

**Die CCL17-abhängige Neuroinflammation in einem Mausmodell der
Alzheimer Demenz**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Christina Müller geb. Sterzenbach
aus Solingen

2016

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Zimmer
2. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Walter

Tag der Mündlichen Prüfung: 23.05.2016

Aus dem Institut für Molekulare Psychiatrie
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Zimmer

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	5
1.	Einleitung	7
1.1	Die Alzheimer Demenz.....	7
1.1.1	Epidemiologie und Geschichte der Alzheimer Demenz	7
1.1.2	Klinik, Prognose und Therapie der Alzheimer Demenz.....	7
1.1.3	Pathologie der Alzheimer Demenz	8
1.1.4	Genetik der Alzheimer Demenz.....	11
1.2	Monozyten und Makrophagen	12
1.2.1	Morphologie und Funktionen	12
1.2.2	Monozyten-Migration	13
1.2.3	Aktivierungsstadien von Makrophagen.....	15
1.2.4	Monozyten und Makrophagen in der AD	16
1.3	Chemokine und Chemokinrezeptoren	17
1.3.1	Chemokine und Chemokinrezeptoren in der AD	18
1.3.2	Das Chemokin CCL17 und der Chemokin-Rezeptor CCR4	19
1.3.3	Das CC-Chemokin CCL2 und der CC-Chemokin-Rezeptor CCR2	21
2.	Zielsetzung der Arbeit.....	24
3.	Material und Methoden	25
3.1	Material.....	25
3.1.1	Allgemeine Laborgeräte	25
3.1.2	Verbrauchsmaterial	26
3.1.3	Antikörper und Primer.....	27
3.1.4	Lösungen, Chemikalien, Kits	28
3.1.5	Puffer und Medien	29
3.2	Methoden.....	30
3.2.1	Zucht- und Haltungsbedingungen der Mäuse	30
3.2.2	Präparation von genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsien	30
3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
3.2.4	Immunfluoreszenz	31

3.2.4.1	Herstellung von Gewebeschnitten.....	31
3.2.4.2	Thioflavin-Färbung.....	31
3.2.4.3	Immunfluoreszenz-Färbung.....	32
3.2.4.4	Quantitative mikroskopische Fluoreszenz-Analyse	33
3.2.5	Etablierung von Kulturen aus Knochenmark-Monozyten	34
3.2.5.1	Isolation von Monozyten aus dem Knochenmark.....	34
3.2.5.2	Generierung von Knochenmarksmakrophagen.....	34
3.2.5.3	Stimulation von Makrophagen mit LPS, CCL17 und CCL22	34
3.2.6	Durchflusszytometrie	35
3.2.6.1	Allgemeines Funktionsprinzip.....	35
3.2.6.2	Durchflusszytometrische Färbung	35
4.	Ergebnisse	37
4.1	Quantifizierung des neuronalen Verlusts im Hippocampus.....	37
4.2	Charakterisierung der inflammatorischen Reaktion.....	38
4.2.1	Astrozytose und Mikrogliose.....	38
4.2.2	Darstellung CCR2-exprimierender Zellen.....	43
4.3	Analyse der CCR2-Expression auf Knochenmark-Makrophagen	46
5.	Diskussion	51
5.1	Verminderter neuronaler Zellverlust im ZNS von APP/PS1xCCL17 ^{E/E} -Mäusen.....	51
5.2	Erhöhte Mikrogliose im ZNS von APP/PS1xCCL17 ^{E/E} -Mäusen	52
5.3	Verstärkte Akkumulation CCR2-positiver Zellen im Bereich der Plaques bei APP/PS1xCCL17 ^{E/E} -Mäusen.....	55
5.4	Unverändertes CCR2-Expressionsmuster auf peripheren Monozyten aus WT und CCL17 ^{E/E} -Mäusen.....	56
6.	Zusammenfassung.....	60
7.	Tabellenverzeichnis	62
8.	Abbildungsverzeichnis	63
9.	Literaturverzeichnis	64
10.	Danksagung.....	71
11.	Lebenslauf.....	72

Abkürzungsverzeichnis

AAM	alternativ-aktivierte Makrophagen
A β	Amyloid- β
AD	Alzheimer Demenz
APOE4	Apolipoprotein E4
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
APP	Amyloid precursor protein
CA1, CA3	Cornu Ammonis (Region 1 / 3)
CAM	klassisch (classically) -aktivierte Makrophagen
CCL	Chemokinligand
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
DZ	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentelle Autoimmun-Enzephalitis
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
FACS	Fluorescent activated cell sorting
FBR	Fremdkörperreaktion (foreign body reaction)
FCS	Fetales Kälberserum
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
HBSS	Hanks buffered salt saline
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid

Ly6C	lymphozytäres Antigen 6C
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MWM	Morris water maze
MPS	mononukleäres Phagozyten-System
MS	Multiple Sklerose
NeuN	Neuronal Nuclei
NFT	Neurofibrillary tangles
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PS1	Presenilin1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDAT	Senile Demenz vom Alzheimer Typ
Std.	Stunde
TARC	Thymus and activation regulated chemokine
tg	transgen
TGF	Transforming growth factor
Th1	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
UpM	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Die Alzheimer Demenz

1.1.1 Epidemiologie und Geschichte der Alzheimer Demenz

Weltweit sind fast 30 Millionen Menschen von der Alzheimer Demenz betroffen und die Bedeutung nimmt bei steigender Lebenserwartung durch den demographischen Wandel weiter zu (Prince et al., 2013). 20 % aller 85-Jährigen zeigen Symptome dieser Krankheit. Insgesamt ist Morbus Alzheimer verantwortlich für den Großteil aller Demenzfälle (Prince et al., 2013). Der erste Fall wurde von Alois Alzheimer im Jahre 1901 beschrieben und basierte auf den Beobachtungen der Patientin Auguste Deter. Anfangs allein aufgrund der Symptome beschrieben als „Krankheit des Vergessens“, zeigten sich in der postmortalen Mikroskopie zugrunde gegangene Nervenzellen und Eiweißablagerungen (Alzheimer, 1907). In weiterführenden Untersuchungen wurde ein Typ 1 mit frühem Beginn (vor dem 65. Lebensjahr) vom Typ 2 mit spätem Beginn (ab dem 65. Lebensjahr) und langsamerer Progredienz abgegrenzt. In etwa 5 % der Fälle zeigt sich eine familiäre Häufung (Familial Alzheimer Disease, FAD); dies lässt sich auf Mutationen spezifischer Gene zurückführen (DGPPN und DGN, 2009).

1.1.2 Klinik, Prognose und Therapie der Alzheimer Demenz

Charakteristisch für die Alzheimer-Erkrankung ist eine zunehmende Verschlechterung der kognitiven Leistungsfähigkeit. Bei der häufigeren sporadischen Form beginnend nach dem 65. Lebensjahr, tritt zuerst eine Einschränkung besonders des Kurzzeitgedächtnisses auf. Die Demenz bei der Alzheimer-Erkrankung äußert sich weiterhin in einem Verlust bereits gelernter Materials, einer Beeinträchtigung des Denkvermögens und einer damit verbundenen alltagsrelevanten Einschränkung der Lebensführung. Für die Diagnosestellung eines demenziellen Syndroms müssen die Symptome über 6 Monate bestehen („Demenz-Leitlinie“, 2012). Es stehen sowohl unterschiedliche psychische Symptome wie der progrediente Verlust kognitiver Fähigkeiten, Verhaltensauffälligkeiten und Wahnvorstellungen als auch physische Beeinträchtigungen wie Inkontinenz, Schlaflosigkeit und Myoklonien im Vordergrund. Anhand klinischer Tests können eine leichte, eine mittelschwere/moderate und eine schwere Form unterschieden werden. Die Alzheimer Demenz ist bis heute nicht heilbar.

Zur begrenzten Verbesserung der Symptome und Verlangsamung der Progression werden z.B. Cholinesteraseinhibitoren eingesetzt, welche die Verminderung der freigesetzten Acetylcholinmenge durch den neuronalen Verlust teilweise kompensieren (DGPPN und DGN, 2009).

1.1.3 Pathologie der Alzheimer Demenz

Die Pathologie der Alzheimer-Erkrankung ist charakterisiert durch extrazelluläre Plaques, intrazelluläre neurofibrilläre Bündel und infolge der damit einhergehenden Neurodegeneration erheblichen Verlust von Synapsen und Nervenzellen. Der Hippocampus ist die am schwersten betroffene Hirnregion, gefolgt von corticalen Regionen. Infolge des Substanzverlustes kommt es zu einer makroskopisch sichtbaren Schrumpfung des Cortex sowie Vergrößerung der Sulci und Ventrikel (Double et al., 1996).

Abb. 1 zeigt im Vergleich Querschnitte des menschlichen Gehirns von (a) nicht erkrankten und (b) an der Alzheimer-Erkrankung erkrankten Personen. Es ist bekannt, dass eine Hirnschrumpfung aufgrund corticaler Atrophie auch bei nicht erkrankten Personen im Rahmen des Alterungsprozesses auftreten kann (Fjell et al., 2009). Jedoch kann der Umfang der Atrophie bei Alzheimer-Patienten 12 % pro Jahr betragen und scheint direkt assoziiert zu sein mit dem Verlust an kognitiven Fähigkeiten (de Jager, 2014). Bereits in frühen Krankheitsstadien wird eine Atrophie des medialen Temporallappens in der kranialen Bildgebung sichtbar, die sich mit dem Progress der Erkrankung über die anderen cortexassoziierten Regionen ausbreitet. Es ist bekannt, dass besonders die CA3-Region des Hippocampus sowohl in Menschen als auch in transgenen Mäusen hoch empfindlich ist gegenüber der A β -Pathologie und als Hauptafferenz der Schaffer-Kollateralen starke Aktivität in der Neubildung von Erinnerungen besitzt, die typischerweise bei der AD vorrangig kompromittiert ist (Llorens-Martín et al., 2014; Rodríguez et al., 2013). Die in der CA3-Region sitzenden Neurone entsenden Axone zur CA1-Region (als Schaffer-Kollateralen) oder projizieren direkt zu CA1, Subiculum oder Entorhinalem Cortex (Zhang, 2011).



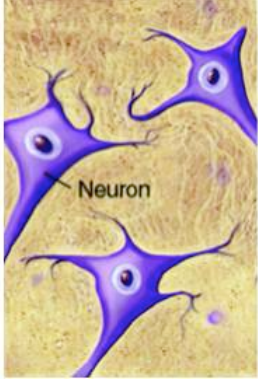
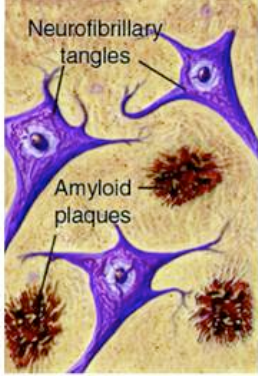
	Gesundes Gehirn	M. Alzheimer
Makropathologie	 a	 b
Mikropathologie	 c	 d

Abb. 1: Pathologie der Alzheimer Demenz

Vergleichende Abbildungen von (a) gesundem und (b) AD-erkranktem Gehirn verdeutlichen den makroskopisch sichtbaren Substanzverlust bei der Alzheimer Demenz. Mikroskopisch sind bei der AD intrazelluläre neurofibrilläre Bündel und extrazelluläre Amyloid-Ablagerungen (senile Plaques) nachweisbar (d), die im gesunden Gewebe nicht vorhanden sind (c). (modifiziert nach Silbert, 2007; Takahashi et al., 2010).

In Abb. 2 ist die Mikropathologie dargestellt, die bei der Alzheimer-Erkrankung in Form von Amyloid- β Plaques und neurofibrillären Fasern besteht. Wie in Abb. 2a erkennbar, ist die Produktion von Amyloid- β ein Ergebnis der proteolytischen Spaltung von APP (Amyloid Precursor Protein) durch Sekretasen. APP ist ein Transmembran-Protein, das als Eisenoxidase fungiert und für den Transport des oxidierten, dreiwertigen Eisens aus der Nervenzelle sorgt (Duce et al., 2011). Proteolytische Spaltung durch die α -Sekretase führt zu nicht-toxischen, abbaubaren Proteinfragmenten. Überwiegt jedoch die Internalisation des Membran-gebundenen APP, wird der amyloidogene Weg der APP-Spaltung durch die β -Sekretase und das Präsenilin, ein Teil der γ -Sekretase, innerhalb

des Endosoms aktiviert (Cole und Vassar, 2008; Thinakaran und Koo, 2008). Die daraus hervorgehenden A β -Monomere neigen zur Aggregation und bilden über Polymerisation die für die AD typischen senilen Plaques (Abb. 2a) (Götz und Ittner, 2008).

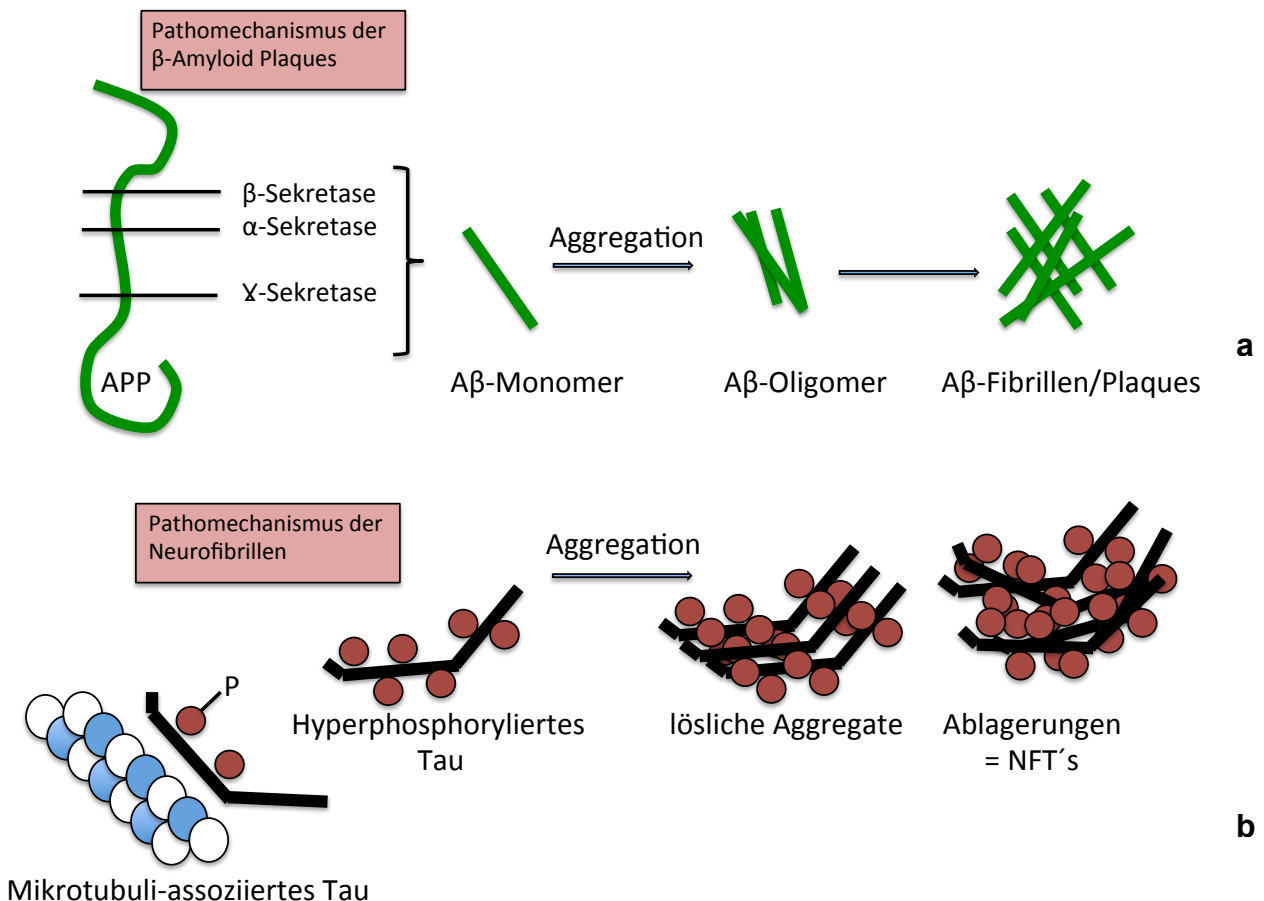


Abb. 2: Pathomechanismus der Alzheimer Demenz

(a) zeigt ein Modell der A β -Polymerisation. Die aus der proteolytischen Spaltung hervorgehenden Monomere dimerisieren, bilden Oligomere und zuletzt extrazelluläre unlösliche senile Plaques (modifiziert nach Thinakaran und Koo, 2008). Die in (b) dargestellte Bildung der intrazellulären Fibrillen beruht auf der Aggregation hyperphosphorylierten Tau-Proteins (modifiziert nach Medina und Avila, 2014).

Die neurofibrillären Läsionen entstehen wie in Abb. 2b dargestellt aus dem Tau-Protein. Unter physiologischen Bedingungen ist dieses hauptsächlich axonal lokalisiert, um Mikrotubuli zu stabilisieren. Unter pathologischen Bedingungen liegt das Tau-Protein hyperphosphoryliert und damit dissoziiert von den Mikrotubuli vor. Die aggregierten Tau-

Ablagerungen bilden neurofibrilläre Läsionen (Götz und Ittner, 2008). Die Menge an APP ist in den Gehirnen AD-erkrankter Patienten stark erhöht (Rubio-Perez und Morillas-Ruiz, 2012).

Sowohl genetische als auch biochemische und inflammatorische Faktoren sind an Initiation und Progression der Alzheimer-Erkrankung wesentlich beteiligt (Walter und van Echten-Deckert, 2013). Mäuse, die für die hier beschriebenen Experimente verwendet wurden, gehören zu einer doppelt transgenen Mauslinie (APP/PS1) und sind ein gut untersuchtes Krankheitsmodell der Alzheimer Demenz. Die mutierte Form des Amyloid Precursor Proteins (APP) führt zu einer starken Erhöhung des A β -Levels und A β -Ablagerungen in Hippocampus und Cortex (Carrera et al., 2013). Eine Mutation des kodierenden Gens für Präsenilin 1 als Teil der γ -Sekretase führt zu einer Steigerung der APP-Produktion und damit einhergehend zu beginnenden Amyloid-Ablagerungen in den Gehirnen 6 Monate alter doppelt transgener Mäuse (Bentahir et al., 2006; Carrera et al., 2013).

1.1.4 Genetik der Alzheimer Demenz

In 5-10 % der Erkrankungsfälle wird die Alzheimer-Erkrankung autosomal-dominant vererbt. Die betroffenen Personen entwickeln die typischen Symptome schon wesentlich früher, teilweise vor dem 30. Lebensjahr. Diese familiäre Form der Alzheimer Demenz wird „Early-onset familial Alzheimer’s disease“ (EOFAD) genannt (Selkoe, 2001).

Folgende Mutationen sind als prädisponierende genetische Faktoren für die Alzheimer-Erkrankung bekannt:

Tab. 1: Genetik der Alzheimer Demenz

Dargestellt sind typische Gendefekte, die über den Pathomechanismus der Amyloid- β -Ablagerungen zur Alzheimer-Demenz führen (modifiziert nach Selkoe, 2001).

Chromosom	Gendefekt	Phänotyp
21	β -APP Mutation	↑ Produktion aller A β / A β ₄₀ Peptide
19	ApoE4 Polymorphismus	↑ Dichte der A β Plaques
14	Präsenilin 1 Mutation	↑ Produktion der A β ₄₂ Peptide
1	Präsenilin 2 Mutation	↑ Produktion der A β ₄₂ Peptide

1.2 Monozyten und Makrophagen

1.2.1 Morphologie und Funktionen

Das mononukleäre Phagozyten-System (MPS) erstreckt sich über verschiedene Gewebe des Körpers und besteht aus spezialisierten Zellen wie u.a. Gewebsmakrophagen, Mikroglia, Dendritische Zellen, Kupfferzellen und Osteoklasten. Im Rahmen von Untersuchungen zur Rekonstitution dieser Zellpopulationen wurden verschiedene Vorgänge wie Selbsterneuerung differenzierter Zellen, Proliferation der Knochenmark-Vorläufer-Zellen und kontinuierliche Extravasation und Differenzierung zirkulierender Monozyten beschrieben (Geissmann et al., 2003). Morphologisch unterscheiden sich die einzelnen Formen in Größe und Granularität. Monozyten sind unvollständig differenzierte, aus myeloiden Progenitorzellen (Vorläuferzellen) im Knochenmark entstammende Zellen und besitzen im peripheren Blutkreislauf eine Lebenszeit von 1-3 Tagen. Sie sind sowohl in Menschen als auch in Mäusen charakterisiert durch die Expression von Integrinen wie z.B. CD11b und CD115, die schon in frühen Stadien während der Fetalzeit auf der Zellmembran gefunden wurde (Geissmann et al., 2008; Gordon und Taylor, 2005). Weitere Oberflächenmarker lassen eine funktionelle Klassifizierung zu. Zwei verschiedene Untergruppen von Maus-Monozyten wurden bisher identifiziert, die sich im Expressionsprofil spezifischer Oberflächenmarker unterscheiden: Inflammatorische CCR2- und Ly6C-exprimierende Monozyten, die aktiv zu entzündlichen Prozessen rekrutiert werden, und Ly6C-negative Monozyten, die regelmäßig in gesunde Gewebe einwandern und dort als residente Monozyten die Population der Gewebemakrophagen aufstocken (siehe Abb. 3). Weiterhin ist eine Differenzierung zu DZ (Dendritischen Zellen) und Osteoklasten möglich (Gaelle und Rivest, 2013).

