

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin und dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Rolle von CCAAT/enhancer-binding protein delta (C/EBPD) in
neurodegenerativen Erkrankungen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Manuel Lutzenberger
(aus Berlin)

Datum der Promotion: 26.02.2016

Inhaltsverzeichnis

0	Abstrakt/ Abstract	7
0.1	Abstrakt	7
0.2	Abstract	8
1	Einleitung	9
1.1.	Neurodegenerative Proteinopathien	9
1.2.	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE)	9
1.2.1.	Aufbau, Prozessierung und Funktion des Prionproteins PrP^C	10
1.2.2.	Die infektiöse Isoform - PrP^{Sc}	11
1.3.	Alzheimer-Krankheit (Morbus Alzheimer, Alzheimer's disease [AD]) ..	12
1.4.	Amyloid Precursor Protein (APP)- und Präsenilin 1 (PS1)-Mutationen	15
1.5.	Neuroinflammation	15
1.6.	Mikroglia	16
1.6.1.	Mikroglia in AD und Prionerkrankungen	17
1.7.	Astrozyten	18
1.8.	Astrozyten in AD und Prionerkrankungen	18
1.9.	Kommunikation zwischen Astrozyten und Mikroglia	19
1.10.	CCAAT/enhancer-binding protein delta (C/EBPD)	20
1.11.	Zielsetzung der Arbeit	24
2	Material	25
2.1.	Geräte	25
2.2.	Tier-/ Mausmodelle	26
2.2.1.	Primer für die Genotypisierung	26
2.3.	Verbrauchsmaterialien, Medien und Lösungen für die Proteinbiochemie-und Immunhistochemie	26
2.3.1.	Antikörper und Immunreagenzien	29
2.4.	Verbrauchsmaterialien, Medien und Lösungen für die Molekularbiologie	30

2.4.1. Bakterienstamm	31
2.4.2. Plasmide	32
2.4.3. TaqMan-Sonden und Primer für die Real-Time PCR.....	32
2.5. Verbrauchsmaterialien, Medien und Lösungen für die Zellkultur	33
2.5.1. Zelllinie	34
2.5.2. Wachstumsmedium für die U-373 MG Zelllinie	34
2.5.3. Einfriermedium für die U-373 MG Zelllinie.....	34
3 Methoden	35
3.1. Mausmodelle für AD und Prionerkrankungen	35
3.1.1. AD-Modell	35
3.1.2. Prion-Modell.....	35
3.2. Verhaltensstudien/ Nestbauaktivität/ Gewichtsmessung	36
3.3. Histologische und Immunhistochemische Methoden	37
3.3.1. Gewebefixierung.....	37
3.3.2. Anfertigung von Gewebeschnitten.....	37
3.3.3. Anfertigung von Hämalaun- Eosin (HE)- Übersichtsfärbungen.....	37
3.3.4. Immun-/ histochemische Färbemethoden an Paraffinschnitten	38
3.3.4.1. Bestimmung des Astrozyten-Markers GFAP	38
3.3.4.2. Bestimmung des Mikroglia-Marker Aif1/ Iba-1	39
3.3.4.3. Nachweis von A β - und Amyloid-Plaques mittels Antikörper und Kongorot-Färbung	40
3.3.4.4. Paraffin-Embedded Tissue (PET)-Blot.....	41
3.4. Proteinbiochemische Methoden.....	42
3.4.1. Extraktion von murinem A β -Protein aus Gehirn.....	42
3.4.1.1. Extraktion von PBS-löslichem A β	42
3.4.1.2. Extraktion von Ameisensäure-löslichem A β	42
3.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	43
3.4.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44

