

- [54] D. Gate, K. Rezai-Zadeh, D. Jodry, A. Rentsendorj und T. Town, „Macrophages in Alzheimer's disease: the blood-borne identity,“ *J Neural Transm*, pp. 117:961-970, 2010.
- [55] G. J. Harry und A. D. Kraft, „Microglia in the developing brain: A potential target with lifetime effects,“ *Neurotoxicology*, pp. 33:191-206, 2012.
- [56] W. Hao, Y. Liu, S. Liu, S. Walter, M. O. Grimm, A. J. Kiliaan, B. Penke, T. Hartmann, C. E. Rube, M. D. Menger und K. Faßbender, „Myeloid differentiation factor 88-deficient bone marrow cells improve Alzheimer's disease-related symptoms and pathology,“ *Brain*, pp. 134:278-292, 2011.
- [57] J. A. Smith, A. Das, S. K. Ray und N. L. Banik, „Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases,“ *Brain Res Bull*, pp. 87:10-20, 2012.
- [58] H. Akiyama, S. Barger, S. Barnum, B. Bradt, J. Bauer, G. M. Cole, N. R. Cooper, P. Eikelenboom, M. Emmerling, B. L. Fiebich, C. E. Finch, S. Frautschy, W. S. T. Griffin, H. Hampel, M. Hull, G. Landreth, L. Lue, R. Mrazek, I. R. Mackenzie, P. L. McGeer, M. K. O'Banion, J. Pachter, G. Pasinetti, C. Plata-Salaman, J. Rogers, R. Rydel, Y. Shen, W. Streit, R. Strohmeyer, I. Tooyoma, F. L. Van Muiswinkel, R. Veerhuis, D. Walker, S. Webster, B. Wegrzyniak, G. Wenk und T. Wyss-Coray, „Inflammation and Alzheimer's disease,“ *Neurobiol Aging*, pp. 21:383-421, 2000.
- [59] W. Swardfager, K. Lanctôt, L. Rothenburg, A. Wong, J. Cappell und N. Herrmann, „A Meta-Analysis of Cytokines in Alzheimer's Disease,“ *Biol Psychiatry*, pp. 68:930-941, 2010.
- [60] D. Galimberti, N. Schoonenboom, E. Scarpini und P. Scheltens, „Chemokines in Serum and Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's Disease Patients,“ *Ann Neurol*, pp. 53:547-548, 2003.
- [61] A. Helmy, M. G. De Simoni, M. R. Guilfoyle, K. L. H. Carpenter und P. J. Hutchinson, „Cytokines and innate inflammation in the pathogenesis of human

- traumatic brain injury," *Prog Neurobiol*, pp. 95:352-372, 2011.
- [62] S. L. Deshmane, S. Kremlev, S. Amini und B. E. Sawaya, „Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview," *J Interferon Cytokine Res*, pp. 29:313-326, 2009.
- [63] V. Michel und M. Bakovic, „Lipid rafts in health and disease," *Biol Cell*, pp. 99:129-140, 2007.
- [64] C. R. Bollinger, V. Teichgräber und E. Gulbins, „Ceramide-enriched membrane domains," *Biochim Biophys Acta*, pp. 1746:284-294, 2005.
- [65] Y. Zhang, X. Li, K. A. Becker und E. Gulbins, „Ceramide-enriched membrane domains - Structure and function," *Biochim Biophys Acta*, pp. 1788:178-183, 2009.
- [66] L. J. Pike, „Lipid rafts: bringing order to chaos," *J Lipid Res*, pp. 44:655-667, 2003.
- [67] D. A. Brown und J. K. Rose, „Sorting of GPI-Anchored Proteins to Glycolipid-Enriched Membrane Subdomains during Transport to the Apical Cell Surface," *Cell*, pp. 68:533-544, 1992.
- [68] M. Triantafilou, K. Miyake, D. T. Golenbock und K. Triantafilou, „Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation," *J Cell Sci*, pp. 115:2603-2611, 2002.
- [69] R. Williamson, A. J. Thompson, M. Abu, A. Hye, A. Usardi, S. Lynham, B. H. Anderton und D. P. Hanger, „Isolation of detergent resistant microdomains from cultured neurons: detergent dependent alterations in protein composition," *BMC Neurosci*, p. 11:120, 2010.
- [70] D. Lingwood und K. Simons, „Detergent resistance as a tool in membrane research," *Nat Protoc*, pp. 9:2159-2165, 2007.
- [71] R. Ehehalt, P. Keller, C. Haass, C. Thiele und K. Simons, „Amyloidogenic processing of the Alzheimer β -amyloid precursor protein depends on lipid rafts," *J*