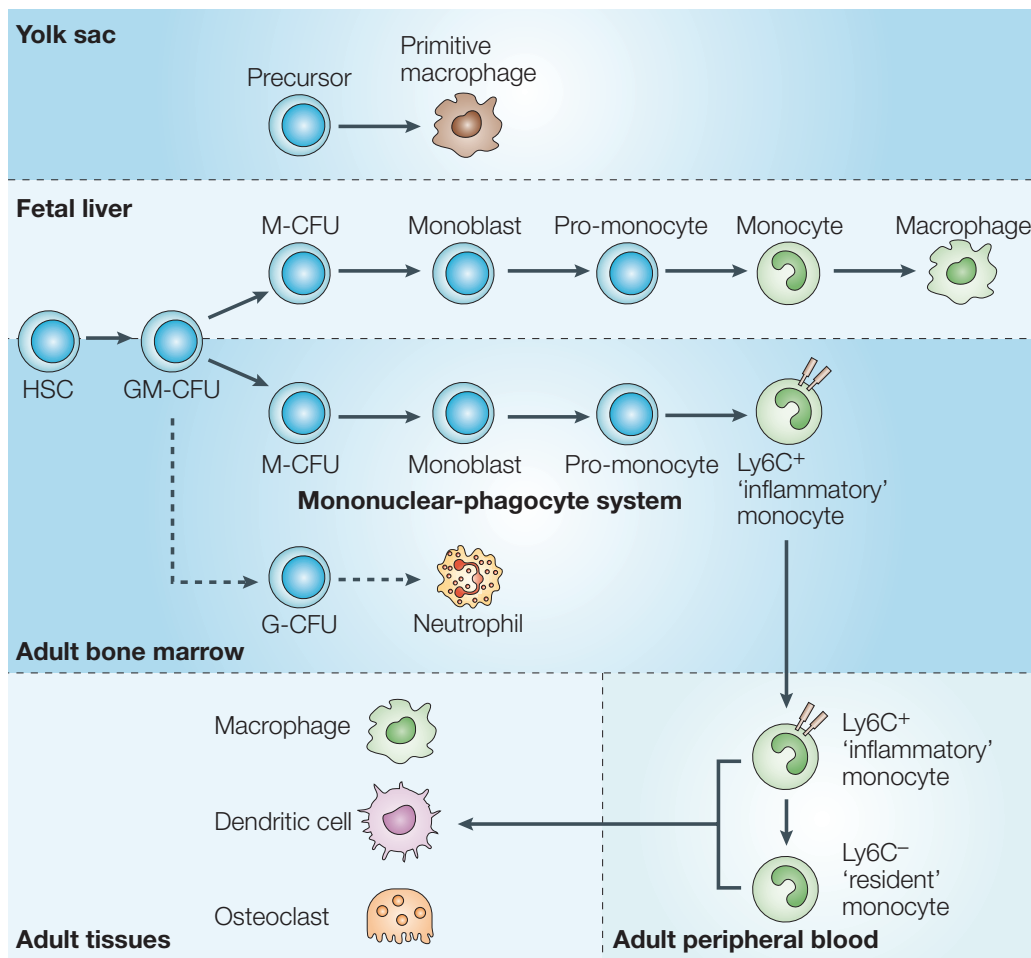


Abb. 3: Heterogenität der Monozyten und Makrophagen

Die Abbildung verdeutlicht den hämatopoetischen Ursprung der mononukleären Phagozyten. Schon die während der Entwicklung in Dottersack und fetaler Leber entdeckten Makrophagen konnten über typische Marker wie CD11b identifiziert werden. Die Regenerierung und Aufstockung adulter Makrophagen erfolgt über Rekrutierung der aus dem Knochenmark freigesetzten Monozyten als Vorläuferzellen, wie hier dargestellt, oder über lokale Proliferation innerhalb des Zielgewebes (Abbildung aus Gordon und Taylor, 2005).

1.2.2 Monozyten-Migration

Die Fähigkeit der Monozyten, in erkrankte Gewebe zu migrieren und dort zu Makrophagen und Dendritischen Zellen zu differenzieren, wurde schon früh beobachtet. Diese Migration ist abhängig von pro-inflammatorischen und metabolischen Stimuli und trägt zur Immunabwehr und Gewebereparatur bei. Als wesentlich beteiligt an der Rekrutierung peripherer Monozyten zu inflammatorischen Läsionen wurden im Mausmodell das CC-Chemokin CCL2 (CC-Chemokin-Ligand 2, alte Nomenklatur

MCP1) und der dazugehörige CC-Chemokin-Rezeptor CCR2 (CC-Rezeptor 2) identifiziert. Entsprechende Oberflächenmarker auf menschlichen Monozyten sind CD14 und CD16 (Geissmann et al., 2003; Gordon und Taylor, 2005). Es wurde gezeigt, dass CCR2-defiziente Mäuse eine signifikante Reduktion eingewanderter Zellen in verschiedenen Krankheitsmodellen aufweisen, z.B. experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), Peritonitis, Tuberkulose und auch Alzheimer-Erkrankung (Prinz und Priller, 2010). Dabei wird die Rolle der Monozytenmigration in geschädigtes Gewebe in der Literatur kontrovers diskutiert. Einhergehend mit der Freisetzung proinflammatorischer und toxischer Stoffe wurde eine durch die eingewanderten aktivierten Monozyten vermittelte zusätzliche Schädigung regionaler Zellen, z.B. Neuronen, beobachtet (Sawyer et al., 2014). Andererseits wurden Ly6C- und CCR2-exprimierende Monozyten des ZNS - ausdifferenzierte Mikroglia, als Zellen höchster Amyloid-Phagozytosekapazität identifiziert (Gaelle und Rivest, 2013). Neben der Einwanderung in Regionen lokaler Inflammation wurde eine Rekrutierung in drainierende Lymphknoten beschrieben. Es zeigte sich, dass nach Phagozytose ein Teil der Makrophagen das Gebiet der Inflammation wieder verlässt und inklusive des ingestierten Materials zu drainierenden Lymphknoten wandert. Das Expressionsprofil der Monozyten zeigte dabei durch Heraufregulation der Oberflächenmarker CD11c und MHCII (major histocompatibility complex class II) eine Differenzierung zu Dendritischen Zellen an. Dieser Vorgang wurde als CCR2-unabhängig beschrieben. Er ist im Gegenteil bei CCR2-Defizienz verstärkt zu beobachten (Gordon und Taylor, 2005).

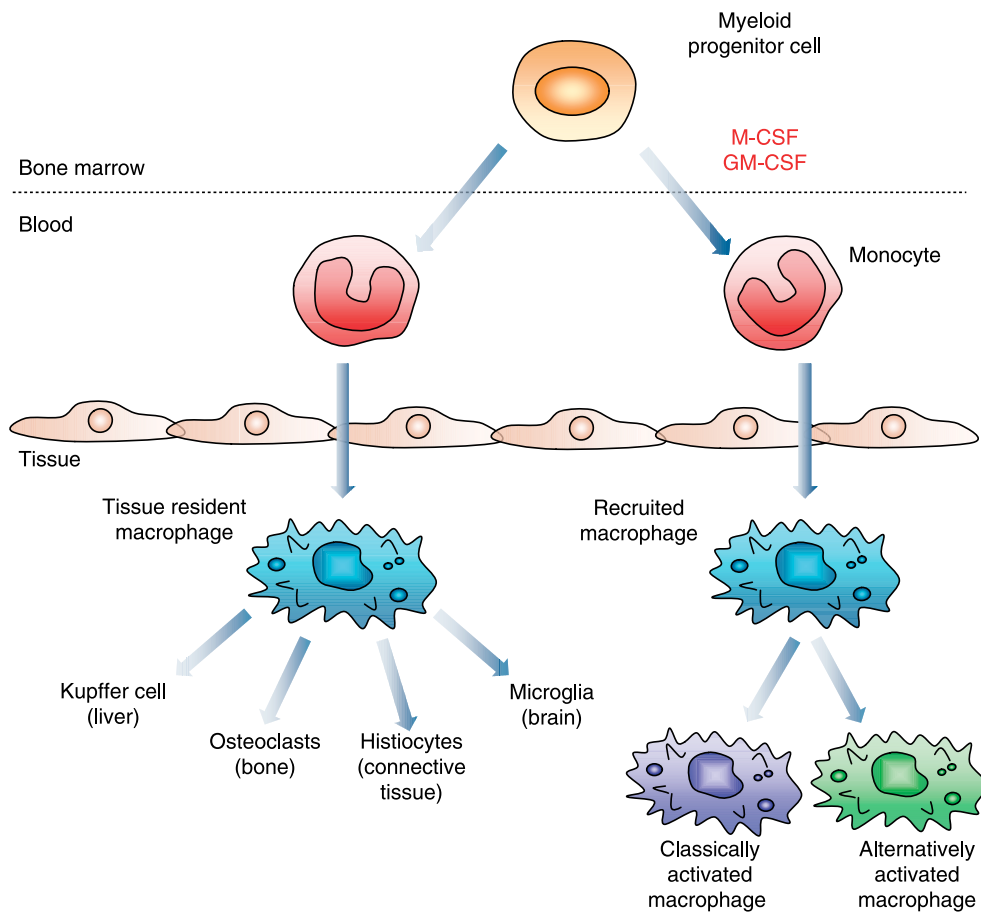


Abb. 4: Entwicklung und Differenzierung von Makrophagen

Monozyten aus dem Knochenmark werden in die periphere Blutbahn freigesetzt und zirkulieren einige Tage in einem inaktiven Stadium, bevor sie andere Gewebe betreten und zu regionalen Gewebemakrophagen differenzieren. Makrophagen werden rekrutiert, um den Bestand der residenten Population aufzufüllen oder als Reaktion auf eine Inflammation oder Immun-Stimulus. Je nachdem werden die Makrophagen in klassische oder alternativ aktivierte Formen unterteilt (Abbildung aus Rickard und Young, 2009).

1.2.3 Aktivierungsstadien von Makrophagen

Neben der Einteilung der Monozyten in inflammatorische und nicht-inflammatorische Formen wurden verschiedene Aktivierungsstadien beschrieben, die sich in ihren immunbiologischen Eigenschaften unterscheiden. Klassisch aktivierte Makrophagen (CAM = classically activated macrophages) spielen vor allem eine Rolle bei der antimikrobiellen Immunabwehr, üben bei der Tumorbekämpfung zytotoxische Effekte aus und setzen proinflammatorische Zytokine frei. Alternativ aktivierte Makrophagen (AAM = Alternatively Activated Macrophages) hingegen agieren als Gegenspieler und regulieren die Generierung von CAM sowie Th1 (T-Helfer-Zellen). Durch AAM

freigesetztes CCL17 wurde dabei als Effektormolekül zur Inhibition der CAM-Produktion identifiziert (Katakura et al., 2004).

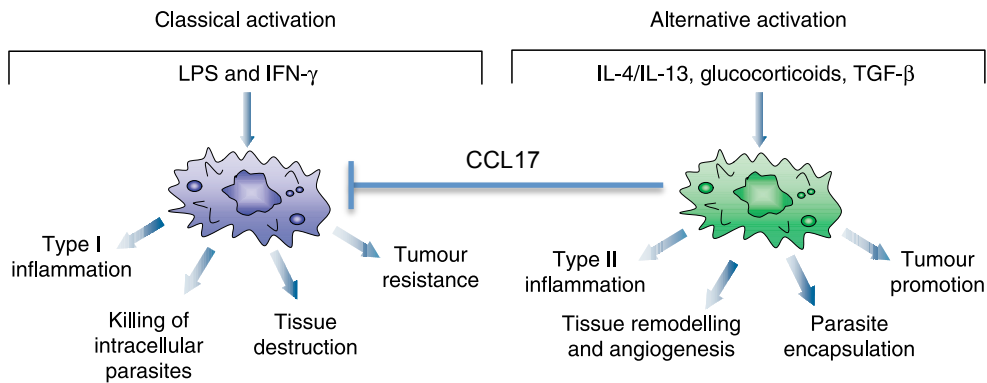


Abb. 5: Klassische und alternative Aktivierung von Makrophagen

Klassisch aktivierte Makrophagen reagieren auf IFN- γ und LPS (Lipopolysaccharid) und spielen eine wichtige Rolle bei der Typ-I-Inflammation, Abwehr intrazellulärer Parasiten oder der Tumorabwehr. Alternativ aktivierte Makrophagen werden durch Interleukine (IL), Immunkomplexe, TGF- β oder Kortikosteroide angeregt und tragen bei zu der Typ-II-Inflammation, Gewebe-Remodellierung, Angiogenese und Tumorprogression (modifiziert nach Rickard und Young, 2009).

1.2.4 Monozyten und Makrophagen in der AD

Die ersten Beobachtungen Plaque-assoziiierter Mikroglia (Gehirnmakrophagen) bezeichneten diese als Begleitphänomen der AD-typischen Pathologie. Weitere, die Rolle der Makrophagen in der AD untersuchende Studien diskutierten schädigende und protektive Effekte. Erste Hinweise auf eine relevante Reduktion des Amyloid-Levels durch eingewanderte Makrophagen ergaben sich nach mikroskopischer Identifikation lysierter Amyloid-Fibrillen innerhalb der infiltrierenden Zellen, nicht jedoch in residenten Mikroglia (Wisniewski et al., 1991). Weitere Studien mit Mausmodellen zur Komorbidität von AD und Apoplex bekräftigten die Hypothese, dass aus der Peripherie eingewanderte Monozyten eine höhere Effizienz in der Amyloid-Elimination besitzen als residente Mikroglia (Akiyama et al., 1996; Frackowiak et al., 1992). Die limitierte Phagozytosekapazität der Mikroglia wurde der im Vergleich zu peripheren Monozyten niedrigen hydrolytischen Aktivität der endosomalen und lysosomalen Enzyme zugeschrieben (Majumdar et al., 2008). Durch die Generierung von letal bestrahlten knochenmarkschimären Mäusen, denen GFP (Green Fluorescent Protein)-

exprimierendes Knochenmark transplantiert wurde, konnten aus dem Knochenmark stammende monozytäre Phagozyten eindeutig von residenten Mikroglia unterschieden werden. Gekreuzt mit verschiedenen Mausmodellen zur Untersuchung der Pathophysiologie neurologischer Erkrankungen konnte je nach Pathologie eine bis zu 50-fach erhöhte Einwanderung von knochenmark-entstammenden Monozyten ins ZNS nachgewiesen werden (Priller et al., 2001). Auch in doppelt-transgenen APP/PS1 Alzheimer-Mausmodellen wurde eine erhöhte Infiltration sowie protektive Effekte beschrieben: eine signifikante Reduktion der A β -Akkumulation (Keene et al., 2010) sowie die Präsenz von Amyloid-Ablagerungen in GFP-positiven eingewanderten Monozyten (Simard et al., 2006). Die Rekrutierung monozytärer Phagozyten in Mausmodellen für die AD wurde assoziiert mit gesenkter Amyloid-Last und einer niedrigeren Mortalität (El Khoury et al., 2007). Die funktionelle Rolle der residenten Mikroglia in der Amyloid-Elimination hingegen wird in neueren Studien kontrovers diskutiert, die nach selektiver Mikroglia-Ablation im ZNS von APP/PS1-Mäusen keinen Unterschied in A β -Last, -Morphologie und -Verteilung feststellen konnten (Grathwohl et al., 2009). Mit der Identifikation verantwortlicher Faktoren wie CCR2 wurde die Einbeziehung mononukleärer Phagozyten als Zielstruktur potentieller therapeutischer Wirkstoffe in Erwägung gezogen. Für einen effektiven Einsatz der Monozytenrekrutierung sollen Strategien zur Erhöhung der Rekrutierung ins ZNS und zur Verstärkung der Amyloid-Bekämpfung entwickelt werden (Li und Ransohoff, 2008).

1.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine sind kleine sezernierte Proteine und wurden ursprünglich definiert als chemotaktische Zytokine. Ihre Aufgabe besteht im Wesentlichen aus der Regulation der Leukozytenmigration unter inflammatorischen Bedingungen (Cartier et al., 2005). Als plurifunktionale und auf viele Zelltypen einwirkende Akteure sind sie außerdem involviert in die Modulation von Zelladhäsion, -proliferation und -aktivierung, Phagozytose, Apoptose, Zytokinsekretion und Angiogenese. Eingeteilt werden sie nach Anzahl und Lokalisation enthaltener konservierter Cystein-Reste in ihrer Aminosäuresequenz in C, CC, CXC und CX3C Chemokine. Die Nomenklatur benutzt diese Einteilung, gefolgt von „L“ (Ligand) und einer Nummer (z.B. CCL2) (Zlotnik und Yoshie, 2000). Die Chemokinrezeptoren werden benannt nach der Gruppe der aktivierenden Chemokine, gefolgt von „R“ (Rezeptor) und einer Nummer (z.B. CCR2). Weiterhin können die Chemokine nach

ihrer Funktionalität in inflammatorische und homöostatische Chemokine eingeteilt werden. Inflammatorische Chemokine werden als Reaktion auf Pathogene oder pro-inflammatorische Zytokine sezerniert, während homöostatische Chemokine unter physiologischen Bedingungen kontinuierlich vorhanden sind und in die Modulation des adaptiven Immunsystems involviert sind. Chemokine üben ihre Effekte über Interaktion mit den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR's) aus. Diese gehören zur Familie der 7-Transmembran-Domän-Rezeptoren und übermitteln von extrazellulär kommende Signale nach intrazellulär über heterotrimäre GTP-Bindungs-Proteine.

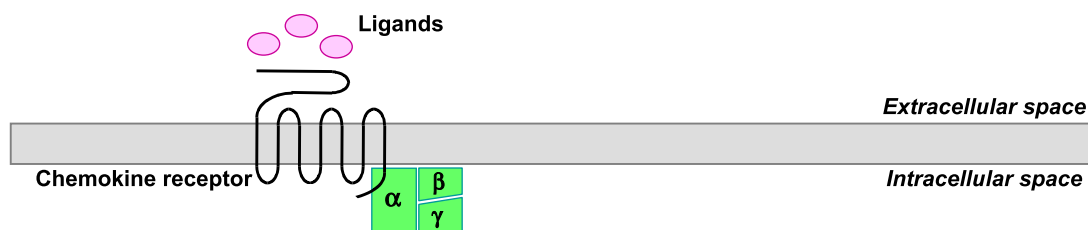


Abb. 6: Aktivierung eines Chemokin-Rezeptors

Der Ligand (das Chemokin) bindet an den extrazellulären Teil des 7-Transmembran-Domän-Rezeptors. Das heterotrimäre GTP-Bindungs-Protein besteht aus α , β und γ Untereinheiten, die durch Aktivierung dissoziieren und die intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzen (modifiziert nach Cartier et al., 2005).

Die Bindung von Liganden an Rezeptoren ist teilweise redundant. So können verschiedene Liganden einen Rezeptor aktivieren und auch ein Ligand kann Bindungen mit verschiedenen Rezeptoren eingehen (Cartier et al., 2005).

1.3.1 Chemokine und Chemokinrezeptoren in der AD

Es gibt zunehmend Hinweise auf wichtige Funktionen der Chemokine sowohl in der ZNS-Physiologie als auch unter pathologischen Bedingungen. Das Expressionsmuster beteiligter Chemokine wurde bereits in Krankheitsmodellen der MS (Multiple Sklerose), des Hirntraumas, verschiedener Infektionen und der HIV-Enzephalopathie untersucht (Akiyama et al., 2000). Auch in der Alzheimer Demenz wurde eine vermehrte Expression etlicher Chemokine und Chemokin-Rezeptoren nachgewiesen, für diese wurde hauptsächlich eine Heraufregulierung in ZNS-Zellen verantwortlich gemacht (Xia und Hyman, 1999). Untersuchungen zu direkten und indirekten Folgen der erhöhten Level ergaben zuerst Hinweise auf schädigende Effekte. Es wurde angenommen, dass Chemokine einen zusätzlichen Beitrag zur Plaque-assoziierten Inflammation und

Neurodegeneration leisten (Akiyama et al., 2000). Sowohl auf dystrophierten Neuriten in senilen Plaques als auch auf reaktiven Mikroglia wurde eine erhöhte Chemokin- und Chemokinrezeptor-Produktion beobachtet (Xia und Hyman, 1999). In einem weiteren Schritt wurde gezeigt, dass die Chemokin-Expression auf mononukleären Zellen *in vitro* durch den Einfluss von A β gesteigert wird (Lue et al., 2001). Diese Feststellung ließ die Rekrutierung und Akkumulation von Astrozyten und Mikroglia in den senilen Plaques als weiteren, womöglich protektiven Effekt der Plaque-assoziierten Chemokin-Produktion erscheinen. Mittlerweile wurde die Expression zahlreicher Chemokine und ihrer Rezeptoren im ZNS beschrieben. Während die Mehrheit der Chemokine nur unter pathologischen Bedingungen produziert wird, werden verschiedene Rezeptoren wie CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR2, CXCR3, CXCR4 und CX3CR1 konstitutiv exprimiert (Cartier et al., 2005). Die in der AD durch A β induzierbaren Chemokine CCL2, CCL5 (in Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten von Mäusen) sowie CCL2, CCL3, CCL4 und CXCL8 (in menschlichen Monozyten) werden als wichtiger Faktor in der Rekrutierung monozytärer Effektorzellen sowohl aus dem umliegenden Hirngewebe als auch aus der Peripherie angesehen (Cartier et al., 2005).

1.3.2 Das Chemokin CCL17 und der Chemokin-Rezeptor CCR4

Das Chemokin CCL17 wird auch TARC (Thymus and Activation-Regulated Chemokine) genannt. In Mäusen ist es in verschiedenen lymphatischen und nicht-lymphatischen peripheren Geweben zu finden, exprimiert in Langerhans-Zellen und Dendritischen Zellen, nicht jedoch in der Milz (Alferink et al., 2003).

CCL17 sorgt für die Chemotaxis aktivierter T-Zellen und wird nach Stimulation mit Toll-like-Rezeptor-Liganden, z.B. LPS hochreguliert. Der Rezeptor CCR4, der auf T-Zellen, jedoch u.a. auch auf Dendritischen Zellen, Monozyten und Mikrogliazellen gefunden wurde, bindet die Chemokine CCL17 und CCL22. Zirkulierende Monozyten, die als Reaktion auf proinflammatorische Signale in geschädigte Areale eingewandert sind, können so nach der Phagozytose zu drainierenden Lymphknoten rekrutiert werden (Gordon und Martinez, 2010).

Im Laufe dieser Migration nehmen die monozytären Zellen DZ-typische Merkmale wie die Expression von CD11c an. Es wurde gezeigt, dass die Migration von dermalen dendritischen Zellen aus Arealen lokaler Inflammation zu den drainierenden Lymphknoten in hohem Maße von der CCL17-Freisetzung dieser Zellen abhängig ist

(Stutte et al., 2010). Im Rahmen der Untersuchung verschiedener Makrophagen-Aktivierungsstadien wurden Alternativ-aktivierte-Makrophagen (AAM) als weitere Quelle für CCL17 identifiziert (Katakura et al., 2004). Hier konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von CCL17 regulierend auf klassisch aktivierte, inflammatorische Makrophagen (CAM) und T-Zellen wirkt und deren Generierung hemmt. CCL17 ist wesentlich involviert in die Th2-Rekrutierung in einem Mausmodell für Asthma bronchiale (Vijayanand et al., 2010), die Regulation von Mastzellen und dendritischen Zellen bei Hautkrankheiten (Specht et al., 2011; Stutte et al., 2010) und die Kontrolle der TReg (Regulatorische T-Zellen) Zell-Homöostase bei Atherosklerose (Weber et al., 2011).