3.4.2.2. Schägger-Jagow Gele	44
3.4.2.3. Probenvorbereitung A β	45
3.4.2.4. Probenvorbereitung PrP ^{Sc}	45
3.4.3. Western Blot	46
3.4.3.1. Quantifizierung der mittels Western Blot detektierten Proteine	46
3.5. Molekularbiologische Methoden	47
3.5.1. DNA-Isolierung und Genotypisierung.....	47
3.5.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkultur und aus Hirngewebe..	47
3.5.3. Reinigung der Gesamt-RNA von genomischer DNA und Reverse Transkription.....	48
3.5.4. Expressionsanalysen mittels Real-Time PCR	49
3.5.5. Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	51
3.5.6. Plasmidisolierung.....	51
3.5.7. Restriktionsverdau und Gelelektrophorese von Plasmid-DNA	51
3.6. Zellkulturtechniken.....	51
3.6.1. Herstellung primärer, muriner Mixed-Glia-Zellkulturen	51
3.6.2. Proteinisolierung und Bestimmung der Proteinkonzentration.....	52
3.6.3. Kultivierung von U-373 MG Zellen	52
3.6.4. Passagieren von primären Mixed-Glia- und U-373 MG Zellen.....	52
3.6.5. Transfektion von U-373 MG Zellen.....	53
4 Ergebnisse.....	55
4.1. Untersuchungen der Rolle von C/EBPD im AD-Modell	55
4.1.1. Gewichtsunterschiede im AD-Modell.....	55
4.1.2. Nestbauaktivität im AD-Modell	56
4.1.3. Plaques (A β -Plaques/ Amyloid-Plaques) im AD-Modell.....	57
4.1.3.1. Histochemie	58
4.1.3.2. Western Blot.....	62

4.1.4. Expressionsanalyse ausgewählter Gene, die an der Beseitigung und Degradation von A β beteiligt sind	64
4.1.5. Astrozytose im AD-Modell	65
4.1.5.1. Immunhistochemie	65
4.1.5.2. Real-Time PCR	67
4.1.5.3. Western Blot	67
4.1.6. Mikrogliose im AD-Modell	68
4.1.6.1. Immunhistochemie	69
4.1.6.2. Real-Time PCR	70
4.1.6.3. Western Blot	71
4.1.7. Expressionsanalysen C/EBPD-regulierter Gene im AD-Modell	72
4.2. Untersuchungen der Rolle von C/EBPD im Prion-Modell	73
4.2.1. Überlebenszeit im Prion-Modell	73
4.2.2. PrP ^{Sc} -Ablagerungen im Prion-Modell	74
4.2.2.1. Western Blot von PrP ^{Sc}	74
4.2.2.2. Paraffin-embedded tissue (PET)-Blot	76
4.2.3. Astrozytose	77
4.2.3.1. Immunhistochemie	77
4.2.3.2. Real-Time PCR	79
4.2.3.3. Western Blot	79
4.2.4. Mikrogliose	80
4.2.4.1. Immunhistochemie	81
4.2.4.2. Real-Time PCR	82
4.2.5. Expressionsanalysen C/EBPD-regulierter Gene im Prion-Modell	83
4.3. Untersuchungen der Rolle von C/EBPD in Zellkulturmodellen	84
4.3.1. Expressionsanalysen C/EBPD-regulierter Gene im murinen Mixed-Glia- Zellkulturmodell	84
4.3.1.1. Real-Time PCR	84

4.3.1.2. Western Blot	85
4.3.2. Untersuchungen der Rolle von C/EBPD im humanen Glioblastoma-Zellkulturmodell	86
5 Diskussion	87
6 Verzeichnisse	94
6.1. Abkürzungsverzeichnis	94
6.2. Abbildungsverzeichnis.....	97
6.3. Literaturverzeichnis	99
7 Anhang	113
7.1. Eidesstattliche Versicherung	113
7.2. Lebenslauf	115
7.3. Komplette Publikationsliste	119
7.4. Danksagung	119

0 Abstrakt/ Abstract

0.1 Abstrakt

Inflammatorische Prozesse sind ein wesentlicher Teil des Krankheitsgeschehens bei chronisch neurodegenerativen Proteinopathien wie Morbus Alzheimer (AD)- und Prionerkrankungen. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen astrozytären Überexpression des Transkriptionsfaktors CCAAT/enhancer-binding protein delta (C/EBPD) während dieser Erkrankungen, wurde die Rolle dieses Transkriptionsfaktors in murinen Modellen für AD bzw. Prionerkrankungen weiter untersucht.

Aus diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass eine Defizienz für C/EBPD weder im AD- noch im Prion-Modell einen offensichtlichen Einfluss auf die untersuchten klinischen Symptome (Nestbauaktivität, Gewichtsunterschiede, Überlebenszeiten) hatte. Zudem war in beiden Modellen die mit der Erkrankung assoziierte Gliose auch bei Defizienz von C/EBPD unverändert. Demgegenüber zeigten APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäuse im Vergleich zu APP/PS1-Mäusen signifikant erhöhte Plaqueablagerungen, obwohl die Expression des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) und die Expression von Genen, die am Beta-Amyloid(A β)-Transport bzw. dessen Abbau beteiligt sind, nicht verändert waren. Im Gegensatz dazu waren im Prion-Modell zwischen Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)- und Kontrollmäusen keine Unterschiede bezüglich der Ablagerung von fehlgefaltetem Prionprotein PrP^{Sc} festzustellen.