- Cell Biol*, pp. 160:113-123, 2003.
- [72] M. Triantafilou, S. Morath, A. Mackie, T. Hartung und K. Triantafilou, „Lateral diffusion of Toll-like receptors reveals that they are transiently confined within lipid rafts on the plasma membrane,“ *J Cell Sci*, pp. 117:4007-4014, 2004.
- [73] M. Triantafilou, F. G. J. Gamper, R. M. Haston, M. A. Mouratis, S. Morath, T. Hartung und K. Triantafilou, „Membrane Sorting of Toll-like Receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 Heterodimers at the Cell Surface Determines Heterotypic Associations with CD36 and Intracellular Targeting,“ *J Biol Chem*, pp. 281:31002-31011, 2006.
- [74] H. Grassmé, J. Riethmüller und E. Gulbins, „Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains,“ *Prog Lipid Res*, pp. 46:161-170, 2007.
- [75] E. L. Smith und E. H. Schuchman, „The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases,“ *FASEB J*, pp. 22:3419-3431, 2008.
- [76] X. Han, „Lipid Alterations in the Earliest Clinically Recognizable Stage of Alzheimer's Disease: Implication of the Role of Lipids in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease,“ *Curr Alzheimer Res*, pp. 2:65-77, 2005.
- [77] S. Tsuchiya, M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno und K. Tada, „Establishment And Characterization of a Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1),“ *Int J Cancer*, pp. 26:171-176, 1980.
- [78] M. Zarándi, K. Soós, L. Fülöp, Z. Bozsó, Z. Datki, G. K. Tóth und B. Penke, „Synthesis of A β (1-42) and its derivatives with improved efficiency,“ *J Pept Sci*, pp. 13:94-99, 2007.
- [79] M. M. Bradford, „A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding,“ *Anal Biochem*, pp. 72:248-254, 1976.
- [80] D. Lorton, J.-M. Kocsis, L. King, K. Madden und K. R. Brunden, „ β -Amyloid induces increased release of interleukin-1 β from lipopolysaccharide-activated

- human monocytes," *J Neuroimmunol*, pp. 67:21-29, 1996.
- [81] M. L. D. Udan, D. Ajit, N. R. Crouse und M. R. Nichols, „Toll-like receptors 2 and 4 mediate A β (1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line," *J Neurochem*, pp. 104:524-533, 2008.
- [82] A. Klegeris, D. G. Walker und P. L. McGeer, „Interaction of Alzheimer β -Amyloid peptide with the human monocytic cell line THP-1 results in a protein kinase C-dependent secretion of tumor necrosis factor- α ," *Brain Res*, pp. 747:114-121, 1997.
- [83] S. L. Yates, L. H. Burgess, J. Kocsis-Angle, J. M. Antal, M. D. Dority, P. B. Embury, A. M. Piotrkowski und K. R. Brunden, „Amyloid β and Amylin Fibrils Induce Increases in Proinflammatory Cytokine and Chemokine Production by THP-1 Cells and Murine Microglia," *J Neurochem*, pp. 74:1017-1025, 2000.
- [84] C. K. Combs, J. C. Karlo, S. Kao und G. E. Landreth, „ β -Amyloid Stimulation of Microglia and Monocytes Results in TNF α -Dependent Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Neuronal Apoptosis," *J Neurosci*, pp. 21:1179-1188, 2001.
- [85] A. Sakata, T. Ochiai, H. Shimeno, S. Hikishima, T. Yokomatsu, S. Shibuya, A. Toda, R. Eyanagi und S. Soeda, „Acid sphingomyelinase inhibition suppresses lipopolysaccharide-mediated release of inflammatory cytokines from macrophages and protects against disease pathology in dextran sulphate sodium-induced colitis in mice," *Immunology*, pp. 122:54-64, 2007.
- [86] D. Ajit, M. L. D. Udan, G. Paranjape und M. R. Nichols, „Amyloid β (1-42) Fibrillar Precursors Are Optimal for Inducing Tumor Necrosis Factor- α Production in the THP-1 Human Monocytic Cell Line," *Biochemistry*, pp. 48:9011-9021, 2009.
- [87] L. Lue, R. Rydel, E. F. Brigham, L. Yang, H. Hampel, G. M. Murphy, L. Brachova, S. Yan, D. G. Walker, Y. Shen und J. Rogers, „Inflammatory Repertoire of Alzheimer's Disease and Nondemented Elderly Microglia in Vitro," *GLIA*, pp. 35:72-79, 2001.