Auch in Modellen neurodegenerativer Krankheiten wurden Einflüsse von CCL17 beobachtet. In einem MS (Multiple Sklerose)-Modell, der EAE (experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis), wurde CCL17 für die Regulation der IL-23-Produktion CCR4-exprimierender DZ verantwortlich gemacht (Poppensieker et al., 2012). In einem Mausmodell für HIV-induzierte Neurodegeneration zeigte sich im frontalen Cortex heraufregulierte CCL17-mRNA nach chronischer Stimulation von APP-Mäusen mit HIV-Tat-Protein (Pulliam et al., 2007). *In vivo* kann das Expressionsprofil von CCL17 mit CCL17xEGFP-Reportermausen untersucht werden. Diese Mäuse tragen anstatt des CCL17-Gens ein EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)-Codon unter dem CCL17 Promotor.

Um die Rolle von CCL17 in der neuroinflammatorischen Immunantwort bei der Alzheimer Demenz zu untersuchen, wurden CCL17^{E/E}-Mäuse mit doppelt-transgenen AD Mäusen verpaart (APP/PS1xCCL17^{E/E}). Erstmals konnte in vorhergehenden verhaltensbiologischen Experimenten mit APP/PS1 und APP/PS1xCCL17^{E/E} Mäusen ein Effekt von CCL17 auf kognitive Defizite bei der Alzheimer-Erkrankung beobachtet werden. 12-monate alte Mäuse beider Mausgruppen wurden mit Hilfe des Morris-Wasser-Labyrinths (morris water maze, MWM) auf ihre Lern- und Merkfähigkeiten getestet. Dieser Test besteht aus einem Aneignungstest (aquisition trial), in dem die Mäuse schwimmend lernen können, in welchem Quadranten des mit Wasser gefüllten Behälters sich die nicht sichtbare Plattform befindet, und der Prüfung (probe trial), in dem die Mäuse auf das Gelernte zurückgreifen sollen. Dabei wird die Zeit gemessen, die bis zum Auffinden der Plattform vergeht. Die APP/PS1-Mäuse zeigten

erwartungsgemäß kognitive Defizite. CCL17-defiziente APP/PS1 Mäuse wiesen jedoch signifikant bessere Lern- und Merkfähigkeiten auf (Neitzert, 2012), was einen potentiell neuroprotektiven Effekt der CCL17-Defizienz vermuten ließ und zu weiteren Untersuchungen, unter anderen den hier beschriebenen, führte.

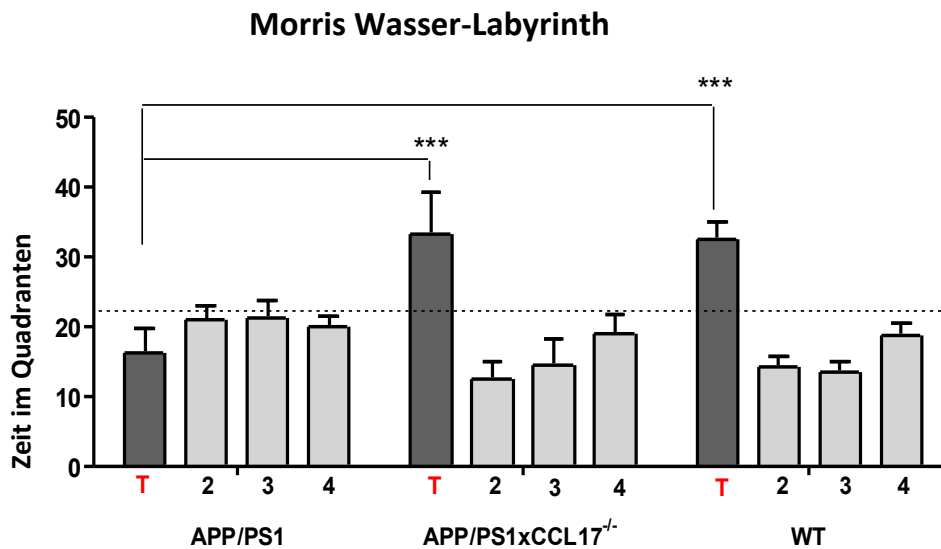


Abb. 7: Ergebnisse des verhaltensbiologischen Tests APP/PS1-, APP/PS1xCCL17^{E/E} und WT (Wildtyp)-Mäuse wurde im Morris Wasserlabyrinth (Morris water maze) auf ihre Lern- und Merkfähigkeiten getestet. Die Testung (probe trial, T) ergab signifikante Unterschiede zwischen den beiden transgenen Mausgruppen. Die kognitiven Fähigkeiten der APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäuse ähnelten eher denen der WT-Mäuse, während die APP/PS1-Mäuse große kognitive Defizite auswiesen (Neitzert, 2012).

1.3.3 Das CC-Chemokin CCL2 und der CC-Chemokin-Rezeptor CCR2

Das CC-Chemokin CCL2, auch MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) genannt, spielt eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Monozyten und der Aufrechterhaltung der Immunreaktion. Unter insgesamt 5 MCPs ist CCL2 das zuerst entdeckte und im Menschen am besten charakterisierte (Bose und Cho, 2013). Induziert durch inflammatorische Signale, sezernieren insbesondere Mikroglia und Makrophagen hohe Mengen an CCL2, sodass ein Gradient aufgebaut wird, der für die Einwanderung von Monozyten in geschädigte Areale sorgt (Sawyer et al., 2014).

Die direkten Effekte von CCL2 beinhalten neben der Induktion der zellulären Migration ins ZNS Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke und eine Aufrechterhaltung der Immunreaktion über Produktionsinduktion pro-inflammatorischer Zytokine (Semple et al.,

2010). Diese Effekte wurden in mehreren Studien als schädigend identifiziert. In einem Modell der Fremdkörperreaktion wurde das Inflammationsprofil von WT-Mäusen mit dem von CCL2-knockout-Mäusen verglichen. In Abwesenheit von CCL2 wurde eine verminderte Präsenz inflammatorischer Zellen wie Monozyten, eine erhaltene Funktion der Blut-Hirn-Schranke und eine reduzierte Astrogliose, einhergehend mit einer höheren Dichte erhaltener Neuronen, beobachtet. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in Mausmodellen der AD (Bose und Cho, 2013; Conductier et al., 2010) und anderer neurodegenerativer Erkrankungen (Bose und Cho, 2013), sodass CCL2 als Marker und Mediator der chronischen Inflammation und damit lokaler zytotoxischer Effekte identifiziert wurde.

In vitro konnte eine erhöhte CCL2-Produktion in Mikroglia- und Astrozyten-Kulturen nach Stimulation mit Amyloid- β beobachtet werden und die Zugabe von Antikörper gegen CCL2 bewirkte eine signifikante Hemmung der Mikroglia- und Monozyten-Migration (El Khoury et al., 2003). Da CCR2 der einzig bisher bekannte Rezeptor für CCL2 ist, wurde eine wichtige Rolle in der Leukozyten-Transmigration in AD vermutet. CCL2 leitet seine biologischen Signale wie auch die Chemokine CCL7, CCL8, CCL12 und CCL13 über Bindung an den Rezeptor CCR2 weiter, wobei CCL2 der hochpotenteste Aktivator der Signalkaskade zur monozytären Transmigration ist (Bose und Cho, 2013). CCR2 wird sowohl von hämatopoetischen als auch von Stroma-Zellen wie Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen exprimiert und seine mRNA kann in verschiedenen Leukozyten, besonders in Mikroglia und Monozyten, detektiert werden (Horuk, 2001).

CCR2-defiziente Mäuse zeigen eine verminderte Rekrutierung von Monozyten in verschiedenen Krankheitsmodellen wie EAE (Experimentelle Autoimmune Enzephalitis), Peritonitis, Tuberkulose und Arteriosklerose (Prinz und Priller, 2010; Tsou et al., 2007). Schon unter physiologischen Bedingungen wird eine limitierte Anzahl mononukleärer Phagozyten kontinuierlich ins ZNS rekrutiert, um dort zu parenchymalen Mikroglia zu differenzieren (Lawson et al., 1992).

Im Rahmen verschiedener Studien wurde dieser Prozess in Mausmodellen der Alzheimer Demenz in wesentlich höherem Maße beobachtet. EGFP-markierte Knochenmarkmonozyten konnten hier im ZNS gefunden werden und trugen effektiv zur Elimination der Amyloid-Ablagerungen bei (Malm et al., 2005; Simard et al., 2006; Stalder et al., 2005). Die äußerst wichtige und protektive Rolle von CCR2 in diesem

Prozess konnte bestätigt werden, indem in AD-Mausmodellen mit CCR2-defizientem Hintergrund eine wesentlich höhere Amyloid-Last aufgrund reduzierter Akkumulation von Mikroglia nachgewiesen wurde (El Khoury et al., 2007).

In diesem Rahmen zeigte sich auch eine erhöhte Empfänglichkeit CCR2-defizienter Mäuse gegenüber der Alzheimer Pathophysiologie, wahrscheinlich aufgrund beeinträchtigter Amyloid-Elimination durch ZNS-residente Phagozyten.

Weiterhin wurde die Population Ly6C-CCR2-exprimierender zirkulierender Monozyten als direkte Vorläufer adulter Mikroglia identifiziert, die unter chronisch inflammatorischen Bedingungen wie bei der AD ins ZNS einwandert, und den Bestand an mononukleären Plaque-assoziierten Phagozyten steigert (Mildner et al., 2007).

Mit Hilfe eines neuen AD Mausmodells, das die Thymidinkinase unter der Kontrolle des CD11b Promotors exprimiert, was zur Deletion CD11b+ Zellen beiträgt, konnte gezeigt werden, dass die eingewanderten und neu differenzierten Mikroglia im Vergleich zu residenten Mikroglia höhere Kapazitäten zur Amyloid-Phagozytose besitzen (Simard et al., 2006).

Die Literatur verdeutlicht die zweiseitige Rolle der CCL2-CCR2 Achse in Bezug auf neurodegenerative Erkrankungen. Scheinbar wird die Schädigung des lokalen Milieus, die mit Freisetzung zytotoxischer pro-inflammatorischer Substanzen und Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke einhergeht, durch die signifikant erhöhte Amyloid-Elimination durch eingewanderte Phagozyten kompensiert.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Charaktisierung der Inflammation in APP/PS1x $CCL17^{E/E}$ -Mäusen zeigte sich im Vergleich zu APP/PS1-Mäusen ein erhöhter Anteil von CCR2-mRNA sowie eine erhöhte absolute Anzahl CCR2+ Zellen im ZNS (Neitzert, 2012). Dies führte zu der Annahme, die beschriebenen positiven Ergebnisse des verhaltensbiologischen Tests seien ein Effekt des insgesamt neuroprotektiven Milieus, beruhend auf dem Einfluss vermehrter Präsenz CCR2-exprimierender Zellen in Abwesenheit von CCL17.

2. Zielsetzung der Arbeit

Zu den bisherigen Fortschritten der Forschung auf diesem Gebiet gehört die Anerkennung der Neuroinflammation als wesentliches Teilgebiet der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung. CCL17 als in Mäusen und Menschen vorhandenes, homöostatisches und induzierbares CC-Chemokin ist in verschiedenen Krankheitsmodellen als wichtiger Faktor beschrieben worden. Durch Kreuzung von CCL17^{E/E}- mit dem doppelt transgenen AD-Mausmodell APP/PS1 wurde eine CCL17-defiziente APP/PS1-Mauslinie generiert, die phänotypisch erstaunliche Auffälligkeiten aufweist. Diese Arbeit soll die CCL17-abhängigen neuropathologischen und –inflammatorischen Veränderungen in diesem Alzheimer Mausmodell charakterisieren und den Mechanismus untersuchen, der zu den phänotypischen Ergebnissen in Abwesenheit von CCL17 führt. Im ersten Teil dieser Arbeit sollten Neuronen vergleichend quantifiziert werden, im zweiten Teil wurden die Inflammation sowie beteiligte Zellen im Gehirn der Tiere per Immunfluoreszenz vergleichend charakterisiert. Das Expressionsprofil des Rezeptors CCR2 auf Monozyten und seine Modulation durch LPS und CCL17 wurde im dritten Teil auf einen potentiellen Effekt des CCL17-knockouts auf zellulärer Ebene untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Allgemeine Laborgeräte

In alphabetischer Reihenfolge

Tab. 2: Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Fabrikat
Analysenwaage	Sartorius BP 2100
Binokular	Stemi 2000, Zeiss
Durchflusszytometer	FACS-Canto II, BD Bioscience
Fluoreszenz-Spektrometer	LS50, Perkin Elmer
Inkubator	CB210, Binder
Konfokales Lasermikroskop	Olympus IX 81
Kryostat	CM3050 S, Leica
Lichtmikroskop	TS 100, Nikon Eclipse, Zeiss Axiovert 40 CFL, AxioCam
Magnetrührer	MR3001, Heidolph
Microplate Reader	MRX TC II, Dynex Technologies
Multifuge	3 SR, Heraeus, Thermo Scientific
Multikanalpipette	Eppendorf
NanoDrop	NanoDrop ND-1000 Spectralphotometer, Thermo Scientific
PCR Cycler	7900 HAT Fast Real-Time PCR System, Applied!
Pipette Filler	Matrix Cell Mate II, Thermo Scientific
Schüttler	KL-2, Edmund Bühler
Sterilbank	HERAsafe, Thermo Scientific
Thermo Mixer	Eppendorf
Thermo Cycler	ICycler, Bio-Rad
Ultraschallgerät	Bandelin Sonoplus
Vortex Mixer	Vortex-Genie 2, Scientific industries
Wasserbad	F12, Julabo, Seelbach
Zählkammer	Neubauer
Zentrifuge	Fresco17 Zentrifuge, Heraeus, Thermo Scientific

3.1.2 Verbrauchsmaterial

In alphabetischer Reihenfolge

Tab. 3: Verbrauchsmaterial

Material	Fabrikat
5 ml Polystyrene Rundboden-Röhrchen	BD Biosciences, Pharmingen
15, 50 ml konische Röhrchen, Polypropylen	BD Bioscience, Pharmingen
2, 5, 10, 25, 50 ml serologische Pipette	BD Bioscience, Pharmingen
Deckgläschen rund (13 mm)	Engelbrecht
Eppendorf Safe-lock Röhrchen (0,5/1,5/2ml)	Eppendorf
Mikrotiterplatte, 96-Loch, U-Form	Greiner, Bio-One
Mikrotiterplatte, 384-Loch	Applied Biosystems
Objekträger	SuperFrost-Plus, Menzel-Gläser
Petrischalen 6 cm, 10 cm 94/16	Greiner, Bio-One
Siebgewebe aus Polyamid, MW 40 µm	VWR International
Slide-A-Lyzer mini Dialyse Kassette 3,5 kD	Pierce
Zellkulturplatte, 24-Loch-Platte	BD Bioscience, Pharmingen
Zellkulturflaschen, 75 cm ² , 250 ml	Greiner, Bio-One

3.1.3 Antikörper und Primer

In alphabetischer Reihenfolge

Tab. 4: Primärantikörper

Spezifität	Fluorochrom	Spezies	Wirt	Verdünnung	Firma
CCR2	-	Maus	Ratte	1:20	Mit freundlicher Genehmigung von M. Mack
CCR2	-	Maus	Ziege	1:20	AbD serotec
CD11b	APC	Maus	Ratte	1:100	eBioscience
CD11b	bio	Maus	Ratte	1:100	BD Pharmingen
CD11b	PE	Maus	Ratte	1:100	BD Pharmingen
GFAP	bio	Maus	Kaninchen	1:100	Santa Cruz Biot.
Ly6C	bio	Maus	Ratte	1:100	BD Pharmingen
NeuN	bio	Maus	Kaninchen	1:100	Millipore

Tab. 5: Sekundärantikörper

Spezifität	Fluorochrom	Spezies	Wirt	Verdünnung	Firma
Anti-Kaninchen	bio	Kaninchen	Ziege	1:200	Invitrogen
Anti-Kaninchen	Cy3	Kaninchen	Ziege	1:300	Invitrogen
Streptavidin	APC	-	-	1:200	Biozol
Streptavidin	Cy3	-	-	1:200	Invitrogen
Streptavidin	PerCP-Cy5.5	-	-	1:200	BD Pharmingen

Tab. 6: Primer

Spezifität	Aminosäuresequenz	Firma
bgHpA3	GGG GCA AAC AGA TGG C	TIB Molbiol
TARC 2M	ACT CTC AGG ACA CCT GCT TCC	TIB Molbiol
TARC P4	GAG ACC CTT GAG CCT GAG AG	TIB Molbiol

3.1.4 Lösungen, Chemikalien, Kits

In alphabetischer Reihenfolge

Tab. 7: Lösungen, Chemikalien, Kits

Agarose	Invitrogen
β -Mercaptoethanol	GIBCO®
B27 Supplement	GIBCO®
Cytofix / Cytoperm®	BD Bioscience
DMEM (4500 mg/l Glukose)	GIBCO®
Dnase	Roche
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol, absolut (C ₂ H ₅ OH, M = 46,07 g/mol)	Merck
Ethidiumbromid	Promega
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA
Fluoromount G	Southern BioTech
2x GoTaq® Green Master Mix	Promega
HBSS	GIBCO®
Isopentan (Methylbutan)	VWR
LPS (von E.coli 0127:B8)	Sigma Aldrich
MEM (100% nicht essentielle Aminosäuren)	GIBCO®
Methanol (CH ₃ OH, M = 32,04 g / mol)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Papain	Sigma-Aldrich
PBS (Phosphat buffered saline)	GIBCO®
Penicillin / Streptomycin	GIBCO®
Proteinase K	Roche
Roti®-Phenol / Chlorophorm / Isoamylalkohol	Roth
SDS (sodium dedecyl sulfat crystals)	Fluka
Trypsin / EDTA	GIBCO®
TSA Enhancer System	Perkin Elmer
Vectashield® Mounting Medium (DAPI)	Vector Laboratories, Linaris

3.1.5 Puffer und Medien

In alphabetischer Reihenfolge

Tab. 8: Puffer und Medien

FACS-Puffer	PBS (pH 7,2) 2 % FCS (inaktiviert)
Makrophagen Kulturmedium	DMEM 4,5 g/l Glukose 10 % FCS (inaktiviert) 1 % Penicillin / Streptomycin 0,001 % β -Mercaptoethanol
10 % SDS (1 l)	100 g Sodium Dodecyl Sulfat Kristalle in 1 l H ₂ O lösen pH auf 7,2 einstellen
TAE-Puffer	40 mM Tris Acetat 1 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA in H ₂ O lösen pH auf 7,6 einstellen
TNE-Puffer	10 ml 1 M Tris pH 8,0 20 ml 5 M NaCl 2 ml 0,5 M EDTA Mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
Trypsin-Stopp-Lösung	0,3 mM MgSO ₄ 62,4 mg Dnase I 187,5 mg Glycine Max (Soybean) mit H ₂ O auf 50 ml auffüllen
Verdauulösung	pro Schwanzspitze 450 μ l TNE-Puffer 50 μ l 10 % SDS 3 μ l Proteinase K

3.2 Methoden

3.2.1 Zucht- und Haltungsbedingungen der Mäuse

Für die APP/PS1-CCL17^{E/E}-Mäuse wurden APP^{swe}(K594N/M595L)/PS1dE9-Mäuse mit C57BL/6J-Hintergrund (Charles River Laboratories) mit CCL17-defizienten Mäusen gekreuzt (Alferink et al. 2003). Die CCL17^{E/E}-Mäuse besitzen ein EGFP knock-in in Form einer Kasette im kodierenden CCL17-Gen. Zur Generierung wurde per homologer Rekombination EGFP-komplementäre DNA (cDNA) in den murinen CCL17-Locus inseriert. Heterozygote Mäuse (CCL17^{E/+}) tragen unter dem CCL17 Promotor sowohl CCL17 als auch EGFP. Durch Kreuzung heterozygoter Mäuse werden homozygote Träger des veränderten Gens generiert (CCL17^{E/E}). Diese exprimieren anstelle von CCL17 nur EGFP. Die Mäuse wurden in Gruppen in einem spezifischen pathogenfreien Bereich (SPF) unter temperatur-kontrollierten Bedingungen und einem 12 Std./12 Std. Licht-Dunkel-Zyklus gehalten. Futter und Wasser waren durchgehend frei zugänglich.

3.2.2 Präparation von genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsien

Da die APP/PS1-Mäuse heterozygot gezüchtet wurden, war eine Genotypisierung zur Unterscheidung der WT von den transgenen Tieren per PCR (Polymerase chain reaction = Polymerase-Ketten-Reaktion) notwendig. Dazu wurde genomische DNA aus den Schwanzspitzen 3-4 Wochen alter Mäuse extrahiert. Die Gewebeproben wurden über Nacht bei 56 °C in 500 µl Lysis-Puffer lysiert. Nach dem Verdau wurde 500 µl Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 zu den einzelnen Proben gegeben und anschließend für 5 Minuten bei 13000 Umdrehungen pro Min zentrifugiert. Das DNA-Pellet lag anschließend in der wässrigen Phase obenauf und konnte mitsamt des Überstandes in ein neues Eppendorf Röhrchen transferiert werden. Mithilfe 900 µl Ethanol bildete sich ein DNA-Präzipitat, welches sich bei der nächsten 5-minütigen Zentrifugation am Boden absetzte. Der Überstand konnte daraufhin verworfen werden und das DNA-Präzipitat wurde mit 500 µl 70-%igem Ethanol gewaschen und für 20-40 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. In 200 µl TE-Puffer resuspendiert konnte anschließend die Konzentration der DNA mit Hilfe des NanoDrop Spektralphotometers gemessen werden. Nach Resuspension der DNA in 200 µl TE-Puffer wurde die Konzentration mit Hilfe des NanoDrop spektrometrisch bestimmt. Die DNA wurde bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion können ausgewählte DNA-Fragmente amplifiziert werden, sodass die Menge an DNA exponentiell ansteigt.

Die Amplifikation im Thermocycler erfolgte in 20-40 Zyklen:

Tab. 9: Schritte der PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Schritt	Erforderliche Temperatur	Ziel
Denaturierung	95 °C	2 komplementäre Einzelstränge
Hybridisierung	55 °C	Anlagerung von Oligonukleotidprimern, Bildung von Basenpaaren
Elongation	72 °C	Taq-Polymerase verlängert Primer mit Nukleotid-Bausteinen, neue doppelsträngige DNA entsteht

Die Proben werden zur Erkennung enthaltener PS1-Fragmente auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgebracht, für 50 Minuten bei 120 Volt durch Molekülwanderung zwischen Anode und Kathode aufgetrennt und anschließend für 20 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung inkubiert. Die durch Interkalation des fluorszierenden Ethidiumbromids entstehenden Banden werden unter UV-Licht mit dem ChemiDoc™ erkannt.