Über einen Vergleich von C/EBPD^(-/-)- bzw. Wildtyp(WT)-Mixed-Glia-Zellkulturen wurde eine starke Abhängigkeit der mRNA-Expression der Gene Serum amyloid A 3 (*Saa3*), chemokine (C-X-C motif) ligand (*Cxcl*) 9, Ceruloplasmin (*Cp*) sowie der Komplementkomponente C3 (*C3*) von C/EBPD festgestellt. In Hirngewebe von C/EBPD-defizienten Mäusen war sowohl im AD- als auch im Prion-Modell übereinstimmend die Expression von *C3* und *Saa3* signifikant vermindert. Umgekehrt und dazu passend führte die Transfektion einer humanen Glioblastoma-Zelllinie (U-373 MG) mit einem C/EBPD-Expressionsvektor unter anderem zu einem starken Anstieg der *C3* mRNA-Expression.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass eine C/EBPD-Defizienz die Plaquebelastung in einem murinen AD-Modell erhöht. Weiterhin konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass C/EBPD im Amyloid-belasteten Gewebe des Zentralnervensystem (ZNS) ein wichtiger Aktivator für die Expression von Akut-Phase-Genen wie beispielsweise *C3* ist.

0.2 Abstract

Alzheimer's disease (AD) and prion diseases carry a significant inflammatory component. Based on the astrocytic overexpression of the transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein delta (C/EBPD) during these diseases the role of this transcription factor was further investigated in murine models for AD and prion diseases.

Ablation of C/EBPD had neither in the AD model (APP/PS1 double transgenic mice) nor in the prion model (scrapie-infected C57BL/6 mice) an influence on overt clinical symptoms (Nest building activity, weight differences, survival time). Moreover, the absence of C/EBPD did not affect the extent of the disease-related gliosis. However, C/EBPD-deficient APP/PS1 double transgenic mice displayed significantly increased amyloid beta (A β) plaque burdens while amyloid precursor protein (APP) expression and expression of genes involved in A β transport and turnover remained unchanged. In contrast, in the prion model the C/EBPD-deficiency did not affect deposition of misfolded prion protein PrP^{Sc}.

Gene expression analysis in mixed glia cultures demonstrated a strong dependency of *Saa3*, *Cxcl9*, *Cp*, and complement component *C3* mRNA expression on the presence of C/EBPD. *C3* and *Saa3* mRNA levels were also significantly lower in brain tissue of C/EBPD-deficient mice in the AD- as well as in the prion-model. Vice versa and in agreement with these observations, *C3* mRNA expression in a glioblastoma cell line (U-373 MG) increased strongly upon transfection with a C/EBPD expression vector. Taken together, these data indicate that a C/EBPD-deficiency leads to increased A β plaque burden in AD model mice. Furthermore, as shown *in vivo* and *in vitro*, C/EBPD is an important driver of the expression of acute phase response genes like *C3* in the amyloid-affected central nervous system (CNS).

1 Einleitung

1.1. Neurodegenerative Proteinopathien

Unter neurodegenerativen Proteinopathien werden Erkrankungen des Nervensystems zusammengefasst, die ursächliche Störungen in der Proteinverarbeitung und -abbau mit intra- oder extrazellulärer Ablagerung fehlgefalteter Proteinpartikel aufweisen. Typische Vertreter der neurodegenerativen Proteinopathien sind unter anderem die Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE), Alzheimer-, Parkinson- und Huntington-Krankheit (Christen, 2002; Aguzzi, 2006; Bayer, 2013; Golde et al., 2013). Im Hinblick auf die Entstehung der Proteinopathien werden sie in erbliche (hereditäre), spontan (sporadisch) auftretende und übertragbare (infektiöse) Erkrankungen des ZNS unterteilt. Ein wesentliches Hauptmerkmal dieser neurodegenerativen Proteinopathien, z.B. im Hinblick auf die Alzheimer-Krankheit (AD), ist die Bildung von unlöslichen Fibrillen mit einer β -Faltblattstruktur. Durch die Ablagerung dieser fehlgefalteten Proteine, die eine direkt oder indirekt schädigende Wirkung auf Synapsen und Neuronen haben, kommt es im weiteren Verlauf zu inflammatorischen Prozessen. Hierbei werden geschädigte oder abgestorbene Nervenzellen die Immunzellen des Gehirns (Astrozyten und Mikroglia) aktiviert, welche wiederum zur Neuronenschädigung beitragen können. Aufgrund des fortschreitenden Verlustes von Nervenzellen ordnet man diese Proteinopathien auch den neurodegenerativen Erkrankungen zu (Jellinger, 2005).