- [88] K. A. Rozenova, G. M. Deevska, A. A. Karakashian und M. N. Nikolova-Karakashian, „Studies on the Role of Acid Sphingomyelinase and Ceramide in the Regulation of Tumor Necrosis Factor α (TNF α)-convertig Enzyme Activity and TNF α Secretion in Macrophages,“ *J Biol Chem*, pp. 285:21103-21113, 2010.
- [89] S. Józefowski, M. Czerkies, A. Lukasik, A. Bielawska, J. Bielawski, K. Kwiatkowska und A. Sobota, „Ceramide and Ceramide 1-Phosphate Are Negative Regulators of TNF- α Production Induced by Lipopolysaccharide,“ *J Immunol*, pp. 185:6960-6973, 2010.
- [90] M. E. Bamberger, M. E. Harris, D. R. McDonald, J. Husemann und G. E. Landreth, „A Cell Surface Receptor Complex for Fibrillar β -Amyloid Mediates Microglial Activation,“ *J Neurosci*, pp. 23:2665-2674, 2003.
- [91] Y. B. Lee, A. Nagai und S. U. Kim, „Cytokines, Chemokines, and Cytokine Receptors in Human Microglia,“ *J Neurosci Res*, pp. 69:94-103, 2002.
- [92] M. Fiala, L. Zhang, X. Gan, B. Sherry, D. Taub, M. C. Graves, S. Hama, D. Way, M. Weinand, M. Witte, D. Lorton, Y. Kuo und A. E. Roher, „Amyloid- β Induces Chemokine Secretion and Monocyte Migration across a Human Blood-Brain Barrier Model,“ *Mol Med*, pp. 4:480-489, 1998.
- [93] L. Meda, S. Bernasconi, C. Bonaiuto, S. Sozzani, D. Zhou, L. Otvos, A. Mantovani, F. Rossi und M. A. Cassatella, „ β -Amyloid (25-35) Peptide and IFN- γ Synergistically Induce the Production of the Chemotactic Cytokine MCP-1/JE in Monocytes and Microglial Cells,“ *J Immunol*, pp. 157:1213-1218, 1996.
- [94] J. Herz, J. Pardo, H. Kashkar, M. Schramm, E. Kuzmenkina, E. Bos, K. Wiegmann, R. Wallich, P. J. Peters, S. Herzig, E. Schmelzer, M. Krönke, M. M. Simon und O. Untermöhlen, „Acid sphingomyelinase is a key regulator of cytotoxic granule secretion by primary T lymphocytes,“ *Nat Immunol*, pp. 10:761-768, 2009.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Originalschnitt des ersten von Alzheimer beschriebenen Alzheimer-Falles	5
Abb. 2: Inzidenz der Alzheimer-Demenz je Alter	7
Abb. 3: Sequentielle Prozessierung des APP	9
Abb. 4: Verschiedene Formen des Amyloid β	11
Abb. 5: A β -induzierte Aktivierung von Mikroglia und Monozyten	14
Abb. 6: Ceramidgeneration durch die saure Sphingomyelinase	21
Abb. 7: Möglicher Mechanismus der Transduktion der A β -Toxizität durch die ASM	22
Abb. 8: Struktur der Plasmidvektoren	30
Abb. 9: Insertionskontrolle der Plasmidvektoren	42
Abb. 10: Fluoreszenzmikroskopie von Wild-Type-THP-1-Zellen	43
Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopie von Kontroll-KD-THP-1-Zellen	43
Abb. 12: Fluoreszenzmikroskopie von ASM-KD-THP-1-Zellen	44
Abb. 13: Konzentration von TNF- α im Überstand A β 42- und Pam3CSK4-stimulierter THP-1-Makrophagen	45
Abb. 14: Konzentration von MCP-1 im Überstand A β 42- und Pam3CSK4-stimulierter THP-1-Makrophagen	45
Abb. 15: Konzentration von IL-6 im Überstand A β 42- und Pam3CSK4-stimulierter THP-1-Makrophagen	46
Abb. 16: Konzentration von TNF- α im Überstand Pam3CSK4- und LPS-stimulierter THP-1-Makrophagen	47
Abb. 17: Konzentration von MCP-1 im Überstand Pam3CSK4- und LPS-stimulierter THP-1-Makrophagen	48
Abb. 18: Konzentration von IL-6 im Überstand Pam3CSK4- und LPS-stimulierter THP-1-Makrophagen	49
Abb. 19: Konzentration von TNF- α im Überstand Pam3CSK4-, LPS- und A β 42-stimulierter muriner BMDMs	50
Abb. 20: Konzentration von MCP-1 im Überstand Pam3CSK4-, LPS- und A β 42-stimulierter muriner BMDMs	52
Abb. 21: Western Blot der DGZ-Fraktionen (THP-1, TBS/Triton X-100)	54
Abb. 22: Flotillin-1-Verteilung in den Raft-Fraktionen 4-5 (THP-1, TBS/Triton X-100)	55
Abb. 23: Proteinverteilung in den Fraktionen des Maus-Großhirns (TBS/Triton X-100)	56
Abb. 24: Proteinverteilung in den Fraktionen des Maus-Großhirns (MBS/CHAPSO)	57
Abb. 25: Western Blot der DGZ-Fraktionen (Maus-Großhirn, TBS/Triton X-100)	58
Abb. 26: Western Blot der DGZ-Fraktionen (Maus-Großhirn, MBS/CHAPSO)	60