3.2.4 Immunfluoreszenz

3.2.4.1 Herstellung von Gewebeschnitten

Die Hemisphären entnommener Gehirne wurden direkt nach der Entnahme über Nacht zur Fixierung in 4 % PFA eingelegt und anschließend in TissueTek eingebettet. Daraufhin wurden sie bis zur Herstellung der Kryo-Schnitte bei -80 °C aufbewahrt. Für die beschriebenen Experimente wurden die Hemisphären sagittal in 12 µm dünne Scheiben geschnitten und jeder zweite Schnitt auf ein Mikroskopierglas übertragen (3 Schnitte / Glas). Bis zur Färbung wurden die Schnitte bei -20 °C gelagert.

3.2.4.2 Thioflavin-Färbung

Thioflavin ist ein Benzothiazol-Salz, das in Wechselwirkung mit Amyloid-Fibrillen durch Verschiebung der Fluoreszenzspektren zur Fluoreszenz angeregt wird und wird sowohl *ex vivo* als auch *in vitro* zur Diagnose dieser Amyloid-Fibrillen benutzt (Khurana et al.,

2005). Um die bei der Alzheimer-Erkrankung vorliegenden Plaques, bestehend aus Amyloid- β , in den Gehirnschnitten der Mäuse sichtbar zu machen, wurden sagittale Schnitte aus Gehirnen der 3 Mausgruppen (APP/PS1xC57BL/6J, APP/PS1xCCL17^{E/E} und WT) bei 4 °C für 5 Minuten aufgetaut und danach für weitere 5 Minuten in PBS gewaschen. Eine Lösung (280 ml) aus 0,025 % Thioflavin S in 1:2 EtOH/PBS wurde hergestellt und die Schnitte darin für 1 Minute inkubiert. Daraufhin erfolgte ein zweiter Waschgang in PBS für 5 Minuten und die Einbettung der gefärbten Schnitte in Fluoromount G sowie Fixierung von Deckplättchen mit Nagellack.

3.2.4.3 Immunfluoreszenz-Färbung

Zur quantitativen Analyse wurden die Oberflächenantigene CD11b, GFAP, NeuN und der Chemokinrezeptor CCR2 mittels Immunfluoreszenz und mithilfe fluoreszenzmarkierter monoklonaler muriner Antikörper in sagittalen ZNS-Gewebeschnitten von Mäusen angefärbt. Für die CCR2-Immunofluoreszenz wurde ein Antikörper von M. Mack verwendet. Nachdem die Schnitte zum Auftauen für 5 Minuten bei 4 °C gelagert wurden, wurden sie in einer Küvette mit 250 ml PBS für 5 Minuten gewaschen. Zur bestmöglichen Verstärkung des Signals wurde zur Färbung ein TSA (Tyramide Signal Amplification) System verwendet und der Vorgang nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Um eine Inkubation der Schnitte in den jeweiligen Antikörperlösungen zu ermöglichen, wurden die einzelnen Schnitte auf dem Objektträger vor dem ersten Inkubationsschritt mit einem Fettstift umrandet. Die endogenen Peroxidasen wurden durch eine 30-minütige Inkubation auf dem Magnetrührer in 1 % H₂O₂-Lösung (in PBS, mit 0,1 % NaN₃) neutralisiert. Um Austrocknung oder Signalabschwächung der Fluorochrome zu verhindern, wurden die folgenden Inkubationen bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten, feuchten Kammer durchgeführt:

1. Block der Fc-Rezeptor-Bindungsstellen (Fc-Block, CD16/32 = Blocking solution), 1,5-stündige Inkubation
2. Avidin-Block, 20-minütige Inkubation
3. Biotin-Block, 20-minütige Inkubation
4. Färbung des gewünschten Oberflächen-Antigens mit einem biotinylierten AK, Verdünnung nach Angabe des Herstellers in TNB + 0,1 % Triton X-100 (zur Negativkontrolle nur TNB + Triton X-100), Inkubation über Nacht bei 4 °C

5. Markierung des primären AK mit Streptavidin-HRP, Verdünnung nach Angabe des Herstellers in TNB, 30-minütige Inkubation
6. Verstärkung des Signals mit fluorophore-tyramide, 1:100 verdünnt in Amplifikations-Puffer (amplification buffer), 8-minütige Inkubation

Die Lösungen wurden dazu jeweils in 65µl-Portionen auf die einzelnen Schnitte pipettiert. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten erfolgte jeweils ein 5-minütiger Waschschrift in der PBS-gefüllten Küvette auf dem Magnetrührer. Der letzte Waschgang wurde 3x hintereinander wiederholt, danach die Schnitte mit Fluoromount + DAPI beträufelt und mit einem Deckglässchen bedeckt. Zur Fixierung des Deckgläschens auf dem Objektträger wurde Nagellack verwendet.

3.2.4.4 Quantitative mikroskopische Fluoreszenz-Analyse

Mikroskopisch wurden Aufnahmen in 20- und 40-facher Vergrößerung von Cortex (frontal, parietal und occipital) und Hippocampus genommen und mit Hilfe des Programms ImageJ 1.42 analysiert. Mit Hilfe dieses Programms konnten verschiedene Fragestellungen bearbeitet werden. Das angefärbte Areal auf dem gesamten Bild konnte wahlweise durch eine Messung der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI = Mean Fluorescence Intensity) oder direkt des gefärbten Anteils bezogen auf das gesamte Areal (area fraction) bestimmt werden. Sollte nur ein bestimmter Bereich betrachtet werden, wurde dieser Bereich (ROI = Region Of Interest) vor der Messung festgelegt und auf alle Bilder übertragen. Mittels des Manders Überlappungs-Koeffizienten (MOC = Mander's Overlap Coefficient), der den Grad einer Colokalisation zweier Kanäle angibt, konnte die Überlappung 2 verschiedener Färbungen gemessen werden. Dafür registriert der MOC den Anteil der Pixel, der positive Werte für die beiden ausgewählten Kanäle aufweist (Dunn et al., 2011).



Abb. 8: Manders Koeffizient

Hier wird das Konzept des Manders Überlappungs-Koeffizienten (MOC) verdeutlicht. Gemessen wird der Anteil der Pixel (gelber Anteil), der positive Werte für 2 ausgewählte Kanäle (grün und rot) aufweist. Der MOC beträgt hier 0,5 (SVI).

3.2.5 Etablierung von Kulturen aus Knochenmark-Monozyten

3.2.5.1 Isolation von Monozyten aus dem Knochenmark

Zur Herstellung einer Makrophagen-Kultur wurden Knochenmarkszellen aus Femora und Tibiae der Mäuse isoliert. Nach Freilegung der Knochen wurden diese bis zur weiteren Verarbeitung in sterilem PBS auf Eis aufbewahrt. Unter der Sterilbank wurden die Knochenenden abgeschnitten und die folgenden Schritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Mittels einer Kanüle wurde das Knochenmark mit 10 ml PBS in eine neue Petrischale ausgespült, dort resuspendiert und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen lichtmikroskopisch gezählt. $1,5 \times 10^5$ / ml Zellen wurden nach dem Abzentrifugieren in RPMI Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 50 μ l Mercaptoethanol und 15 % MCSF kultiviert.

3.2.5.2 Generierung von Knochenmarksmakrophagen

Die isolierten Knochenmarkszellen wurden wie oben beschrieben in einem Medium resuspendiert und auf Petrischalen verteilt. Die Inkubation der Kulturen erfolgte 7 Tage lang bei 37 °C mit 5 % CO₂. Am Tag 3 erfolgte ein Mediumwechsel unter sterilen Bedingungen. Zum Ernten der Zellen wurden die Zellen zweier Platten erst mit dem Cellscrapper vorsichtig mechanisch vom Boden der Petrischale gelöst und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Anschließendes Spülen der Platten mit 10 ml sterilem kaltem PBS sorgte für einen möglichst minimalen Zellverlust. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 1500 Umdrehungen/Minute konnten die Zellen in 1000 μ l FACS-Puffer gelöst der durchflusszytometrischen Färbung zugeführt werden.

3.2.5.3 Stimulation von Makrophagen mit LPS, CCL17 und CCL22

Um die Reaktion der kultivierten Zellen auf einen inflammatorischen Reiz zu untersuchen, wurden sie 6 Stunden vor der Ernte mit LPS (von E.coli) stimuliert. Dazu wurde aus einer Stocklösung (mit 1 mg LPS/ml in PBS) 1 μ l auf eine 10 ml-Zellkulturplatte pipettiert, sodass eine Endkonzentration von 100 ng/ml entstand.

Die Stimulation mit den Chemokinen CCL17+CCL22 diente zur Erfassung eines möglichen autokrinen Mechanismus und wurde nach anhand des oben beschriebenen Protokolls mit einer Verdünnung von 1 μ l CCL17 + 1 μ l CCL22 pro 10 ml-Zellkulturplatte durchgeführt. Die Auswirkungen der Stimulation auf die CCR2-Expression wurden zu

zwei verschiedenen Zeitpunkten (3 Std./15 Std. nach Stimulation) mittels Durchflusszytometrie untersucht.

3.2.6 Durchflusszytometrie

3.2.6.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Durch die Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse (Fluorescence-Activated Cell Sorting) können Zellen nach Größe, Granularität und Oberflächenantigenen dargestellt und quantifiziert werden. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einzeln an einer Laserquelle mit monochromatischem Licht einer bestimmten Wellenlänge vorbeigeführt. Durch Auftreffen auf eine Zelle wird der Strahl gebrochen und von Photodetektoren registriert. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC), das in Verlaufsrichtung des Laserstrahls liegt, gibt die Zellgröße wieder. In einem rechten Winkel (90°) abgelenkte Strahlen werden als Seitwärtsstreulicht (Sideward Scatter, SSC) registriert und geben Auskunft über die Granularität der Zelle. Wenn bestimmte Zellantigene untersucht werden sollen, können diese vorher mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert werden. Der Laserstrahl wird von den markierten Zellen teilweise absorbiert und regt die Fluorochrome zur Emission von Lichtquanten an. Diese werden gesammelt, von Filtern nach Wellenlängenbereichen aufgetrennt und von verschiedenen Photodetektoren registriert (Mehrfarbenanalyse). Die gemessene Fluoreszenz-Intensität ist proportional zur Anzahl der an die Zelle gebundenen Antikörper.

Für die beschriebenen Experimente wurden monoklonale Antikörper, die mit den Fluorophoren Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC) und dem Tandemkonjugat Peridinin Chlorophyll Protein/Cyanin 5.5 (PerCP/Cy5.5) konjugiert sind, verwendet.

3.2.6.2 Durchflusszytometrische Färbung

Isolierte Zellen aus den oben beschriebenen Experimenten wurden für die durchflusszytometrische Analyse mit den verschiedenen Fluorophoren-konjugierten Antikörpern angefärbt. Dabei binden die Fluorophore an bestimmte Oberflächenmarker, anhand derer die Zellen während der Analyse sortiert werden können. Für dieses Experiment wurden die Oberflächenmarker CD11b und Ly6C zur Charakterisierung der Makrophagen und CCR2 zur Untersuchung der Expression verwendet. Die gewonnenen

Zellen wurden zunächst in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und mit 1000 µl FACS-Puffer gewaschen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4500 Umdrehungen pro Minute wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 45 µl des Fc-Blocks resuspendiert. Diese Lösung besteht aus monoklonalen Antikörpern gegen CD16/32 1:300 in FACS-Puffer verdünnt und blockiert die Fc-Rezeptor-Bindungsstellen auf der Zelloberfläche. Es folgen 15 Minuten Inkubation auf Eis und im Dunkeln und daraufhin ein weiterer Wasch-Schritt (Zugeben von 1000 µl FACS-Puffer, Zentrifugation wie oben beschrieben und Absaugen des Überstandes). Die gewünschten Primär-Antikörper wurden nach Angabe des Herstellers in FACS-Puffer verdünnt und die Zellproben in je 45 µl resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 Minuten auf Eis und im Dunkeln wurden die Zellen wiederum gewaschen. Wurden nicht-fluoreszierende Primär-Antikörper verwendet, ist ein zweiter Färbeschritt mit einem Sekundär-Antikörper oder Streptavidin notwendig (Verdünnung je nach Angabe des Herstellers, 45 µl/Zellprobe). Nach einem letzten Wasch-Schritt folgte die Resuspendierung der Zellen in 200 µl FACS-Puffer. Durch ein Siebgewebe mit 40 µm Maschengröße wurde die Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen gefiltert und bis zur Analyse bei 4 °C unter Lichtschutz gelagert. Ausgewertet wurden die Daten der FACS-Analyse mit dem Programm FlowJo, Version 8.8.7

4. Ergebnisse

4.1 Quantifizierung des neuronalen Verlusts im Hippocampus

In verhaltensbiologischen Tests zeigten APP/PS1x $CCL17^{E/E}$ -Mäuse eine wesentlich bessere Lern- und Erinnerungsfähigkeit als APP/PS1-Mäuse. Um das physiologische Korrelat zu den Ergebnissen des Verhaltenstests im ZNS der Mäuse darzustellen, wurden Neuronen mittels Immunofluoreszenz-Färbung auf sagittalen Hirnschnitten angefärbt.

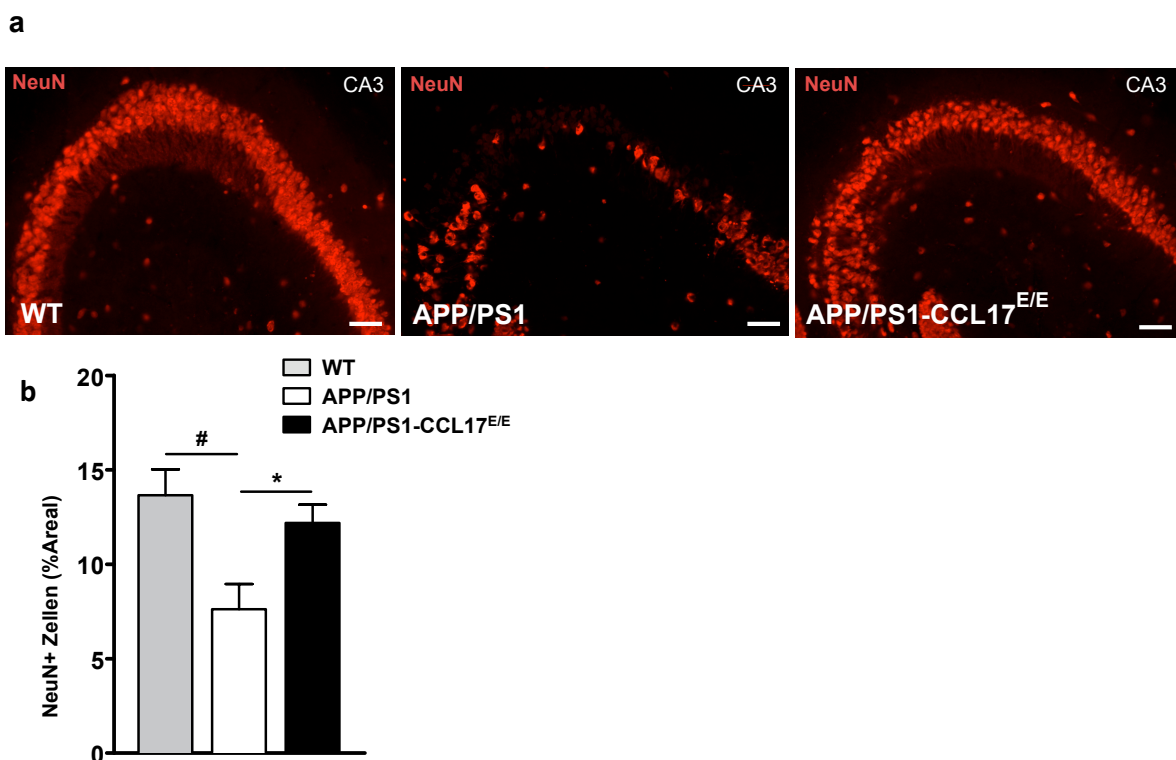


Abb. 9: Quantifizierung NeuN-positiver hippocampaler Neuronen

In sagittalen Gehirnschnitten von WT (links), APP/PS1 (Mitte) und APP/PS1x $CCL17^{E/E}$ (rechts) Mäusen wurden hippocampale Neuronen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen NeuN (neuronale Nuclei) markiert. Die repräsentativen Bilder (a) zeigen eine deutliche Rarefizierung der NeuN-positiven Zellen (rot) in APP/PS1-Mäusen (Mitte). Entspringende Axone (weißer Pfeil) sind in APP/PS1x $CCL17^{E/E}$ -Mäusen deutlich erkennbar. Das Balkendiagramm (b) zeigt vergleichend den prozentualen Anteil des angefärbten Areal auf den jeweiligen Gewebeschnitten. WT- und APP/PS1x $CCL17^{E/E}$ -Mäuse weisen ein ähnliches NeuN-Färbemuster auf, während in APP/PS1-Mäuse eine signifikant reduzierte Immunreaktivität auffällt. Statistik: Student's t-test, * $p < 0,05$ (APP/PS1x $CCL17^{E/E}$ vs. APP/PS1), # $p < 0,05$, $n = 4$ / Gruppe

Es wurde ein Antikörper gegen NeuN (neuronale Nuclei) gewählt. Der Antikörper bindet an neuronale nukleäre Antigene und markiert somit das neuronale Soma. Von der hippocampalen CA3-Region in Mäusen des Genotyps APP/PS1, APP/PS1xCCL17^{E/E} und WT wurden Mikroskopieaufnahmen in 20-facher Vergrößerung gemacht.

Die repräsentativen Bilder in Abb. 9a zeigen eine deutliche Rarefizierung der NeuN-positiven Zellen (rot) in APP/PS1-Mäusen (Mitte) gegenüber dem WT (links), nicht jedoch in APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäusen (rechts). Die Anzahl der erhaltenen Neuronen spricht für einen weitestgehenden Erhalt der CA3-Efferenz (Schaffer Kollateralen). Die Größe des im Balkendiagramm (Abb. 9b) dargestellten NeuN-positiven Areal korreliert mit der Anzahl der Neuronen und ist in APP/PS1-Mäusen verglichen mit WT- und auch APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäusen deutlich verringert. APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäuse (schwarzer Balken) und WT-Mäuse (grauer Balken) zeigen eine vergleichbare NeuN-Immunreaktivität, während die Höhe der NeuN⁺ Expression im Hippocampus der APP/PS1-Mäuse (weißer Balken) als Zeichen eines höheren neuronalen Zellverlusts signifikant vermindert ist.

4.2 Charakterisierung der inflammatorischen Reaktion

4.2.1 Astrozytose und Mikrogliose

Die Neuroinflammation ist charakterisiert durch die Aktivierung und Proliferation regionaler Zellen (Mikrogliose, Astrozytose) und geht mit typischen morphologischen Veränderungen einher, die vornehmlich Hippocampus und Cortex betreffen (Wyss-Coray und Rogers, 2012). In diesem Projekt sollten Alzheimer-typische Veränderungen beteiligter Zellen in Hippocampus und Cortex von APP/PS1 und CCL17-defizienten APP/PS1-Mäusen verglichen werden. Dazu wurden diese mittels Immunfluoreszenz in sagittalen Hirnschnitten 14-Monate alter APP/PS1 und APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäuse angefärbt. Es wurden Antikörper gegen GFAP und CD11b zur Darstellung der Astrozyten und Mikroglia verwendet.

a GFAP Immunfluoreszenz

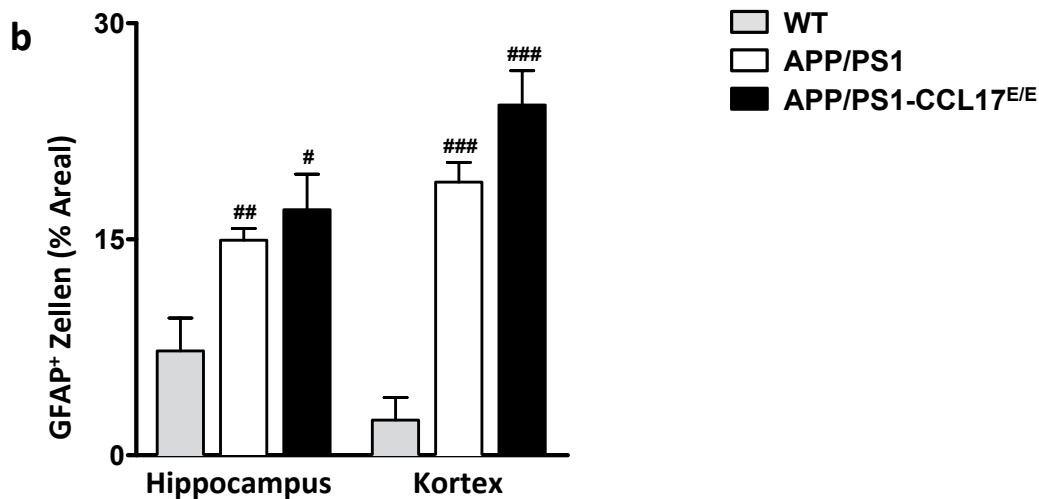
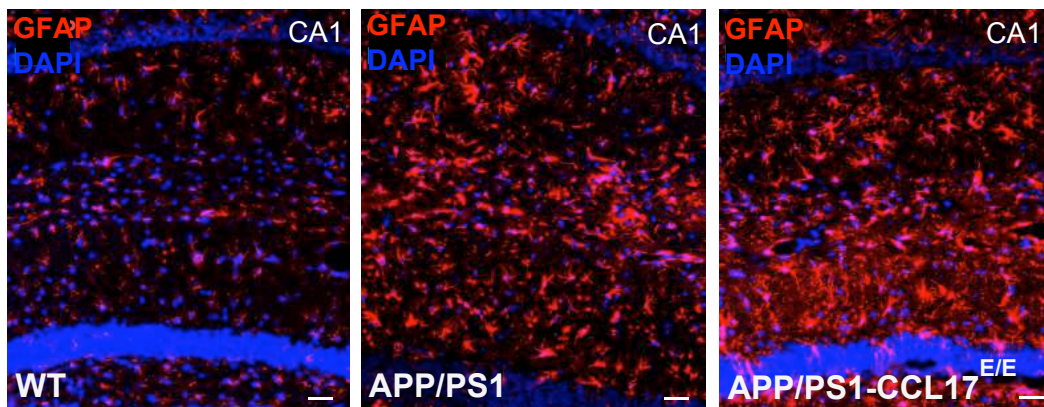