1.2. Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE)

Die TSE, auch Prionerkrankungen genannt, umfassen eine Gruppe von spontan entstehenden, erblichen sowie auch infektiösen Proteinopathien. Hierzu gehören u.a. die Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJK) und Kuru beim Menschen, die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind und Scrapie (Traberkrankheit) bei Schaf & Ziege (Jin et al., 2007). Auslöser dieser Erkrankung ist die „Umfaltung“/ Fehlfaltung eines körpereigenen Proteins (zelluläres Prionprotein PrP^C) in die Proteinase K-resistente Isoform PrP^{Sc} (Prusiner, 1991; Prusiner, 1998; Jin et al., 2007; Huzarewich et al., 2010). Der Begriff Prion wurde von Stanley B. Prusiner geprägt, der ihn von dem Begriff „proteinaceous infectious particle“ (proteinartiger, infektiöser Partikel) ableitete. Im Jahr 1982 stellte Prusiner seine Protein-only-Hypothese auf, ein neues infektionsbiologisches Modell demzufolge der TSE-Erreger, das fehlgefaltete Prionprotein, das alleinige infektiöse Agens darstellt (Prusiner, 1982). Dass die infektiösen Partikel frei von Nukleinsäuren sind und gegen jegliche Methoden, die Nukleinsäuren zerstören würden, resistent waren, konnte im Jahr 1987 gezeigt werden (Bellinger-Kawahara et al., 1987(a); Bellinger-Kawahara et al., 1987(b)). Neben den Ablagerungen des PrP^{Sc} sind weitere histologische Charakteristika der Erkrankung die

Aktivierung von Gliazellen (Astrozytose und Mikrogliose) und eine schwammartige (spongiforme) Veränderung des Hirngewebes (Aguzzi et al., 2013). Die TSE zeichnet sich im Gegensatz zur Alzheimer-Krankheit durch eine ungewöhnlich kurze Inkubationszeit aus und endet immer tödlich. Es gibt weder eine präventive Schutzimpfung noch eine Therapie. Auch eine eindeutige Diagnose ist erst *post mortem* möglich.

1.2.1. Aufbau, Prozessierung und Funktion des Prionproteins PrP^C

Beim Prionprotein wird die gesunde, zelluläre Form, PrP^C, von einer pathologischen Isoform, PrP^{Sc}, unterschieden. Bei dem zellulären Prionprotein PrP^C handelt es sich um ein Glykoprotein, das auf der Zelloberfläche von nahezu allen Zelltypen, vorwiegend aber von Neuronen und Gliazellen des Gehirns exprimiert wird (Basler et al., 1986; Tobler et al., 1996). Allgemein werden dem PrP^C Funktionen wie die Lymphozyten-Aktivierung, neuronale Entwicklung und Differenzierung sowie für die Zelladhäsion zugeschrieben (Mobley et al., 1988; Cashman et al., 1990; Manson et al., 1992). Das primäre Translationsprodukt des Prionproteins umfasst vor der Prozessierung und den posttranslationalen Modifikationen im endoplasmatischen Retikulum (ER) 253 Aminosäuren (AS) beim Menschen und 254 AS bei der Maus (Kretzschmar et al., 1986). Während der Biosynthese und im Zuge der posttranslationalen Modifikationen des humanen Prionproteins im ER wird zunächst N-terminal ein 22 AS langes Signalpeptid vom primären Translationsprodukt abgespalten (Hope et al., 1986; Harris et al., 1993). Anschließend wird am C-Terminus des Proteins ein 23 AS umfassender Rest durch einen Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anker ersetzt, worüber das PrP^C auf der Zelloberfläche verankert wird (Stahl et al., 1987). Des Weiteren wird über die Cysteinreste an den Positionen 179 und 214 eine Disulfidbrücke ausgebildet (Stahl et al., 1991). Glykosylierungen erfolgen an den Positionen 181 und 197 (siehe Abbildung 1) (Endo et al., 1989; Stahl et al., 1993).