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Geräte und Instrumente _____	24
Tab. 2: Verwendete Gebrauchsmaterialien _____	25
Tab. 3: Verwendete Antikörper, Sets und Enzyme _____	25
Tab. 4: Verwendete Substanzen und Chemikalien _____	26
Tab. 5: Salzlösungen bzw. -puffer _____	28
Tab. 6: Verwendete Restriktionsendonukleasen _____	30
Tab. 7: Restriction Digest der Plasmide durch BamHI und BglII _____	31
Tab. 8: Zusammensetzung des Erythrozyten-Lysepuffers _____	33
Tab. 9: Zusammensetzung der Zellkulturmedien _____	33
Tab. 10: Puffer und Lösungen für ELISA _____	36
Tab. 11: Zusammensetzung des SDS-PAGE Gels _____	38
Tab. 12: Zusammensetzung des SDS-PAGE Puffers (10x) _____	38
Tab. 13: Zusammensetzung des SDS-PAGE Sample Loading Puffers (3x) _____	38
Tab. 14: Zusammensetzung des Blotting-Sandwich _____	39
Tab. 15: Zusammensetzung des Transferpuffers _____	40
Tab. 16: Zusammensetzung des Blockpuffers _____	40
Tab. 17: Antikörper für Western Blot (THP-1) _____	40
Tab. 18: Antikörper für Western Blot (Maus-Großhirn) _____	41

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klaus Faßbender möchte ich für die interessante Themenstellung und das Gestalten der positiven Rahmenbedingungen, die ganz wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beitragen, sehr danken.

Ebenso möchte ich Dr. Alex Liu für seine unerlässliche fachkundige und konstruktive Betreuung einen großen Dank aussprechen.

Ein herzlicher Dank gebührt Dipl.-Biol. Kan Xie für die umfangreiche Laboreinweisung und seine jederzeit engagierte, produktive und kompetente Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch beim gesamten Laborteam, insbesondere Andrea Schotteck für die kleine Hilfe zwischendurch und bei Timo Boch für seine Hilfestellung zu Beginn.

Ein Dank gilt Dr. Wenlin Hao für das Bereitstellen der Plasmide und Prof. Dr. Botond Penke (Universität Szeged, Ungarn) für das Zurverfügungstellen des Amyloid β_{42} .

Ein ganz liebevolles Dankeschön schulde ich meiner Freundin Eva Portscheller für die konstruktiven fachlichen Gespräche und ihre großartige Rücksichtnahme.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Alexander Weich für seine Ermutigungen und die bereichernden thematischen Diskussionen und auch bei meinen Eltern für das Ermöglichen meines Studiums und ihre stete Unterstützung.

10 Lebenslauf

Name: Wolfgang Frederik Weich
Anschrift: Hans-Gick-Straße 6
96117 Memmelsdorf
Geburtsdatum: 08. September 1987
Geburtsort: Lichtenfels
Telefon: 0173 678 28 79
E-Mail: mail@cisne.de

Schulischer / beruflicher Werdegang:

1997-2006 Kaiser-Heinrich-Gymnasium Bamberg
(Humanistischer Bildungszweig)
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

2006/07 WS Studium der Fahrzeug- und Motorentechnik
(Technische Universität München)

2007 SS Studium der Zahnmedizin
(Friedrich-Alexander-Universität Erlangen)

Seit 2007/08 WS Studium der Humanmedizin
(Universität des Saarlandes, Homburg)

09/2009 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Seit 08/2012 Praktisches Jahr
(Knappschaftsklinikum Saar, Püttlingen)