Abb. 10: Astrozytose in Hippocampus und Cortex

Zur Charakterisierung der inflammatorischen Reaktion in Abhängigkeit von CCL17 wurden sagittale Hirnschnitte von WT (links), APP/PS1 (Mitte) und APP/PS1x CCL17^{E/E} (rechts) -Mäusen mit Antikörpern gegen GFAP angefärbt. (a) zeigt repräsentative Bilder der hippocampalen CA1 Region. Die Ausprägung der GFAP-Färbung gibt den Grad der Astrozytose an. In beiden transgenen Mausgruppen (Mitte + rechts) zeigt sich, verglichen mit der WT-Maus (links), eine erhöhte GFAP Expression. Im Balkendiagramm (b) sind die angefärbten Areale in Hippocampus und Cortex vergleichend dargestellt. Ein Anstieg der GFAP-positiven Astrozyten zeigt sich in beiden transgenen Mausgruppen (schwarzer und weißer Balken), verglichen mit WT-Mäusen. Statistik Student's t-test, #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 (tg vs. WT), n = 5 / Gruppe.

a CD11b Immunfluoreszenz

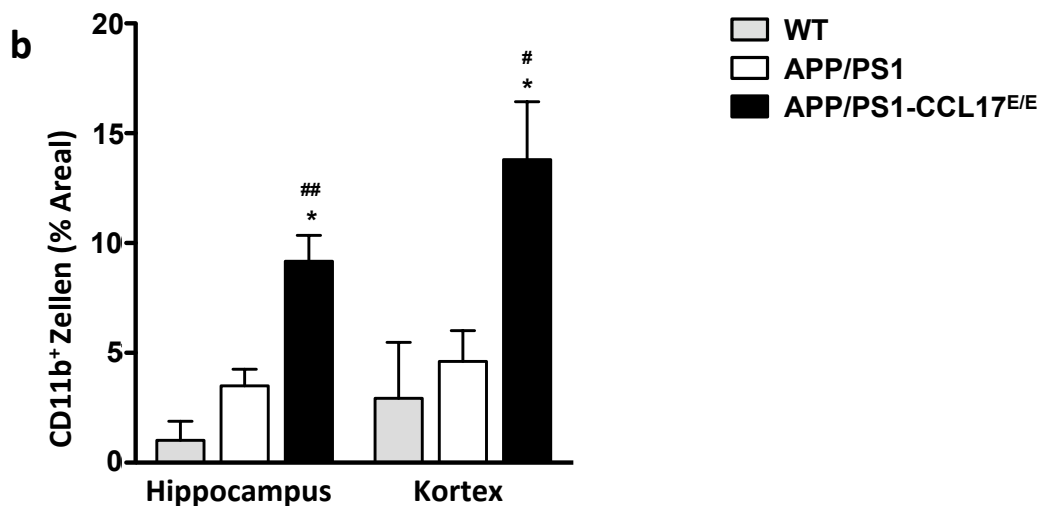
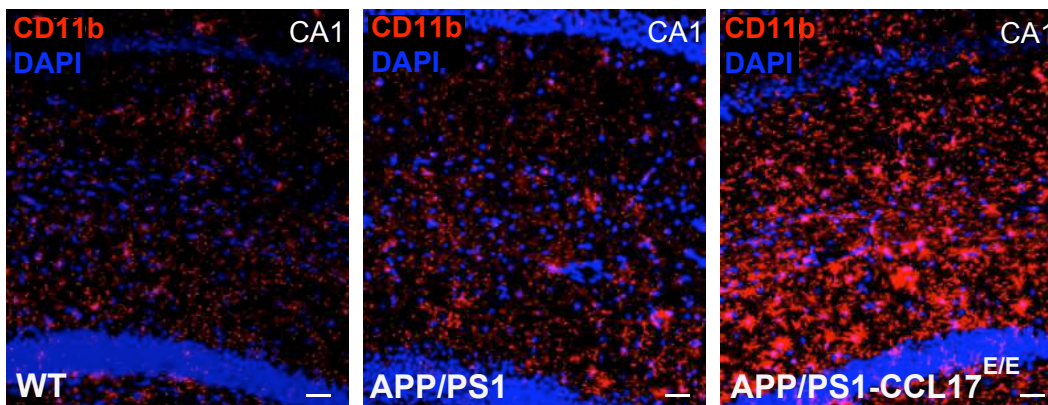


Abb. 11: Mikrogliose in Hippocampus und Cortex

Zur Charakterisierung der inflammatorischen Reaktion in Abhängigkeit von CCL17 wurden auf sagittalen Hirnschnitten von WT (links), APP/PS1 (Mitte) und APP/PS1x CCL17^{E/E} (rechts) -Mäusen Mikroglia mit Antikörpern gegen CD11b angefärbt.

(a) zeigt repräsentative Bilder der hippocampalen CA1 Region. Die höchste CD11b Expression findet sich in CCL17-defizienten APP/PS1-Mäusen (rechts), während WT- (links) und APP/PS1-Mäuse (Mitte) eine reduzierte CD11b-Immunreaktivität aufweisen. In den Balkendiagrammen sind die angefärbten Areale in Hippocampus und Cortex vergleichend dargestellt. Die Menge an CD11b-positiven Mikroglia ist in CCL17-defizienten APP/PS1-Mäusen (schwarzer Balken) verglichen mit APP/PS1 (weiß) und WT (grau) -Mäusen signifikant erhöht. Statistik: Student's t-test, * $p < 0,05$ (APP/PS1-CCL17^{E/E} vs. APP/PS1), # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, $n = 3$ / Gruppe.

Die in der Literatur schon vielfach beschriebene Astrozytose bei der Alzheimer-Erkrankung wird sowohl bei APP/PS1 als auch bei APP/PS1xCCL17E/E-Mäusen in Hippocampus und Cortex deutlich sichtbar. Die quantitative Analyse ergibt eine signifikant höhere GFAP Expression im Vergleich zu den WT-Mäusen. Zwischen APP/PS1xCCL17E/E und APP/PS1-Mäusen zeigt sich kein wesentlicher Unterschied in der Färbeintensität. Im Gegensatz dazu ergibt die CD11b-Immunfluoreszenz sowohl in Cortex als auch in Hippocampus der APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäuse eine signifikant höhere Anzahl an CD11b⁺ Zellen verglichen mit APP/PS1 und WT-Mäusen. APP/PS1-Mäuse weisen nur eine gering, aber nicht signifikant erhöhte CD11b-Immunreaktivität im Vergleich zu den WT-Mäusen auf.

Es wurden im Alzheimer Mausmodell mehrfach neben der Proliferation der Mikroglia eine Aktivierung, einhergehend mit Migration und Akkumulation um die Amyloid-Plaques beschrieben (Bolmont et al., 2008). Um herauszufinden, ob das Ausmaß der Akkumulation bei APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäusen erhöht ist, wurde auf sagittalen Hirnschnitten eine CD11b-Thioflavin-Doppelfärbung zur Markierung der CD11b⁺ Zellen und der Plaques erstellt. Auf repräsentativen Bildern 3 verschiedener kortikaler Ausschnitte (frontal, parietal, occipital) in 40facher Vergrößerung wurde mit dem Programm „ImageJ“ die Kolokalisation der beiden Färbungen errechnet (Manders Coefficient, Overlap Coefficient, OC). Mit Hilfe dieses Koeffizienten kann der Bereich, in dem sich CD11b⁺ Mikroglia und Thioflavin-gefärbte Plaques überlagern, quantifiziert werden (Dunn et al., 2011).

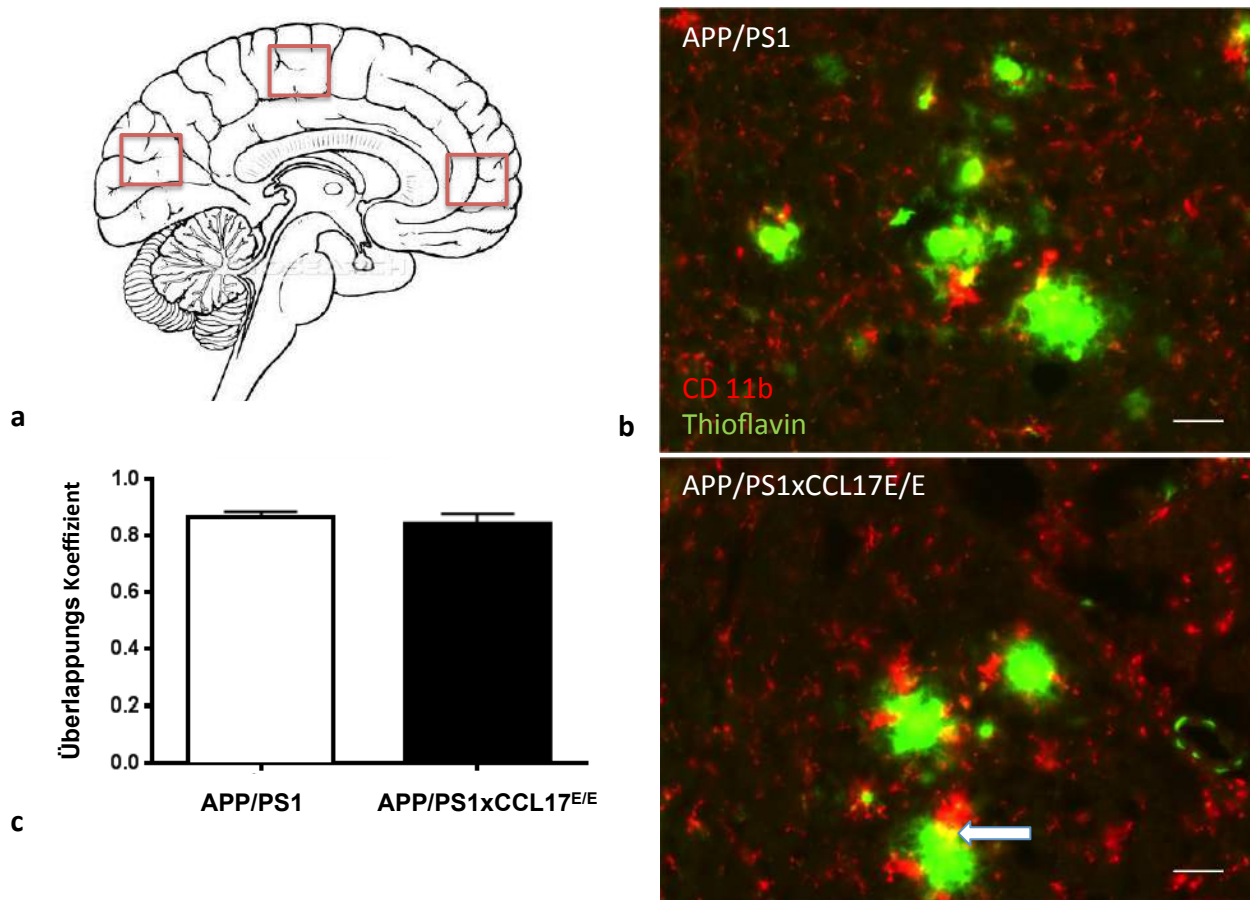


Abb. 12: Kolokalisation CD11b und Thioflavin (weißer Pfeil)

Zur Untersuchung der Plaque-assoziierten mikroglialen Akkumulation in Anwesenheit und Abwesenheit von CCL17 wurden auf sagittalen Hirnschnitten von APP/PS1 und APP/PS1x CCL17^{E/E}-Mäusen CD11b-positive Mikroglia und Thioflavin-bindende Amyloid-Ablagerungen mittels einer Thioflavin-CD11b-Immunfluoreszenz-Färbung markiert. In (a) sind die kortikalen Ausschnitte (frontal, parietal, occipital) als rote Rechtecke dargestellt, in denen Bilder gemacht und ausgewertet wurden. (b) zeigt repräsentative Fotos in 40-facher Vergrößerung der CD11b-Thioflavin-Doppelfärbung im Cortex von APP/PS1 (oben) und APP/PS1x CCL17^{E/E} (unten) -Mäusen. Erkennbar sind mit Thioflavin angefärbte Amyloid-Plaques (grün) und CD11b⁺ Mikroglia (rot). Die in beiden Bildern vorhandenen gelb angefärbten Bereiche (weißer Pfeil) zeigen die Kolokalisation der beiden Färbungen durch Überlagerung von Mikroglia und Plaques an. Der Überlappungs-Koeffizient (Manders Coefficient, Overlap Coefficient, OC) wurde zur Quantifizierung der Kolokalisation berechnet und wird vergleichend im Balkendiagramm (c) dargestellt. Es verdeutlicht, dass zwischen APP/PS1 und APP/PS1x CCL17^{E/E}-Mäusen kein Unterschied im Grad der CD11b-Thioflavin-Überlagerung besteht. Statistik: Student's t-test, n = 3 / Gruppe

Die repräsentativen Fotos der Doppelfärbung zeigen Thioflavin-gefärbte Amyloid-Plaques (grün), CD11b⁺ Zellen (rot) und deren Kolokalisation durch Überlagerung (gelb). Während die CD11b⁺ Mikroglia der APP/PS1 Maus (links) relativ gesehen gleichmäßig über das ausgewählte Gesichtsfeld verteilt sind, vermitteln die Mikroglia der APP/PS1xCCL17^{E/E} Maus (rechts) einen um die Amyloid-Plaques aktivierten Aspekt und scheinen vermehrt zu akkumulieren. Allerdings gibt es zwischen den Genotypen keinen Unterschied in dem Grad der Kolokalisation; die Überlagerung von Amyloid-Plaques und Mikroglia ist also in beiden Gruppen vergleichbar.

4.2.2 Darstellung CCR2-exprimierender Zellen

Vorhergehende Experimente ergaben in APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäusen eine vermehrte Expression von CCR2-mRNA sowie durchflusszytometrisch einen höheren Anteil Ly6C- und CCR2- positiver Makrophagen (Neitzert, 2012; Kummer, 2015). Um den Unterschied in Mikrogliose sowie erhöhter zentraler CCR2-Expression näher zu charakterisieren, wurde die Plaque-assoziierte Verteilung der CCR2-exprimierenden Zellen im ZNS mittels Thioflavin-CCR2-Immunfluoreszenz untersucht. Um Signalstärke und Morphologie CCR2-exprimierender Zellendarzustellen, wurden zunächst Färbungen in Milz und Cortex einer 9 Monate alten WT-Maus vorgenommen.

Wie in Abb. 13 dargestellt, ist mit dem verwendeten Antikörper sowohl in Milz als auch im Cortex ein CCR2-Signal darstellbar. (a) zeigt die typische Verteilung CCR2-positiver Makrophagen in der roten Pulpa. Für (b) wurde eine Doppelfärbung mit CCR2 (rot) und CD11b (grün) vorgenommen. Gelb angefärbte Bereiche stellen eine Kolokalisation beider Marker da. Es zeigen sich ruhende Zellen mit innenliegendem Zellkern (DAPI, blau) und regelmäßiger Zellmembran, markiert durch die angefärbten Oberflächenmoleküle CCR2 und CD11b.

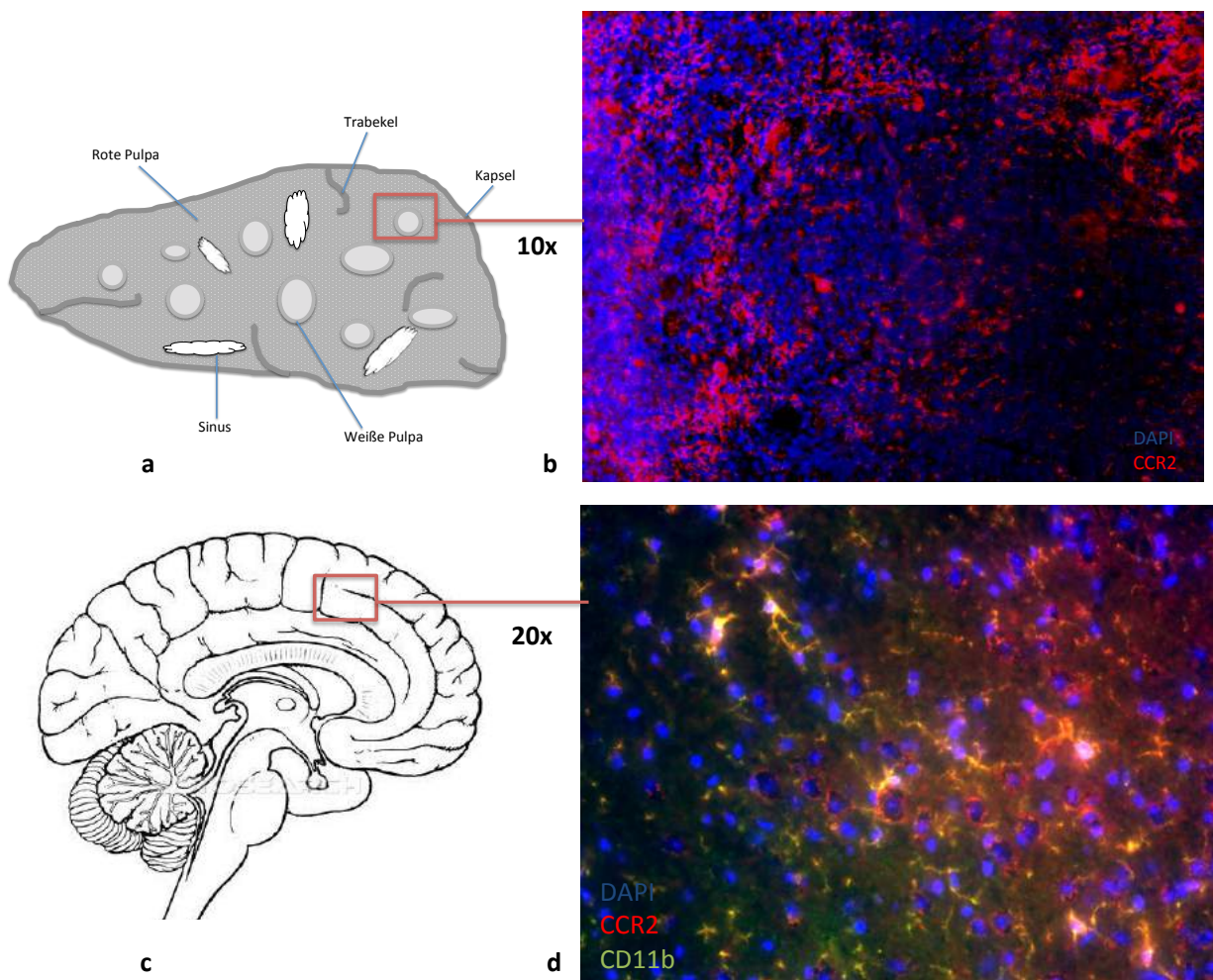
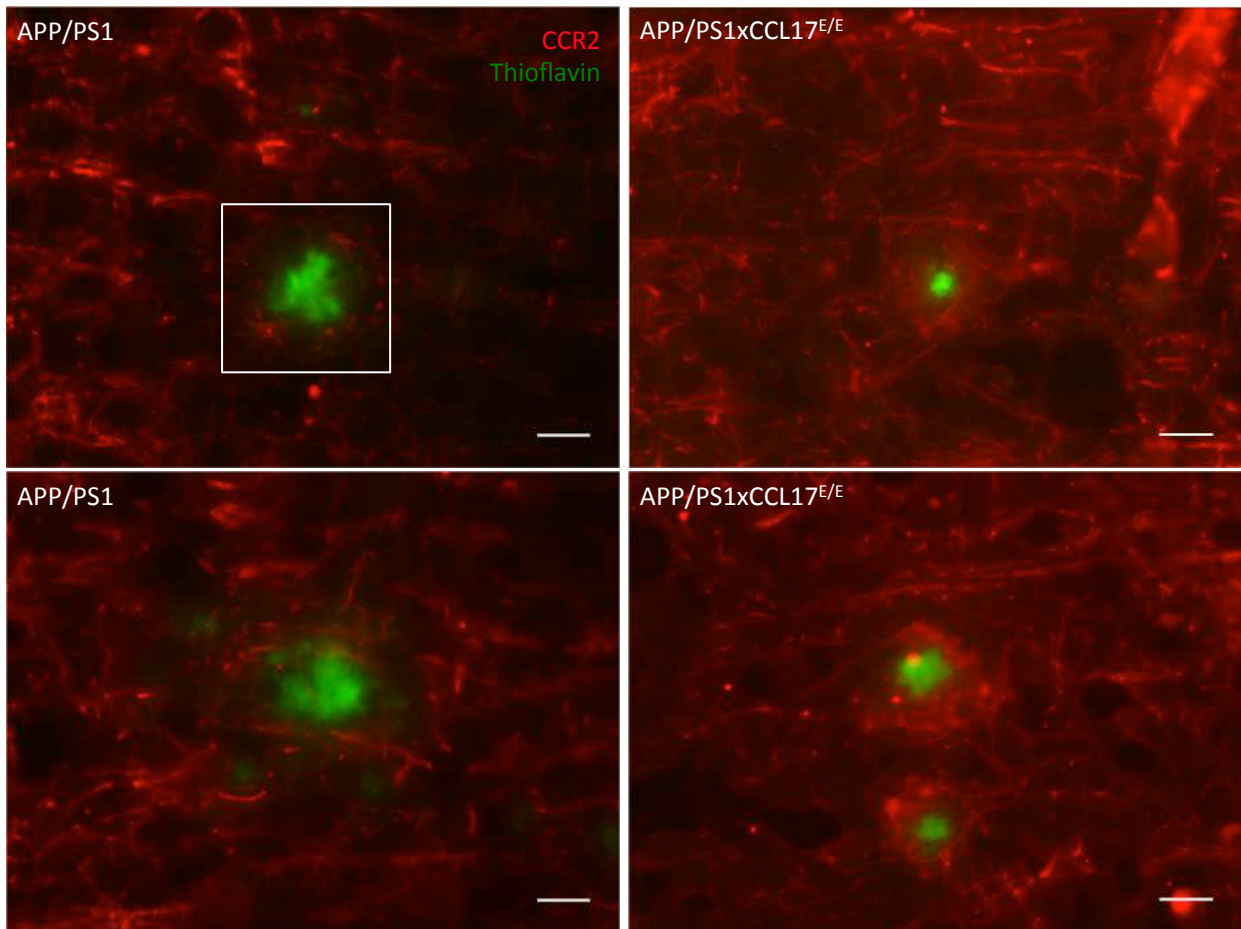


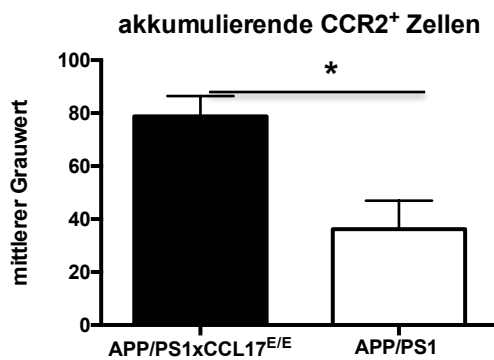
Abb. 13: CCR2-Immunofluoreszenz

CCR2-positive Zellen sind sowohl in Milz (a, 10-fache Vergrößerung) und Cortex (b, 20-fache Vergrößerung) einer 9 Monate alten WT-Maus mittels Immunfluoreszenz darstellbar.