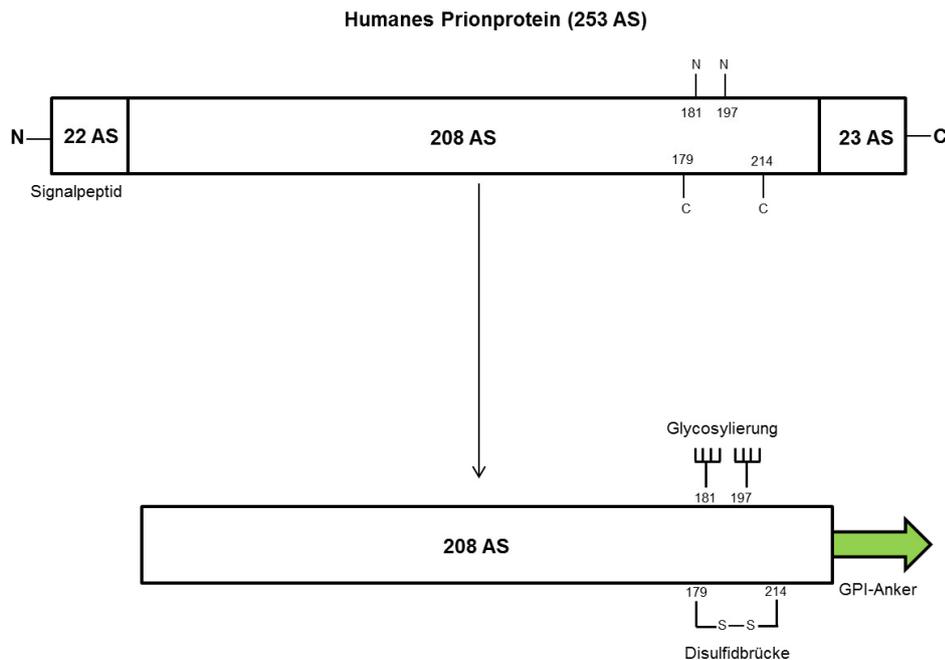


Abbildung 1 Darstellung der Prozessierung und posttranslationalen Modifikation des humanen Prionproteins PrP^C im endoplasmatischen Retikulum (ER) (Weissmann, 1994)

1.2.2. Die infektiöse Isoform - PrP^{Sc}

Worin liegen die Unterschiede zwischen dem zellulären Prionprotein PrP^C und dem infektiösen Amyloidprotein PrP^{Sc}? Beide Proteine besitzen die gleiche Aminosäuresequenz (Oesch et al., 1985), unterscheiden sich allerdings in der Sekundärstruktur. Dabei zeichnet sich das PrP^{Sc} durch einen erhöhten Anteil an β -Faltblattstrukturen (45 %) aus, wohingegen das PrP^C lediglich rund 3 % dieser β -Faltblattstrukturen aufweist, dafür aber überwiegend aus α -helikalen Strukturen (40 %) besteht (Pan et al., 1993; Stahl et al., 1993; Kretzschmar et al., 2000). Die unterschiedliche strukturelle Konformation führt dazu, dass das PrP^{Sc} wasserunlöslich ist und stärker zur Aggregation neigt sowie partiell resistent gegenüber Hitze, allgemein gebräuchlichen Desinfektionsmitteln und proteolytischem Abbau ist. Letzteres ist zugleich das bedeutendste Unterscheidungskriterium und betrifft die Stabilität gegenüber der Proteinase K (PK) (Hay et al., 1987; Saverioni et al., 2013). Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur Umwandlung weiterer PrP^C-Moleküle durch Interaktion mit PrP^{Sc}-Molekülen. Hierzu hat Prusiner für die Prion-Replikation ein Modell entwickelt, das sogenannte Heterodimer-Modell (Prusiner, 1991). Dabei beschreibt er die Anlagerung eines PrP^{Sc} Monomers an ein PrP^C Molekül, was zu dessen Umfaltung in die pathologische PrP^{Sc}-Konformation führt. Nach anschließender Dissoziation des entstandenen Homodimers stehen wieder zwei PrP^{Sc}-Moleküle zur weiteren Replikation zur Verfügung (Raeber et al., 1992). Bei oraler Aufnahme erfolgt die Ausbreitung von PrP^{Sc} vom Darm über das lymphatische Gewebe und das periphere Nervensystem in das ZNS (Beekes and McBride, 2007). Das Ausmaß und die Lokalisation der PrP^{Sc}-Ablagerungen sind dabei vom

verwendeten TSE-Stamm abhängig (DeArmond et al., 1997). Prion-Stämme sind durch eine Vielzahl von verschiedenen biologischen und biochemischen Eigenschaften charakterisiert. Dazu zählen unter anderem das Wirtsspektrum, die Übertragbarkeit und die Inkubationszeit, neuropathologische Veränderungen und die klinische Symptomatik in den tierexperimentellen Modellen sowie ihre unterschiedliche Resistenz gegenüber physikalischen und chemischen Inaktivierungsprozeduren (Groschup, 2006; Hörnlimann, 2006). Die Übertragbarkeit bzw. Speziesbarriere von Prion-Stämmen ist zudem von dem Agens (CJD, BSE, Scrapie, TME), der Spezies und möglicherweise dem Genotyp des Wirtstieres sowie der Dosis und der Route der Verabreichung abhängig (Hörnlimann, 2006; Löwer, 2006).

1.3. Alzheimer-Krankheit (Morbus Alzheimer, Alzheimer's disease [AD])

In der heutigen immer älter werdenden Gesellschaft sind die Demenzen ein bedeutendes Krankheitsbild, das nach derzeitigem Stand (2012) rund 26 Millionen Menschen weltweit betrifft. Schätzungen nach soll sich bis zum Jahre 2050 die Anzahl der Betroffenen sogar vervierfachen (Selkoe, 1991; Yankner and Mesulam, 1991; Hampel et al., 2010). Die AD ist dabei für rund 60-70 % aller Demenzfälle verantwortlich (Fratiglioni et al., 2000).

Bei der AD wird zwischen zwei Formen, der sporadischen und der familiären Form, unterschieden. Die sporadische Form (SAD) tritt bei ca. 95 % der Fälle auf, wohingegen die familiären Formen (FAD) nur etwa 5 % ausmachen (Hunter et al., 2013). Die sporadische Form der AD tritt typischerweise bei Patienten nach dem 65. Lebensjahr auf, während sich die familiären Formen aufgrund von Mutationen in den bestehenden Genen im Allgemeinen früher entwickeln.

Ein pathologisches Hauptmerkmal der AD ist die Bildung sogenannter β -Amyloid-Plaques (A β -Plaques). Bei A β handelt es sich um ein 40 bzw. 42 Aminosäuren langes Peptid, das bei der amyloiden Prozessierung des körpereigenen Amyloid-Precursor-Proteins (APP) entsteht. Bei dem APP handelt es sich um ein Typ-I Transmembranprotein, das aus einer langen N-terminalen Exodomäne und einer kürzeren zytoplasmatischen C-terminalen Domäne besteht (Kang et al., 1987). Das APP liegt auf dem Chromosom 21 und besitzt 19 Exons.

Durch alternatives Splicing können bis zu 10 verschiedene APP-Proteinvarianten entstehen. Die häufigste Isoform des APP-Proteins ist das APP695, es wird vorwiegend in neuronalen Gewebe exprimiert (Golde et al., 1990; Li et al., 1994; Li et al., 1999). Im Nervensystem spielt das APP bei der Synaptogenese und der synaptischen Plastizität eine wichtige Rolle. Es befindet sich beim Menschen in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) (Weidemann et al., 1989), der Niere, der Milz, im Herz und Nebennierengewebe (Selkoe et al., 1988) sowie in den Blutplättchen (Bush et al., 1990). Die proteolytische Prozessierung dieses

Membranproteins kann auf zweierlei Wegen ablaufen, dem amyloidogenen und dem nicht-amyloidogenen Weg (siehe Abbildung 2). Im nicht-amyloidogenen Weg wird das APP zunächst von der α -Sekretase geschnitten, wobei das freilösliche sAPP α , welches einen neuroprotektiven Effekt haben soll, sowie ein membranständiges C-terminales Fragment (C83) entstehen (Gralle et al., 2009). Dieses C83-Fragment wird wiederum von einem weiteren Enzym, der γ -Sekretase, gespalten. Dabei werden ein Peptid P3 und eine APP intrazelluläre Domäne (AICD) freigesetzt. Die genaue Funktion des P3-Peptids ist unklar. Es soll nach Erkenntnissen einiger Forscher nicht amyloidogen sein (Dickson, 1997), wohingegen *in vitro* Versuchen anderer Forscher beobachtet wurde, dass es eine β -Faltblattstruktur einnehmen kann und bei Verlust der Aminosäure (AS)-Peptide 1-16 zu einer verstärkten Aggregation neigt (Pike et al., 1995). Unklar bleibt die Bedeutung der P3-Peptid-Akkumulation in der AD und was ihre toxischen Eigenschaften betrifft (Dulin et al., 2008). Die neben dem P3-Peptid entstehende AICD besitzt einen regulatorischen Einfluss sowohl auf die Expression neurotoxischer als auch neuroprotektiver Gene (Beckett et al., 2012; Pardossi-Piquard and Checler, 2012).