Die folgenden Immunfluoreszenzfärbungen wurden zum Vergleich auf sagittalen Hirnschnitten von APP/PS1 und APP/PS1x $CCL17^{E/E}$ -Mäusen durchgeführt. Zur Darstellung Plaque-assoziiertes CCR2-Expression wurden Amyloid-Ablagerungen mit Thioflavin markiert und Fotos in 40-facher Vergrößerung mit einem zentral liegenden Plaque (grün) aufgenommen.



a



b

Abb. 14: CCR2 Immunfluoreszenz

In sagittalen Gehirnschnitten von APP/PS1 und APP/PS1xCCR2^{-/-}-Mäusen wurde mittels Immunfluoreszenz die Verteilung des Oberflächenmarkers CCR2 (rot) dargestellt. Zur Analyse der Plaque-assoziierten Lokalisation wurden Amyloid-Ablagerungen mit Thioflavin (grün) angefärbt. (a) zeigt repräsentative Bilder der CCR2-Thioflavin-Doppelfärbung im Cortex von APP/PS1 (links) und APP/PS1xCCR2^{-/-}-Mäusen (rechts) in 40-facher Vergrößerung. In einem ausgewählten Bereich (weißer Rahmen) um die grün angefärbten Amyloid-Plaques wurde der mittlere Grauwert der CCR2-Färbung (rot) gemessen und im Balkendiagramm (b) quantifiziert. Statistik: Student's t-test, *p < 0,05 (APP/PS1 vs. APP/PS1-CCL17^{E/E}), n = 3 / Gruppe

Während die rot angefärbten CCR2-positiven Zellen (rot) im Cortex der APP/PS1 eher eine gleichmäßige Verteilung aufweisen, zeigt sich die Plaque-assoziierte Akkumulation auf den repräsentativen Bildern der APP/PS1xCCR2^{E/E}-Mäusen deutlich verstärkt. Auffällig ist in allen Bildern die ramifizierte Form und die zahlreichen Ausläufer der CCR2-positiven Zellen. Um die direkten Plaque-assoziierten Zellen zu quantifizieren, wurde ein Bereich (ROI = Region Of Interest) festgelegt, der auf jedes Bild übertragen wurde und die ausschließliche Fluoreszenz-Analyse des innerhalb liegenden Areals ermöglichte. Hier ist dieser Bereich beispielhaft im linken oberen Bild dargestellt. Das Balkendiagramm der ROI zeigt dementsprechend einen Anstieg des mittleren Grauwertes (mean grey value) der CCR2-Immunfluoreszenz im Cortex von APP/PS1xCCR2^{E/E}-Mäusen.

4.3 Analyse der CCR2-Expression auf Knochenmark-Makrophagen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten einen Anstieg sowohl der CD11b⁺ Mikroglia als auch der CCR2-Expression in den Gehirnen der APP/PS1xCCR2^{E/E}-Mäuse. Ein durchflusszytometrisch erhöhter Anteil CCR2- und Ly6C-positiver Makrophagen weist auf einen peripheren Ursprung dieser Zelltypen hin. Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass die Einwanderung CD11b⁺ Ly6C⁺ Monozyten aus der Peripherie in das ZNS von der Expression des Chemokin-Rezeptors CCR2 abhängig ist und diese neu eingewanderten Zellen sich positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken können (Mildner et al., 2007; Prinz und Priller, 2010). Bisher ist noch nicht bekannt, ob die CCR2-Expression auf Monozyten durch einen Einfluss von CCL17 moduliert werden kann und womöglich die Migration steigern oder hemmen kann. Dieser Zusammenhang sollte mit Monozyten Kulturen aus Knochenmark untersucht werden. Um die generelle Höhe der CCR2-Expression auf peripheren Monozyten darzustellen, wurde als vorhergehender Test venöses Blut aus der Schwanzspitze einer WT-Maus entnommen und dieses mit Antikörpern gegen bekannten Monozyten-Oberflächenmarker CCR2, CD11b und Ly6C angefärbt.

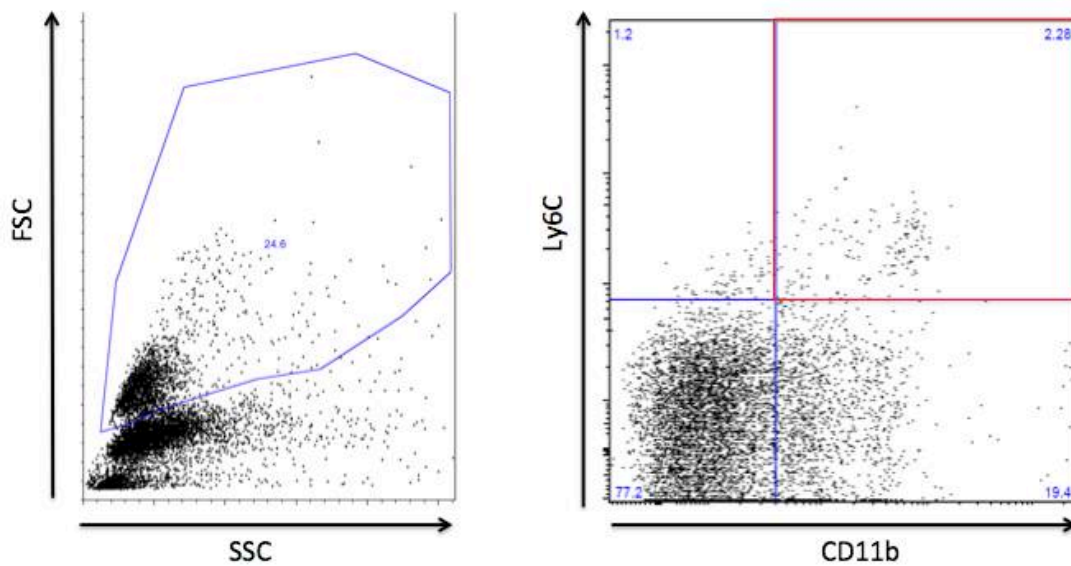


Abb. 15: Durchflusszytometrische Darstellung von Zellen des peripheren Blutes
 1 Monat alten WT-Mäusen wurde venöses Blut entnommen und die Makrophagen-Oberflächenmarker CD11b und Ly6C mit Antikörpern angefärbt. In der Durchflusszytometrie wurden die Populationen aufgetrennt nach Größe (FSC = forward scatter), Granularität (SSC = sideward scatter) und mittlerer Fluoreszenzintensität dargestellt. Im Dotplot (links) wurden die vitalen Zellen durch Setzen eines „life gate“ (blauer Rahmen) ausgewählt. Die Population Ly6C und CD11b positiver Zellen (Monozyten/Makrophagen, rot umrahmt) wurde zur weiteren Untersuchung ausgewählt.

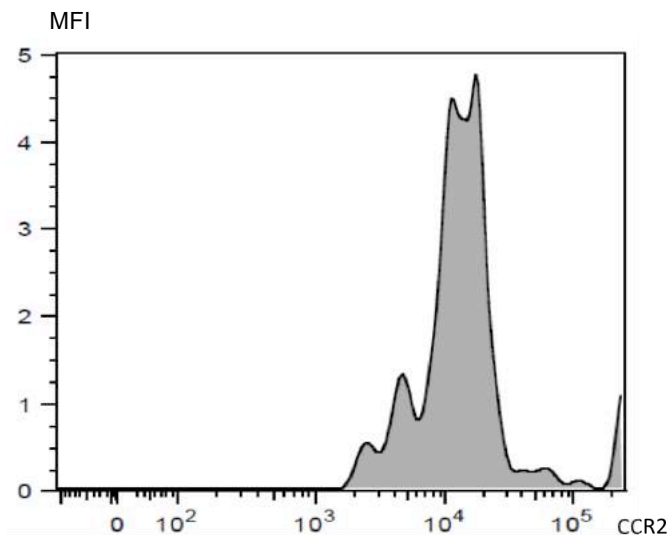


Abb. 16: Durchflusszytometrische Bestimmung der CCR2 Expression auf Ly6C und CD11b positiven Blutzellen
 In der Durchflusszytometrie wurde eine Ly6C- und CD11b-positive Population (Monozyten) ausgewählt und in dieser die mittlere Fluoreszenzintensität (ca. 10^4) des antikörper-markierten Rezeptors CCR2 bestimmt, hier im Histogramm dargestellt.

Abb. 16 zeigt ein deutlich positives Signal nach CCR2-Färbung auf CD11b⁺ Ly6C⁺ Zellen. Um zu untersuchen, ob in CCL17^{E/E}-Mäusen die Expression von CCR2 auf peripheren Monozyten unter Standard- oder inflammatorischen Bedingungen erhöht ist, wurden Kulturen aus Knochenmark-Monozyten von WT und CCL17^{E/E}-Mäusen generiert und die CCR2-Expression unter verschiedenen Bedingungen durchflusszytometrisch gemessen. Die Basalexpression auf WT-Monozyten wurde zuerst an Tag 0, Tag 3 und Tag 7 der Kultur untersucht, um den Zeitpunkt der höchsten CCR2-Expression für die weiteren Experimente herauszufinden.

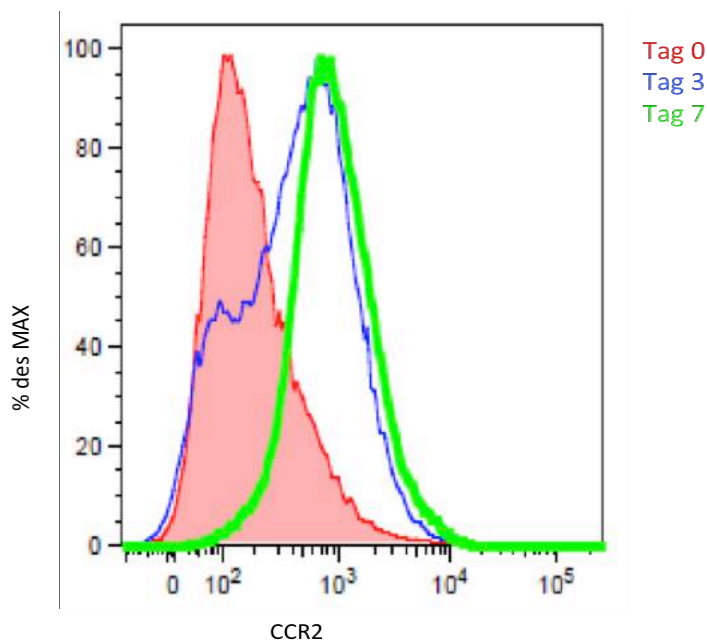


Abb. 17: Die Abhängigkeit der CCR2-Expression auf WT-Monozyten vom Reifestadium Knochenmarkszellen wurden kultiviert. Nach jeweils 0, 3 und 7 Tagen in der Kultur wurde CCR2 mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert und die mittlere Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt. Das Histogramm zeigt die prozentuale CCR2-Fluoreszenzintensität. Diese erreicht auf 7 Tage alten Monozyten ihr Maximum.

Nach 7 Tagen in der Kultur wurde auf den Monozyten die höchste Expression von CCR2 ermittelt, wie im Histogramm erkennbar. Sie erreicht nahezu die im Pretest festgestellte mittlere Fluoreszenzintensität der im Blut zirkulierenden Monozyten. Die weiteren Experimente wurden daraufhin mit 7 Tage kultivierten Monozyten durchgeführt. Zur Analyse einer möglichen Abhängigkeit der CCR2-Expression von der CCL17-

Präsenz wurden hier kultivierte Monozyten aus WT- und CCL17^{E/E}-Mäusen durchflusszytometrisch untersucht. Durch eine vorhergehende Stimulation mit LPS (Lipopolysaccharid) wurden inflammatorische Bedingungen hergestellt und die Induktion der CCR2-Expression beobachtet.

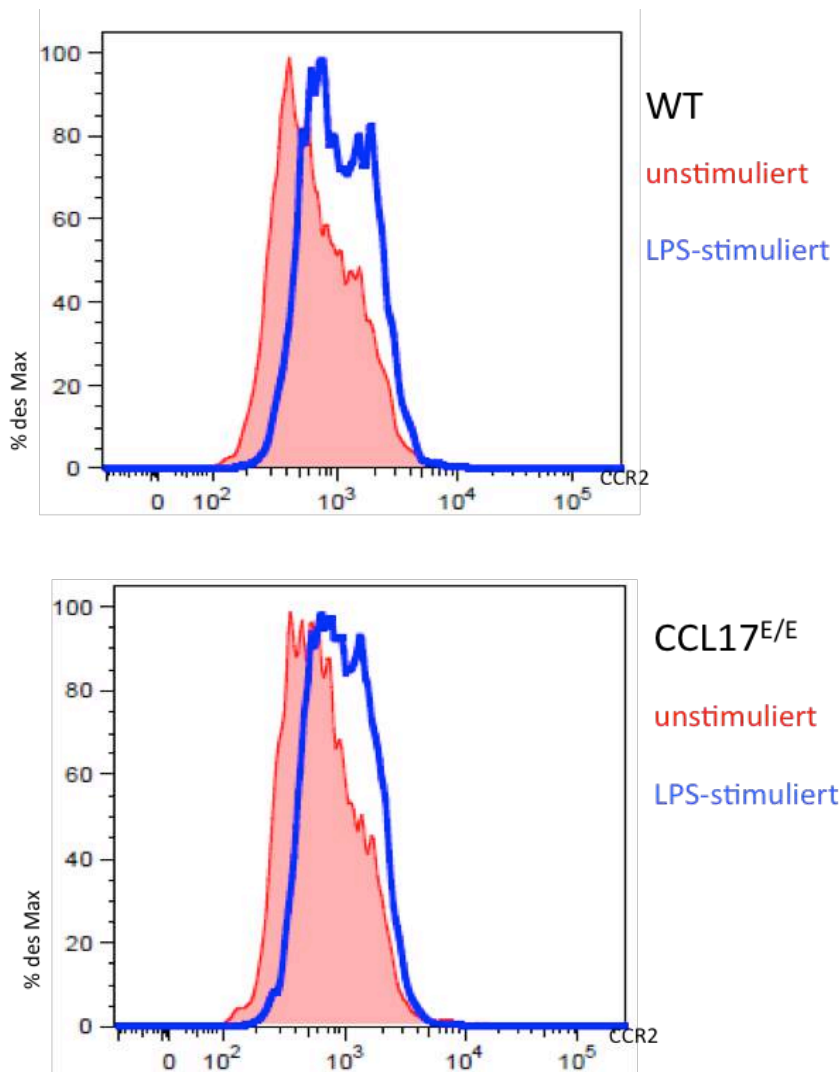


Abb. 18: Vergleichende Histogramme der CCR2-Expression auf unstimulierten und LPS-stimulierten Knochenmarkszellen

Die Monozyten wurden in der Kultur mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert und die Expression von CCR2 mittels Durchflusszytometrie vergleichend analysiert. Erkennbar ist ein Anstieg der CCR2-Expression nach LPS-Stimulation, unabhängig vom Genotyp. Es besteht kein Unterschied der Basis-Expression zwischen unstimulierten Monozyten von WT- und CCL17E/E-Mäusen.

Des Weiteren wurde eine Stimulation der Monozyten mit den Chemokinen CCL17 und CCL22 durchgeführt, die beide mit dem Chemokin-Rezeptor CCR4 interagieren. Untersucht wurde ein möglicher direkter Effekt auf die Zellen, der zu einer Modulation der CCR2-Expression führen könnte. Da bisher nichts über den zeitlichen Verlauf dieses potentiellen Mechanismus bekannt ist, wurde die Stimulation zu 2 verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt (3 Std. vs. 15 Std. vor dem Ernten).

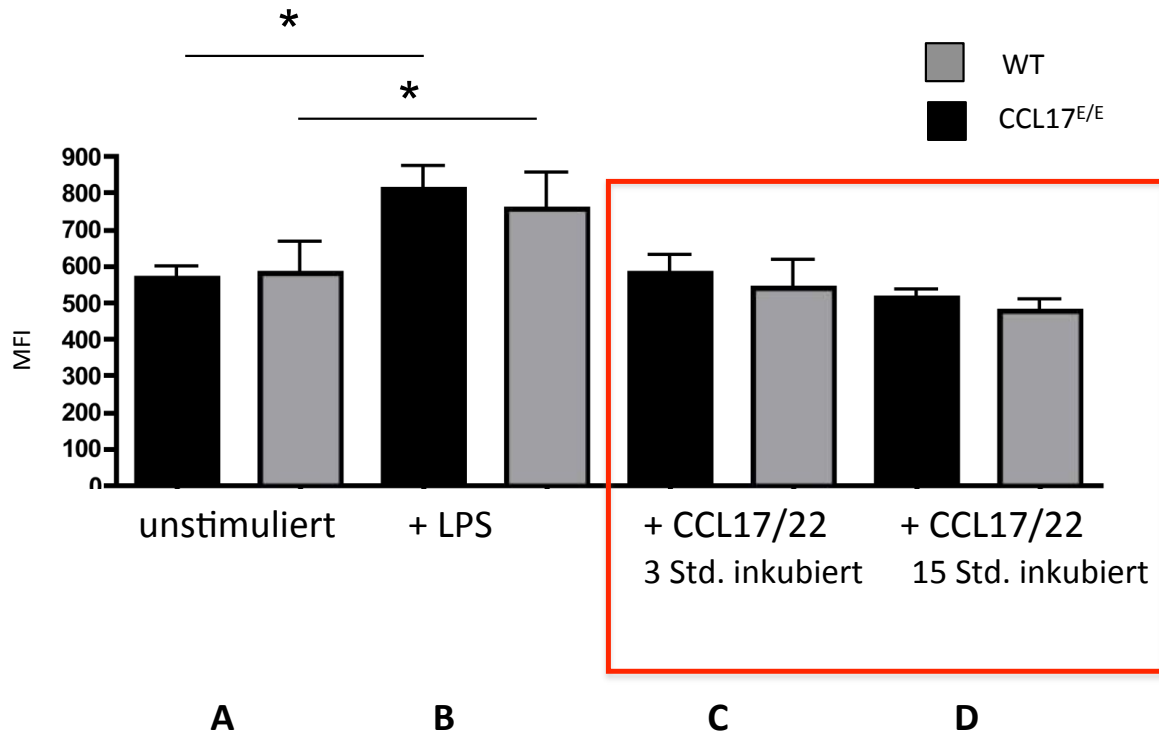


Abb. 19: Modulation der CCR2-Expression

durch Stimulation kultivierter Monozyten mit LPS und CCL17 + CCL22

Kultivierte Monozyten aus WT (grau) und CCL17^{E/E}-Mäusen (schwarz) wurden mit LPS (B) oder CCL17 + CCL22 (C und D) zu unterschiedlichen Zeitpunkten stimuliert. Anschließend wurde die Expression von CCR2 durchflusszytometrisch bestimmt. Das Diagramm zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity, MFI) der CCR2-Färbung. Statistik: Student's t-test, *p < 0,05 (unstimuliert vs. +LPS), n = 5 / Gruppe

Abb. 19 zeigt einen signifikanten Anstieg der mittleren CCR2-Fluoreszenz-Intensität nach Stimulation mit LPS (B), unabhängig von der Anwesenheit von CCL17. Die Stimulation mit CCL17 und CCL22 (C und D) führt zu keiner Veränderung der Expression.

5. Diskussion

5.1 Verminderter neuronaler Zellverlust im ZNS von APP/PS1x $CCL17^{E/E}$ -Mäusen

Neuronale Dysfunktion und neuronaler Zellverlust sind wesentliche Faktoren in der Pathogenese der Alzheimer Demenz. Zahlreiche Studien in AD-Mausmodellen haben gezeigt, dass A β -Oligomere, hochmolekulare Amyloid-Aggregate, durch toxische Effekte zu Untergang von Synapsen und Neuronen zu führen scheinen, wobei der neuronale Verlust mit dem kognitiven Verlust korreliert (Heneka und O'Banion, 2007). In einigen Studien wird die chronische Inflammation und die Aktivierung der Mikroglia als monozytär-phagozytierende Zellen (MPC), einhergehend mit einer erhöhten Phagozytosekapazität (Neniskyte et al., 2011), als weiterer pathogenetischer Faktor angesehen. Es wurde erkannt, dass der Hippocampus als zentrale Struktur der Erinnerungsformation am empfindlichsten gegenüber neuronaler Degeneration ist. Dies äußert sich phänotypisch in den frühen Ausfällen des Erinnerungs- und Lernvermögens. Bei AD-Patienten wurden *post mortem* neuronale Verluste und Dysfunktionen, einhergehend mit einer Reduktion der Hirnmasse beobachtet (Baron et al., 2007; Selkoe, 2001). Entsprechende Untersuchungen in AD-Mausmodellen zeigten bisher im Gegensatz zu dem vorliegenden Projekt keine signifikante Verminderung der Neuronen, jedoch wiesen einige transgene Mausmodelle für Amyloidose neuronale Dystrophien (Garcia-Alloza et al., 2006; Istl et al., 1997), Verlust hippocampaler Interneuronen (Takahashi et al., 2010) oder verminderte Neuronenaktivität in direkter Umgebung der Plaques auf (Meyer-Luehmann et al., 2009).

Aufgrund der dieser Arbeit vorausgehenden Ergebnisse aus verhaltensbiologischen Untersuchungen (Neitzert, 2012), bei denen die APP/PS1x $CCL17^{E/E}$ -Mäuse ein signifikant besseres Lern- und Erinnerungsverhalten zeigten als die APP/PS1-transgenen Kontrollen, wurde vermutet, dass als Ursache dessen ein unterschiedliches Maß an hippocampaler Neurodegeneration vorliegen könnte. Das Ergebnis der NeuN-Immunfluoreszenzfärbung zeigt eine deutliche Rarefizierung der Neuronen in den Gehirnen von 12 Monate alten APP/PS1-Mäusen verglichen mit den WT-Mäusen. Die dargestellte NeuN-Expression der APP/PS1x $CCL17^{E/E}$ -Mäuse hingegen ähnelt dem der WT-Mäuse. Eine wie in diesen Studien nachgewiesene Reduktion von NeuN⁺ Neuronen im Hippocampus von APP/PS1-Mäusen wurde in bisherigen Studien nicht gezeigt,

jedoch eine verminderte Neurogenese in BrdU⁺/NeuN⁺ (Butovsky et al., 2006) oder DCX⁺ (Kiyota et al., 2012) Neuronen. Da diese Analysen in 8 oder 9 Monate alten Mäusen durchgeführt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Progression der verminderten Neurogenese in einem Verlust der Gesamtmenge an Neuronen in 12 Monate alten APP/PS1-Mäusen resultiert. Weitere Untersuchungen könnten überprüfen, ob die verminderte Anzahl NeuN⁺ Neuronen in APP/PS1-Mäusen verglichen mit APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäusen Folge eines erhöhten Zelltods oder einer verminderten Neurogenese ist. Offensichtlich induziert CCL17 schädigende Effekte auf Neuronen in der Neuroinflammation im Alzheimer Modell. Es stellt sich die Frage, ob ein direkter CCL17-vermittelter negativer neuronaler Effekt, z.B. über eine potentielle Expression von CCR4 auf der neuronalen Zellmembran, vorliegen könnte. Alternative Erklärungsansätze sind unter anderem eine Hemmung der Neurogenese oder Veränderungen des neuroinflammatorischen Milieus in Abwesenheit von CCL17, die sich neuroprotektiv auswirken.

5.2 Erhöhte Mikrogliose im ZNS von APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäusen

Neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer Demenz gehen einher mit einer chronischen Inflammation des ZNS, sowohl in Patienten als auch in Mausmodellen. Diese beinhaltet die Aktivierung sowie Proliferation von Mikroglia und Astrozyten, Freisetzung von Komplementfaktoren, Cytokinen und Chemokinen und Immigration peripherer Immunzellen (Lucin und Wyss-Coray, 2009). Neuronaler Verlust, wie hier beobachtet in APP/PS1-Mäusen, wird häufig begleitet von reaktiven Astrozyten und Mikrogliazellen, die entweder als Ursache oder Abwehr neuronaler Degeneration fungieren (Li et al., 2009; Neniskyte et al., 2011).

Die Astrozytose wurde schon von Alois Alzheimer bei der postmortalen Sektion von AD-Patienten entdeckt (Alzheimer, 1907). In weiteren Studien wurde eine generalisierte Astrozytose in Form von Astroglia-Hypertrophie sowie erhöhter GFAP-Expression sowohl in Patienten als auch in transgenen Tiermodellen beobachtet. Astrozyten sind sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen aktiv in Synaptogenese und metabolische Regulation involviert. Die Bindung inflammatorischer Zytokine, Chemokine und Akute-Phase-Proteine (Teil der unspezifischen Immunabwehr, z.B. CRP, einige Gerinnungsfaktoren, Haptoglobin) an von Astrozyten exprimierte Rezeptoren führt zu reaktiver Proliferation (Morales et al., 2014). Die hier

durchgeführten Untersuchungen ergaben im Vergleich zum WT eine Astrozytose in Hippocampus und Cortex beider APP/PS1-Mausgruppen, unabhängig vom Vorliegen von CCL17 sowie, der Literatur entsprechend, eine weitestgehend homogene Verteilung der Astrozyten. Das Ergebnis spricht für eine reaktive Astrozytose als Reaktion auf neuroinflammatorische Prozesse ohne Einfluss peripherer oder zentraler CCL17-Expression.

Mikroglia als monozytäre Zellen des ZNS sind ein Teil des angeborenen Immunsystems und gehören damit zur ersten Instanz der Immunabwehr. Es wurde zudem gezeigt, dass eine langjährige Einnahme von NSAIDs als Hemmer der Inflammation die Inzidenz der AD (McGeer et al., 1996) und in Mäusen das Level an vorhandener Amyloid-Plaques senken kann (Weggen et al., 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Immunfluoreszenz-Färbung zeigte im Vergleich zum WT eine deutliche Mikrogliose in Hippocampus und Cortex 9 Monate alter APP/PS1-Mäuse, jedoch einen zusätzlich signifikanten Anstieg der CD11b⁺ Mikroglia in Abwesenheit von CCL17. Es ist nicht geklärt, ob die erhöhte Mikrogliose in diesem Fall durch Proliferation ZNS-residenter Mikroglia entsteht oder durch Infiltration peripherer Monozyten, die zu Gewebsmakrophagen differenzieren und die Population der Mikroglia erneuern (Rezai-Zadeh et al., 2011). Es wurde bereits gezeigt, dass Mikroglia als Phagozyten eine effektive Elimination von Amyloid- β bewirken können, einhergehend mit Veränderungen der Zellmorphologie, Proliferation und Freisetzung proinflammatorischer Faktoren (Morales et al., 2014). Daher könnte dieses Ergebnis einen Zusammenhang zwischen der erhöhten mikroglialen Proliferation und dem verminderten neuronalen Verlust in APP/PS1x CCL17^{E/E}-Mäusen vermuten lassen. Andererseits werden der Mikrogliose im Rahmen der chronischen Neuroinflammation auch lokale toxische Effekte zugeschrieben, weshalb sie trotz der effektiven Phagozytose von Amyloid- β nicht grundsätzlich als protektiv angesehen wird (Rogers und Lue, 2001). Um zu untersuchen, ob neben der erhöhten Anzahl auch eine erhöhte Migration der Mikroglia hin zu den Amyloid- β -Plaques vorliegt, wurde der Focus auf einen Thioflavin-angefärbten Plaque gelegt und die Überlappung von Thioflavin- und CD11b-Immunfluoreszenz gemessen. Hiermit sollte eine Aussage darüber gewonnen werden, wie hoch die Menge der in die Plaques eingewanderten aktivierten Mikroglia ist. Die CD11b⁺ Mikroglia zeigen auf den vergleichenden Abbildungen der Doppelfärbung eine erhöhte Akkumulation um die

Plaques in Abwesenheit von CCL17, während das CD11b-Färbemuster in APP/PS1-Mäusen eher gleichmäßig verteilt erscheint. Die quantitative Auswertung ergibt jedoch trotz erhöhter Mikrogliose in APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäusen einen ähnlichen Überlappungs-Koeffizienten in beiden Mausgruppen. CD11b⁺ Mikroglia scheinen also nicht in unterschiedlichem Ausmaß in die senilen Plaques einzuwandern.

Die erhöhte Mikrogliose sowie die vermehrte Expression von CCR2-mRNA in APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäusen deuten jedoch auf einen neuroprotektiven Einfluss hin. Es wurde bereits beobachtet, dass eingewanderte CCR2-positive monozytäre Zellen aus dem Knochenmark im ZNS zu Mikroglia differenzieren können und eine erhöhte Phagozytose-Kapazität besitzen als residente Mikroglia (Rezai-Zadeh et al., 2011; Rogers et al., 2002). Diese Migration hat in Fällen chronischer Inflammation wie bei der AD einen protektiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Ursächlich für die erhöhte CCR2-mRNA-Expression könnte zum einen eine erhöhte Immigration CCR2-positiver Zellen ins ZNS CCL17-defizienter APP/PS1-Mäuse sein, darauffolgende effektive Amyloid-Elimination mit neuroprotektiven Effekten.

Andererseits könnte eine erhöhte CCR2-Expression monozytärer Zellen in Abwesenheit von CCL17 vorliegen, die eine erhöhte Rekrutierung oder eine Modulation der CCR2-Expression durch CCL17 möglich macht. Um diese Hypothesen zu untersuchen, wurde die CCR2-Expression peripherer monozytärer Zellen von CCL17 und WT-Mäusen verglichen und eine CCR2-Immunfluoreszenzfärbung im ZNS von APP/PS1 und APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäusen durchgeführt.

Welchen Einfluss CCL17 auf die CCR2-Expression oder die CCR2-abhängige Migration von Monozyten hat, ist bisher ungeklärt. Bekannt ist jedoch, dass verschiedene Immunzellen, unter anderem auch DZ, T-Zellen und auch Makrophagen CCR4, den Rezeptor für CCL17, exprimieren (Poppensieker et al., 2012). Vorhergehende Studien zeigten eine CCR4-Expression auf Ly6C+CCR2+ Monozyten. Neben einer vermehrten Präsenz dieser Zellen in APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäusen wurde außerdem eine Hochregulation von CCL22-mRNA im Hippocampus beobachtet (Neitzert, 2012). Diese Ergebnisse könnten eine synergistische Wirkung der beiden Rezeptor-Liganden-Systeme – CCL2/CCR2 und CCL22/CCR4 – vermuten lassen. Weitere Untersuchung zur Charakterisierung der Systeme in Abwesenheit von CCL17 könnten aufschlussreiche Erkenntnisse liefern.

5.3 Verstärkte Akkumulation CCR2-positiver Zellen im Bereich der Plaques bei APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäusen

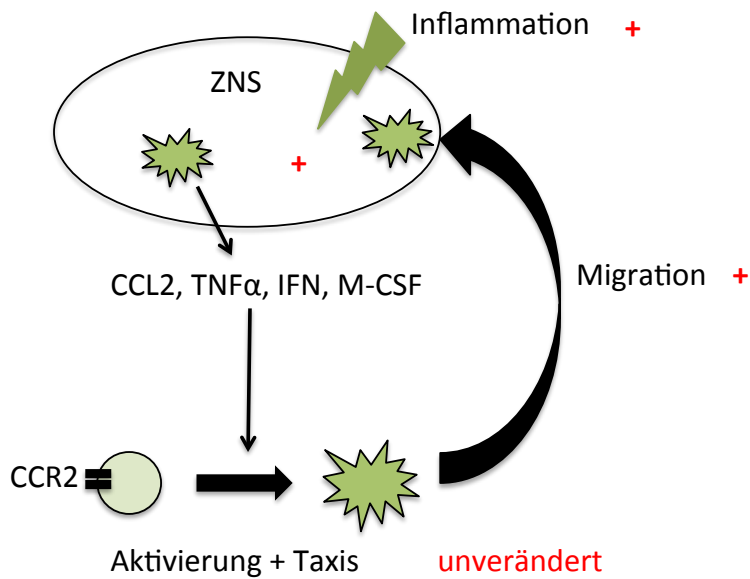
Bisher wurde die chronische Neuroinflammation bei der Alzheimer-Erkrankung aufgrund der Freisetzung zytotoxischer Stoffe insbesondere durch Mikroglia als schädigender Faktor in der Pathogenese angesehen. Diese Vorstellung wurde unterstützt durch die Beobachtung, dass die Einnahme von NSAID die Progression der AE verlangsamen kann (Rogers und Lue, 2001). Aktuelle Studien zeigen jedoch einen Anstieg des Amyloid-Levels unter der Therapie mit NSAID. Die Inflammation scheint eher eine Neuroprotektion als Neurodegeneration zu bewirken (Simard et al., 2006). Im Rahmen der chronischen inflammatorischen Reaktion bei der Alzheimer-Erkrankung kommt es zu einer Infiltration des ZNS durch zirkulierende CCR2- und Ly6C-exprimierende Monozyten (Simard und Rivest, 2004). Es wurde demonstriert, dass eine Chemotaxis der immigrierten Zellen speziell zu den geschädigten Bereichen des ZNS (Prinz und Priller, 2010) zu einer Akkumulation in den die Amyloid-Plaques umgebenden Arealen führt. Die neben den Plaques lokalisierten Mikroglia wurden als ursprünglich peripher monozytär identifiziert und verlangsamen die Progression der AE durch eine effektive Elimination des β -Amyloids in den senilen Plaques (Simard et al., 2006). Studien zeigen, dass ausschließlich die CCR2- und Ly6C-exprimierende Population der eingewanderten Monozyten dazu fähig ist, Amyloid- β zu phagozytieren und zu eliminieren (Gaelle und Rivest, 2013). Die verstärkte Mikrogliose und der CCR2-mRNA-Anstieg im ZNS von APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäusen lassen die Annahme einer erhöhten Migration peripherer Monozyten durch die Blut-Hirn-Schranke in Abwesenheit von CCL17 wahrscheinlich erscheinen. Die damit verbundene Akkumulation in den geschädigten Bereichen des ZNS sowie Elimination des β -Amyloids kann, wie in der Literatur beschrieben, für eine Neuroprotektion und damit die beschriebene verminderte assoziierte Neurodegeneration verantwortlich gemacht werden. Um die aktiven, mit den senilen Plaques assoziierten Zellen auf ihren Ursprung zu untersuchen und den Anteil an potentiell protektiven CCR2-positiven eingewanderten Monozyten in Abhängigkeit von CCL17 zu quantifizieren, wurde CCR2 per Immunfluoreszenzfärbung markiert. Deutlich erkennbar ist die unterschiedliche Verteilung der CCR2-positiven monozytären Zellen in direkter Umgebung der Amyloid-Aggregate. Während die Bilder der APP/PS1-Mäuse eine weitestgehend gleichmäßige Verteilung der Färbung aufweisen, zeigen die Bilder der

APP/PS1x $CCL17^{E/E}$ -Mäuse eine Akkumulation CCR2-positiver Zellen in der unmittelbaren Umgebung der senilen Plaques. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Migration peripherer Monozyten ins ZNS und hin zu geschädigten Arealen, wie in der Literatur beschrieben wird, in Abwesenheit von CCL17 in einem signifikant höheren Ausmaß stattfindet. Es ist davon auszugehen, dass der große Anteil Plaque-assoziiierter CCR2-positiver Phagozyten für die Eliminierung des Amyloids und damit den verminderten neuronalen Verlust verantwortlich ist. Welchen Beitrag das Zusammenspiel der Chemokine, speziell das Chemokin CCL17 und sein Rezeptor CCR4, in der Migration peripherer CCR2⁺ Zellen spielt, ist bisher ungeklärt. Es wurde beobachtet, dass isolierte Mikroglia aus WT und $CCL17^{E/E}$ -Mäusen unter inflammatorischen Bedingungen niedrigere CCR4 Level exprimieren (Neitzert, 2012). Die beobachtete höhere mRNA Expression von CCL22, dem zweiten Liganden für CCR4, in $CCL17^{E/E}$ -Mäusen, ist ein potentieller kompensatorischer Mechanismus als Reaktion auf die Abwesenheit von CCL17. Eine mögliche Folge der Interaktion beider Liganden-Rezeptor-System könnte eine modulierte Rekrutierung CCR4⁺CCR2⁺CD11b⁺ Zellen in APPPS1x $CCL17^{E/E}$ -Mäusen sein.

5.4 Unverändertes CCR2-Expressionsmuster auf peripheren Monozyten aus WT und $CCL17^{E/E}$ -Mäusen

Die Rekrutierung zirkulierender Monozyten mittels der CCL2-CCR2-Achse wurde als Bestandteil der inflammatorischen Reaktion in vielen Krankheitsmodellen identifiziert. Auch die chronische Inflammation bei der Alzheimer Demenz geht mit der Einwanderung von zirkulierenden Monozyten durch die Blut-Hirn-Schranke, Differenzierung zu Mikroglia und effektive Eliminierung von Amyloid-Ablagerungen (Malm et al., 2005) einher. Dieser Mechanismus wurde als neuroprotektiv beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen Veränderungen der Immunreaktion CCL17-defizienter APP/PS1-Mäuse, die auf einer erhöhten Präsenz CCR2-exprimierender Zellen zu basieren und eine wesentliche Neuroprotektion zu vermitteln scheinen. Eine vermehrte CCR2-mRNA-Expression im ZNS in Kombination mit einer verstärkten Mikrogliose könnte ein Hinweis auf vermehrt einwandernde Monozyten aus der Peripherie sein. Hier wurde die erhöhte Migration durch lokale Applikation von LPS, eines pro-inflammatorischen Stimulans, ausgelöst. LPS als Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien agiert als pro-inflammatorischer Aktivator

mononukleärer Phagozyten und senkt *in vivo* bei Alzheimer-Modellen durch eine erhöhte inflammatorische Reaktion die Amyloid-Last im ZNS (Malm et al., 2005). Die Stimulation mit LPS führt auf kultivierten Knochenmarkszellen nachweislich zu einer erhöhten CCR2-Expression. Dies lässt eine stärkere Taxierung und Aktivierbarkeit durch den Liganden CCL2 vermuten. Ob in Abwesenheit von CCL17 auch eine höhere Menge an Rezeptoren als Ursache für die verstärkte Einwanderung anzunehmen ist, sollte eine vergleichende Untersuchung des CCR2-Expressionsprofils auf kultivierten CCL17^{E/E-}- und WT-Knochenmarkszellen ergeben. Die Höhe der CCR2-Expression wurde zu unterschiedlichen Zeiten sowie nach Stimulation durchflusszytometrisch untersucht. Um zu untersuchen, ob in Abwesenheit von CCL17 ein verändertes natives CCR2-Expressionsprofil oder eine stärkere Aktivierbarkeit mit Heraufregulierung der Rezeptoren unter inflammatorischen Bedingungen vorliegt, wurden native und mit LPS stimulierte Makrophagen untersucht. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass sowohl auf nativen als auch auf LPS-stimulierten Makrophagen kein Unterschied der CCR2-Expression zwischen CCL17^{E/E-}- und WT-Mäusen detektierbar ist. Der Anstieg der CCR2-Expression nach Stimulation bestätigt die Aktivierbarkeit der Makrophagen als Reaktion auf proinflammatorische Stimulanzen. Es ist anzunehmen, dass auch *in vivo* eine erhöhte CCR2-Expression auf peripheren und lokalen monozytären Zellen im Falle einer Inflammation entsteht, was eine erhöhte Migration hinzu geschädigten Arealen bewirken könnte. Das hier durchgeführte Experiment ergab einen vergleichbaren Anstieg der CCR2-Expression unter Stimulation, sodass dieser Faktor als Ursache für die erhöhte Mikrogliose und die Neuroprotektion ausgeschlossen werden kann. Denkbar wäre jedoch eine verstärkte lokale Inflammation in Abwesenheit von CCL17, die für einen steileren Anstieg der CCR2-Expression sorgt. Eine verstärkte Neuroinflammation ist im Falle der AD auf die Proliferation und Aktivierung residenter Zellen wie Mikroglia und Astrozyten zurückzuführen, die durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie CCL2 für eine weitere Einwanderung mononukleärer Zellen sorgen. Möglicherweise liegt in APP/PS1xCCL17^{E/E-}-Mäusen eine Heraufregulierung dieses Regelkreises vor.



Effekte der CCL17-Defizienz

Abb. 20: Regelkreis der monozytären Reaktion auf Inflammation
Und die Effekte der CCL17-Defizienz auf einzelne Faktoren

Abb. 20 verdeutlicht die Reaktion peripherer Monozyten auf durch lokale Zellen (hier Mikroglia) systemisch freigesetzte Stoffe (hier CCL2, TNF, IFN, M-CSF). Durch Bindung an verschiedene Rezeptoren (hier CCR2) werden periphere monozytäre Zellen taxiert und aktiviert, was zu einer Migration in Richtung des geschädigten Areals führt. Veränderte Faktoren bei CCL17-Defizienz wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Es zeigte sich eine erhöhte Mikrogliose sowie erhöhte CCR2-Level im ZNS von APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäusen. Dies sind Kennzeichen einer erhöhten lokalen Inflammation, die sich in diesem Fall als neuroprotektiv erwiesen hat. Die Untersuchung des CCR2-Expressionsprofils peripherer Monozyten ergab keine Unterschiede der nativen oder stimulierten Level, was für eine unveränderte Aktivierung und Taxis dieser Zellen spricht. Bei unveränderter Expression des Rezeptors scheint die CCR2-abhängige Migration in Abwesenheit von CCL17 erhöht zu sein. Da eingewanderte Monozyten im ZNS zu Mikroglia differenzieren und deren Bestand aufstocken, erklärt dies das vermehrte Aufkommen CD11b⁺ Mikroglia sowie die erhöhte CCR2-mRNA-Expression. Die verstärkte Migration CCR2-positiver Zellen innerhalb des ZNS von APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäusen, die zu Plaque-assoziierten Akkumulationen führt, unterstützt diese Theorie. Weiterhin wurde eine mögliche direkte Einwirkung des

Zytokins CCL17 auf die CCR2-exprimierenden Makrophagen untersucht. Da in APP/PS1xCCL17^{E/E}-Mäusen ein signifikanter Anstieg der CCR2-mRNA im ZNS beobachtet wurde, wäre bei direkter Einwirkung von CCL17 auf die Makrophagenkultur ein Absinken der CCR2-Expression zu vermuten. Wie in Abb. 19 dargestellt, konnte ein solcher Effekt nach Stimulation mit CCL17 und CCL22, einem weiteren Liganden von CCR4, im Rahmen dieser Untersuchungen ausgeschlossen werden.

6. Zusammenfassung

Basierend auf vorherigen Studien, die erste phänotypische Auffälligkeiten der hier untersuchten APP/PS1xCCR2^{E/E}-Mäuse zeigten, wurde dieses Projekt durchgeführt. Die Ergebnisse der Verhaltenstests ließen bedeutsame Veränderungen des neuronalen, zellulären und humoralen inflammatorischen Milieus vermuten. Zudem ergaben erste Untersuchungen eine erhöhte Expression der CCR2-mRNA sowie durchflusszytometrisch einen erhöhten Anteil an Monozyten im ZNS der CCR2-defizienten APP/PS1-Mäuse, gekennzeichnet durch die Expression von CCR2 und Ly6C – typische Marker peripherer mononukleärer Zellen. Für diese vermehrte Präsenz von CCR2 in Abwesenheit von CCL17 wurden 2 Hypothesen aufgestellt:

1. vermehrte Migration peripherer Monozyten ins ZNS CCL17-defizienter APP/PS1-Mäuse
2. CCL17-abhängige Modulation der CCR2-Expression auf mononukleären Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das inflammatorische Profil der APP/PS1xCCR2^{E/E}-Mäuse charakterisiert werden. Es zeigte sich als physiologisches Korrelat zum Erhalt der kognitiven Fähigkeiten ein verminderter neuronaler Verlust hippocampaler Neuronen, was auf einen substanziellen neuroprotektiven Mechanismus schließen ließ. Als Teil dessen konnte eine in Abwesenheit von CCL17 verstärkte Mikrogliose beobachtet werden, die in aktuellen Studien als neuroprotektiv beschrieben wurde. Entsprechend Hypothese 1 (s.o.) wurde eine in CCL17-defizienten APP/PS1-Mäusen signifikant verstärkte Plaque-assoziierte Akkumulation der CCR2-positiven Zellen bei insgesamt höherem Anteil CCR2-Ly6C-exprimierender Monozyten beobachtet. Ein vergleichender Migrationsassay könnte im Rahmen von Folgeprojekten einen eindeutigen Beweis liefern. Auch der Effekt von CCL17 auf die Migration der Monozyten, der in Abwesenheit dieses Chemokins zu einer vermehrten Immigration führt, wäre Gegenstand für weitere Untersuchungen. Eine CCL17-abhängige Modulation der CCR2-Expression (Hypothese 2) konnte durch die Untersuchungen an kultivierten Monozyten ausgeschlossen werden. Die beobachtete, vom Genotyp unabhängige CCR2-Heraufregulierung nach Stimulierung mit LPS könnte eine verstärkte Migration innerhalb des pro-inflammatorischen Milieus erklären. Die hier beschriebenen Ergebnisse demonstrieren, dass CCL17-Defizienz in APP/PS1-Mäusen, verglichen mit CCL17-suffizienten APP/PS1-Mäusen, mit vermindertem neuronalem Verlust sowie erhöhter

Mikrogliose bei unveränderter CCR2-Expression einzelner kultivierter Knochenmarkszellen einhergeht. Dies lässt eine in Abwesenheit von CCL17 vermehrte Migration von CCR2⁺ Zellen ins Gehirn der Mäuse sowie einen resultierenden neuroprotektiven Effekt vermuten. Ansätze für weitere Untersuchungen betreffend der Rezeptor-Liganden-Systeme CCL17/CCR4 und CCL2/CCR2 in APP/PS1-Mäusen sowie der Rekrutierung peripherer Zellen ins ZNS könnten Ansätze für weitere Erkenntnisse in der Alzheimer-Erkrankung sein. Insgesamt scheint die Neuroinflammation und speziell das CC-Chemokin CCL17 eine bedeutende Rolle in der Pathogenese und Progression zu spielen und ein potentieller Fokus für zukünftige Untersuchungen zu sein.