Bei dem krankhaften, amyloidogenen Weg wird das APP zuerst von der β -Sekretase (*β -site APP cleaving enzyme 1*, BACE1) geschnitten, wobei wie beim nicht-amyloidogenen Weg ein lösliches Peptid, hier das sAPP β , entsteht. Das noch in der Membran verbleibende Fragment (C99) wird dann anschließend von der γ -Sekretase geschnitten. Dabei entstehen wiederum eine AICD sowie das A β -Peptid, je nach Schnittstelle 40 oder 42 AS lang (A β 40 und A β 42) (Golde et al., 1993; Evin and Weidemann, 2002; Gralle and Ferreira, 2007). Diese A β -Peptide lagern sich in amyloidogener Struktur in den Zellzwischenräumen als A β -Plaques ab. Dabei neigt das A β 42 stärker zur Aggregation als das 40 Aminosäuren lange A β 40 (Roher et al., 1993).

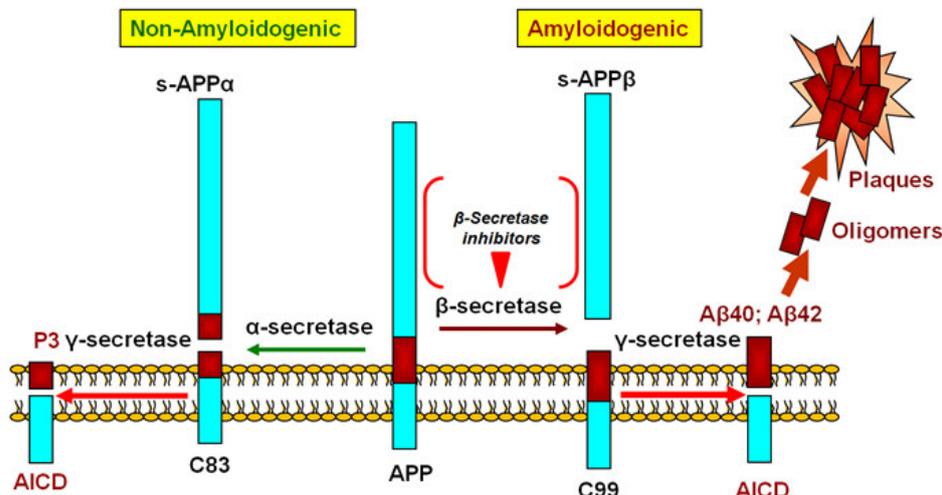


Abbildung 2 Dargestellt ist die proteolytische Prozessierung des Amyloid Precursor Proteins (APP). (Zhang, 2012)

Neben der endogenen Aβ-Produktion im Gehirn gibt es Transportsysteme über welche zusätzliches Aβ aus der Peripherie direkt aus dem Blut die Bluthirnschranke passieren kann und ins Gehirn gelangt. Bei den für den Transport verantwortlichen Proteinen handelt es sich um Transmembranrezeptoren, wobei das Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1) für den Efflux von Aβ aus dem Gehirn (Deane et al., 2009; Jaeger et al., 2009; Zlokovic et al., 2010) und Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE) (Deane et al., 2003; Deane et al., 2009; Deane et al., 2012; Kim et al., 2013) für den Influx aus der Peripherie in das Gehirn verantwortlich ist.

Ob diese Aβ-Plaques die Ursache des Neuronensterbens in den Gehirnen von AD-Patienten sind oder lediglich eine Begleiterscheinung, ist bis heute nicht geklärt. Der Amyloid-Hypothese nach sind die Amyloid-Plaques der Auslöser der im Rahmen der Alzheimer-Pathogenese stattfindenden Neurodegeneration, warum es zu begleitendem Neuronensterben und Neuroinflammation kommt (Selkoe, 1991; Hardy and Higgins, 1992; Hardy and Selkoe, 2002; Schliebs, 2005). Die Ablagerungen führen zu Beschädigungen der Synapsen und Neuronen, zum neuronalen Zelltod und zu Ausfällen der Zell-zu-Zell-Kommunikation sowie zu einer dauerhaften Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia (Hardy and Selkoe, 2002). Neuere Befunde verweisen jedoch darauf, dass lösliche Aβ-Oligomere (nicht Aβ-Plaques) als eigentliche toxische Faktoren angesehen werden müssen (Lue et al., 1999; McLean et al., 1999; Larson and Lesne, 2012).