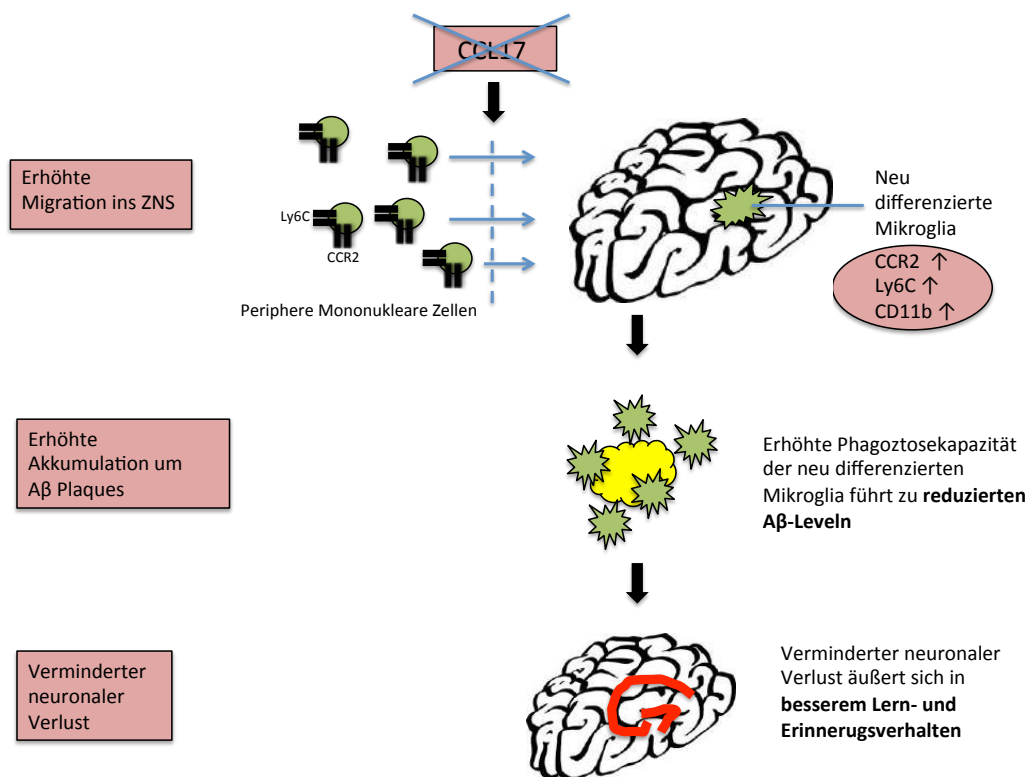


Abb. 21: Potentieller Immunmechanismus in CCL17-defizienten APP/PS1-Mäusen

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Genetik der Alzheimer Demenz	11
Tab. 2: Allgemeine Laborgeräte	25
Tab. 3: Verbrauchsmaterial	26
Tab. 4: Primärantikörper.....	27
Tab. 5: Sekundärantikörper.....	27
Tab. 6: Primer.....	27
Tab. 7: Lösungen, Chemikalien, Kits.....	28
Tab. 8: Puffer und Medien.....	29
Tab. 9: Schritte der PCR	31

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Pathologie der Alzheimer Demenz	9
Abb. 2: Pathomechanismus der Alzheimer Demenz.....	10
Abb. 3: Heterogenität der Monozyten und Makrophagen.....	13
Abb. 4: Entwicklung und Differenzierung von Makrophagen.....	15
Abb. 5: Klassische und alternative Aktivierung von Makrophagen.....	16
Abb. 6: Aktivierung eines Chemokin-Rezeptors.....	18
Abb. 7: Ergebnisse des verhaltensbiologischen Tests.....	21
Abb. 8: Manders Koeffizient	33
Abb. 9: Quantifizierung NeuN-positiver hippocampaler Neuronen.....	37
Abb. 10: Astrozytose in Hippocampus und Cortex.....	39
Abb. 11: Mikrogliose in Hippocampus und Cortex	40
Abb. 12: Kolokalisation CD11b und Thioflavin (weißer Pfeil).....	42
Abb. 13: CCR2-Immunfluoreszenz.....	44
Abb. 14: CCR2 Immunfluoreszenz.....	45
Abb. 15: Durchflusszytometrische Darstellung von Zellen des peripheren Blutes	47
Abb. 16: Durchflusszytometrische Bestimmung der CCR2 Expression.....	47
Abb. 17: Die Abhängigkeit der CCR2-Expression auf WT-Monozyten vom Reifestadium	48
Abb. 18: Vergleichende Histogramme der CCR2-Expression auf unstimulierten und LPS-stimulierten Knochenmarkszellen	49
Abb. 19: Modulation der CCR2-Expression	50
Abb. 20: Regelkreis der monozytären Reaktion auf Inflammation	58
Abb. 21: Potentieller Immunmechanismus in CCL17-defizienten APP/PS1-Mäusen	61

9. Literaturverzeichnis

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strommeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000; 21: 383–421

Akiyama H, Kondo H, Mori H, Kametani F, Nishimura T, Ikeda K, Kato M, McGeer PL. The amino-terminally truncated forms of amyloid beta-protein in brain macrophages in the ischemic lesions of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 1996; 219: 115–118

Alferink J, Lieberam I, Reindl W, Behrens A, Weiss S, Hüser N, Gerauer K, Ross R, Reske-Kunz AB, Ahmad-Nejad P, Wagner H, Förster I. Compartmentalized production of CCL17 in vivo: strong inducibility in peripheral dendritic cells contrasts selective absence from the spleen. *J Exp Med* 2003; 197: 585–599

Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Zeitschrift für Psychiatr* 1907; 146–148

Baron R, Harpaz I, Nemirovsky A, Cohen H, Monsonogo A. Immunity and neuronal repair in the progression of Alzheimer's disease: A brief overview. *Exp Gerontol* 2007; 42: 64–69

Bentahir M, Nyabi O, Verhamme J, Tolia A, Horré K, Wiltfang J, Esselmann H, De Strooper B. Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem* 2006; 96: 732–742

Bolmont T, Haiss F, Eicke D, Radde R, Mathis CA, Klunk WE, Kohsaka S, Jucker M, Calhoun ME. Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J Neurosci* 2008; 28: 4283–4292

Bose S, Cho J. Role of chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in neurodegenerative diseases. *Arch Pharm Res* 2013; 36: 1039–1050

Butovsky O, Koronyo-Hamaoui M, Kunis G, Ophir E, Landa G, Cohen H, Schwartz M. Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:11784–11789

Carrera I, Etcheverría I, Li Y, Fernández-novoa L, Lombardi V, Vigo C, Palacios HH, Benberin V V, Cacabelos R, Aliev G. Immunocytochemical Characterization of Alzheimer Disease Hallmarks in APP / PS1 Transgenic Mice Treated with a New Anti-Amyloid- Vaccine. *Biomed Res Int* 2013; 1-12

Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause KH. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 2005; 48: 16–42

Cole SL, Vassar R. The Role of Amyloid Precursor Protein Processing by BACE1 , the β -Secretase, in Alzheimer Disease. *J Biol Chem* 2008; 2: 8–11

Conductier G, Blondeau N, Guyon A, Nahon J-L, Rovère C. The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. *J Neuroimmunol* 2010; 224: 93–100

DGPPN und DGN. S3-Leitlinie “Demenzen.” 2009

Double KL, Halliday GM, Krill JJ, Harasty JA, Cullen K, Brooks WS, Creasey H, Broe GA. Topography of brain atrophy during normal aging and alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging Elsevier*; 1996; 17: 513–521

Duce JA, Tsatsanis A, Cater MA, James SA, Robb E, Wikke K, Leong SL, Perez K, Johanssen T, Mark A, Cho H, Galatis D, Moir RD, Masters CL, Mclean C, Tanzi RE, Cappai R, Barnham KJ, Ciccotosto D, Rogers JT, Bush AI. An iron-export ferroxidase activity of β -amyloid protein precursor is inhibited by zinc in Alzheimer’s Disease. *Cell* 2011; 142: 857–867

Dunn KW, Kamocka MM, McDonald JH. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am. J Physiol Cell Physiol* 2011; 300: 723–742

Fjell AM, Walhovd KB, Fennema-Notestine C, McEvoy LK, Hagler DJ, Holland D, Brewer JB, Dale AM. One-year brain atrophy evident in healthy aging. *J Neurosci* 2009; 29: 15223–15231

Frackowiak J, Wisniewski HM, Wegiel J, Merz GS, Iqbal K, Wang KC. Ultrastructure of the microglia that phagocytose amyloid and the microglia that produce beta-amyloid fibrils. *Acta Neuropathol* 1992; 84: 225–233

Gaëlle N, Rivest S. Review A deficiency in CCR 2 + monocytes : the hidden side of Alzheimer ’ s disease. *J Mol Cell Biol* 2013; 5: 284–293

Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, Purcell SM, Betensky R a., Raju S, Prada C, Greenberg SM, Bacskai BJ, Frosch MP. Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 2006; 24: 516–524

Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Ciocca A, Campisi L, Narni-Mancinelli E, Lauvau G. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol* 2008; 86: 398–408

Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity Elsevier* 2003; 19: 71–82

Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immun Rev Elsevier Inc* 2010; 32: 593–604

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 953–964

Götz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 532–544

Grathwohl SA, Kälin RE, Bolmont T, Prokop S, Winkelmann G, Kaeser SA, Odenthal J, Radde R, Eldh T, Gandy S, Aguzzi A, Staufenbiel M, Mathews PM, Wolburg H, Heppner FL, Jucker M. Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia. *Nat Neurosci* 2009; 12: 1361–1363

Heneka MT, O'Banion MK. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 2007; 184: 69–91

Horuk R. Chemokine receptors Cytokine Growth Factor. *Rev Elsevier* 2001; 12: 313–335

Istl CLM, Othacher SAR, Edermann BIL, Urt KBU. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; 94: 13287–13292

De Jager C a. Critical levels of brain atrophy associated with homocysteine and cognitive decline. *Neurobiol Aging Elsevier Ltd* 2014; 35: 1–5

Katakura T, Miyazaki M, Kobayashi M, Herndon DN, Suzuki F. CCL17 and IL-10 as Effectors That Enable Alternatively Activated Macrophages to Inhibit the Generation of Classically Activated Macrophages. *J Immunol* 2004; 172: 1407–1413

Keene CD, Chang RC, Lopez-Yglesias AH, Shalloway BR, Sokal I, Li X, Reed PJ, Keene LM, Montine KS, Breyer RM, Rockhill JK, Montine TJ. Suppressed accumulation of cerebral amyloid {beta} peptides in aged transgenic Alzheimer's disease mice by transplantation with wild-type or prostaglandin E2 receptor subtype 2-null bone marrow. *Am J Pathol* 2010; 177: 346–354

El Khoury J, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C, Luster AD. Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med* 2007; 13: 432–438

El Khoury JB, Moore KJ, Means TK, Leung J, Terada K, Toft M, Freeman MW, Luster AD. CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J Exp Med* 2003; 197: 1657–1666

- Khurana R, Coleman C, Ionescu-Zanetti C, Carter SA, Krishna V, Grover RK, Roy R, Singh S. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J Struct Biol* 2005; 151: 229–238
- Kiyota T, Ingraham KL, Swan RJ, Jacobsen MT, Andrews SJ, Ikezu T. AAV serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP+PS1 mice. *Gene Ther* 2012; 19: 724–733
- Krauthausen M, Kummer MP, Zimmermann J, Reyes-irisarri E, Terwel D, Bulic B, Heneka MT, Müller M. CXCR3 promotes plaque formation and behavioral deficits in an Alzheimer ' s disease model. *J Clin Invest* 2015; 125: 365–378
- Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1992; 48: 405–415
- Li M, Ransohoff RM. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol* 2008; 84: 116–131
- Li X, Bai L, Yang Y, Luo W, Hu W, Chen J, Mao C, Liu C. Effects of IL-6 secreted from astrocytes on the survival of dopaminergic neurons in lipopolysaccharide-induced inflammation. *Neurosci Res* 2009; 65: 252–258
- Llorens-Martín M, Blazquez-Llorca L, Benavides-Piccione R, Rabano A, Hernandez F, Avila J, DeFelipe J. Selective alterations of neurons and circuits related to early memory loss in Alzheimer's disease. *Front Neuroanat* 2014; 8: 38
- Lucin KM, Wyss-Coray T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little ? *Neuron* 2009; 64: 110–122
- Lue LF, Rydel R, Brigham EF, Yang LB, Hampel H, Murphy GM, Brachova L, Yan SD, Walker DG, Shen Y, Rogers J. Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia* 2001;35:72–79
- Majumdar A, Chung H, Dolios G, Wang R, Asamoah N, Lobel P, Maxfield FR. Degradation of fibrillar forms of Alzheimer's amyloid beta-peptide by macrophages. *Neurobiol. Aging* 2008; 29: 707–715
- Malm TM, Koistinaho M, Pärevalo M, Vatanen T, Ooka A, Karlsson S, Koistinaho J. Bone-marrow-derived cells contribute to the recruitment of microglial cells in response to β -amyloid deposition in APP/PS1 double transgenic Alzheimer mice. *Neurobiol Dis* 2005; 18: 134–142
- McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 1996;47:425–432.
- Medina M, Avila J. The role of extracellular Tau in the spreading of neurofibrillary pathology. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 1-7

Meyer-Luehmann M, Mielke M, Spires-Jones TL, Stoothoff W, Jones P, Bacskai BJ, Hyman BT. A reporter of local dendritic translocation shows plaque related loss of neural system function in APP transgenic mice. *J Neurosci* 2009; 29: 12636–12640

Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch U-K, Mack M, Heikenwalder M, Brück W, Priller J, Prinz M. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1544–1553

Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Farías GA, Maccioni RB. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 1-9

Neitzert KA. The role of the CC chemokine CCL17 in a mouse model of Alzheimer's disease. Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn 2012

Neniskyte U, Neher JJ, Brown GC. Neuronal death induced by nanomolar amyloid β is mediated by primary phagocytosis of neurons by microglia. *J Biol Chem* 2011; 286: 39904–39913

Poppensieker K, Otte DM, Schürmann B, Limmer A, Dresing P, Drews E, Schumak B, Klotz L, Raasch J, Mildner A, Waisman A, Scheu S, Knolle P, Förster I, Prinz M, Maier W, Zimmer A, Alferink J. CC chemokine receptor 4 is required for experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating GM-CSF and IL-23 production in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 3897–3902

Priller J, Flügel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernández-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 2001; 7: 1356–1361

Prince M, Matthew P, Guerchet M. World Alzheimer Report 2013. Journey of Caring Alzheimer's Dis Int 2013

Prinz M, Priller J. Tickets to the brain: role of CCR2 and CX3CR1 in myeloid cell entry in the CNS. *J Neuroimmunol Elsevier BV* 2010; 224: 80–84

Pulliam L, Sun B, Rempel H, Martinez PM, Hoekman JD, Rao RJ, Frey WH, Hanson LR. Intranasal tat alters gene expression in the mouse brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 2007; 2: 87–92

Rezai-Zadeh K, Gate D, Gowing G, Town T. How to get from here to there: macrophage recruitment in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2011; 8: 156–163

Rickard AJ, Young MJ. Corticosteroid receptors, macrophages and cardiovascular disease. *J Mol Endocrinol* 2009; 42: 449–459

Rodríguez JJ, Noristani HN, Hilditch T, Olabarria M, Yeh CY, Witton J, Verkhratsky A. Increased densities of resting and activated microglia in the dentate gyrus follow senile plaque formation in the CA1 subfield of the hippocampus in the triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett Elsevier Ireland Ltd*; 2013; 552: 129–134

Rogers J, Lue LF. Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid β -peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2001; 39: 333–340

Rogers J, Strohmeyer R, Kovelowski CJ, Li R. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid β peptide. *Glia* 2002; 40: 260–269

Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A Review : Inflammatory Process in Alzheimer ' s Disease, Role of Cytokines. *Scientific World Journal*. 2012

Sawyer AJ, Tian W, Saucier-Sawyer JK, Rizk PJ, Saltzman WM, Bellamkonda R V, Kyriakides TR. The effect of inflammatory cell-derived MCP-1 loss on neuronal survival during chronic neuroinflammation. *Biomaterials* 2014; 35: 6698–6706

Selkoe DJ. Alzheimer ' s Disease : Genes , Proteins , and Therapy. *Physiol Rev* 2001; 81: 741–767

Semple BD, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J Cereb Blood Flow Metab Nature Publishing Group*. 2010; 30: 459–473

Silbert LC. Does statin use decrease the amount of Alzheimer disease pathology in the brain? *Neurology* 2007; 9: 8-11

Simard AR, Rivest S. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J* 2004; 18: 998–1000

Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien J-P, Rivest S. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 2006; 49: 489–502

Specht S, Frank JK, Alferink J, Dubben B, Layland LE, Denece G, Bain O, Förster I, Kirschning CJ, Martin C, Hoerauf A. CCL17 controls mast cells for the defense against filarial larval entry. *J Immunol* 2011; 186: 4845–4852

Stalder AK, Ermini F, Bondolfi L, Krenger W, Burbach GJ, Deller T, Coomaraswamy J, Staufenbiel M, Landmann R, Jucker M. Invasion of hematopoietic cells into the brain of amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 2005; 25: 11125–11132

Stutte S, Quast T, Gerbitzki N, Savinko T, Novak N, Reifenberger J, Homey B, Kolanus W, Alenius H, Förster I. Requirement of CCL17 for CCR7- and CXCR4-dependent migration of cutaneous dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 8736–8741

SVI. Understanding the colocalization coefficients [Internet]. <https://svi.nl/ColocalizationTheory>. [cited 2014 Sep 28]. Available from: <http://www.svi.nl/ColocalizationCoefficients>

Takahashi H, Brasnjevic I, Dickstein DL. Hippocampal interneuron loss in an APP / PS1 double mutant mouse and in Alzheimer ' s disease. *Brain Struct Funct* 2010; 214: 145–160

Thinakaran G, Koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 2008; 283: 29615–29619

Tsou C-L, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 2007; 117: 902–909

Vijayanand P, Durkin K, Hartmann G, Morjaria J, Seumois G, Staples KJ, Hall D, Bessant C, Bartholomew M, Howarth PH, Friedmann PS, Djukanovic R. Chemokine receptor 4 plays a key role in T cell recruitment into the airways of asthmatic patients. *J Immunol* 2010; 184: 4568–4574

Walter J, van Echten-Deckert G. Cross-talk of membrane lipids and Alzheimer-related proteins. *Mol Neurodegener* 2013; 8: 1-12

Weber C, Meiler S, Döring Y, Koch M, Drechsler M, Megens RTA, Rowinska Z, Bidzhekov K, Fecher C, Ribechini E, van Zandvoort MAMJ, Binder CJ, Jelinek I, Hristov M, Boon L, Jung S, Korn T, Lutz MB, Förster I, Zenke M, Hieronymus T, Junt T, Zerneck A. CCL17-expressing dendritic cells drive atherosclerosis by restraining regulatory T cell homeostasis in mice. *J Clin Invest* 2011; 121: 2898–2910

Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi S a, Wang R, Pietrzik CU, Findlay K a, Smith TE, Murphy MP, Bulter T, Kang DE, Marquez-Sterling N, Golde TE, Koo EH. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 2001; 414: 212–216

Wisniewski HM, Barcikowska M, Kida E. Phagocytosis of beta/A4 amyloid fibrils of the neuritic neocortical plaques. *Acta Neuropathol* 1991; 81: 588–590

Wyss-Coray T, Rogers J. Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a006346

Xia M, Hyman B. Chemokines / chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer ' s disease . PubMed Commons. *J Neurovirol* 1999; 5: 32–41

Zhang XM ZJ. Kainic Acid-Induced Neurotoxicity: Targeting Glial Responses and Glia-Derived Cytokines - Open-i. *Curr Neuropharmacol* 2011; 9: 388–398

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines : A New Classification System and Their Role in Immunity. *Immunity* 2000; 12: 121–127

10. Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die mir die Arbeit an diesem Projekt und die Fertigstellung der Dissertation ermöglicht haben.

Zunächst möchte ich mich bei Dr. med. Judith Alferink und meinem Doktorvater Prof. Andreas Zimmer und für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und die großzügige Unterstützung bedanken. Durch die Möglichkeit, Einblicke in die neurowissenschaftliche Forschung zu erhalten, konnte ich viele wertvolle Erfahrungen sammeln.

Mein Dank für die langjährige Betreuung gilt neben der gesamten AG Alferink besonders Kim Neitzert, die mir geduldig bei den Experimenten, der Auswertung und der Verfassung dieser Arbeit mit Ratschlägen zur Seite stand.

Für die technische und wissenschaftliche Hilfe bei der Umsetzung der Färbungen, Zellkulturen und der Statistik möchte ich mich ebenfalls bei Karola Poppensieker, Ramona Lundt und Anne Schmöle bedanken. Weiterhin richtet sich mein Dank auch an alle weiteren Mitglieder des Instituts für Molekulare Psychiatrie für die angenehme gemeinsame Zeit im Labor.

Schließlich danke ich herzlich meiner Familie und meinen Freunden, die mich während des Studiums und der Arbeit an diesem Projekt jederzeit großartig unterstützt haben.