Ein weiteres pathologisches Merkmal der AD ist die Bildung intrazellulärer neurofibrillärer Bündel (*neurofibrillary tangles*, NFT) aus aggregierten, phosphorylierten Tau-Proteinen (Grundke-Iqbal et al., 1986; Braak and Braak, 1991). Bei dem Tau-Protein handelt es sich um ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (Weingarten et al., 1975), welches je nach Isoform

bis zu 758 AS lang sein kann. Es besitzt eine stützende und stabilisierende Funktion und ist am korrekten Zusammenbau der Zytoskelettproteine (Mikrotubuli) beteiligt. Im hyperphosphorylierten Zustand neigt Tau zur Ausbildung von NFT, wodurch die stabilisierende Funktion für die Mikrotubuli verloren geht. NFT sind auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. der Parkinson-Erkrankung involviert (Ronald F. Pfeiffer, 2004).

1.4. Amyloid Precursor Protein (APP)- und Präsenilin 1 (PS1)-Mutationen

Die AD tritt spontan (SAD) oder auch in seltenen Fällen genetisch bedingt (familiäre AD, FAD) auf. Die FAD wird durch bestimmte Mutationen im APP-Gen verursacht. Dies geschieht in der Nähe der Schnittstellen der α - und β -Sekretasen oder in der kodierenden Sequenz für das Präsenilinprotein, das gemeinsam mit anderen Membranproteinen als Komplex die γ -Sekretase bildet.

Ein Beispiel für die Mutation des APP-Gens ist die schwedische Doppelmutation (APP_{swe}). Erstmals gefunden wurden diese Mutationen bei einer schwedischen Familie mit früh einsetzender FAD. Sie führten jeweils zu einem Aminosäureaustausch (missense mutation) an den APP-Positionen 595 (K595N) und 596 (M596L) in direkter Nachbarschaft zu der Schnittstelle der β -Sekretase (BACE1), welche als Hauptursache der gesteigerten A β -Produktion bei gleichzeitig verringerter P3-Produktion gilt. Hierdurch wird das Gleichgewicht zugunsten des amyloidogenen Wegs der APP-Prozessierung verschoben (Citron et al., 1992; Mullan et al., 1992).

Weitere Mutationen betreffen das Präsenilin-Gen (Präsenilin ist ein Bestandteil der Untereinheit der γ -Sekretase). Dies hat keinen Einfluss auf die gebildete Menge an A β , sondern beeinflusst das Verhältnis zwischen A β 40 und A β 42. Bei der Mutation PS1 Δ E9 des Präsenilin-1(PS1) handelt es sich um eine Deletion des Exons 9 im PS1-Gen, was zu einer vermehrten Bildung des A β 42 führt (Borchelt et al., 1996). Somit wird das Verhältnis von A β 40 zum amyloidogeneren A β 42 verschoben (Jankowsky et al., 2004). A β 42 neigt zu einer stärkeren Aggregation als A β 40, weshalb es den Hauptanteil von A β -Plaques bildet (Roher et al., 1993).

1.5. Neuroinflammation

Sowohl für die AD als auch für die TSE sind Amyloidablagerungen gefolgt von einer Neuroinflammation im Gehirn der betroffenen Patienten charakteristisch. Die Neuroinflammation ist in dessen durch eine Astrozytose und Mikrogliose sowie der Degeneration von Nervengewebe gekennzeichnet. Von aktivierten Gliazellen und oxidativem Stress ausgesetzten Neuronen produzierte pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine tragen direkt oder indirekt durch Verstärkung der Gliose und Zytotoxizität zur

Krankheitsentwicklung bei (Akiyama et al., 2000(b); Riemer et al., 2009). Darüber hinaus kommt es zur Aktivierung der Akut-Phase-Antwort und des Komplementsystems (Akiyama et al., 2000(a)). In der AD wird die Neuroinflammation als Antwort auf die Ablagerung der A β -Plaques und das Neuronensterben angesehen und kann zu einem späteren Stadium der Erkrankung durch eine Chronifizierung sogar als pathologisch relevanter Auslöser betrachtet werden. Häufig wird die Neuroinflammation auch als „zweischneidiges Schwert“ beschrieben, weil reaktive Astrozyten und aktivierte Mikroglia auf der einen Seite zum Abbau von A β beitragen (Koistinaho et al., 2004; Simard et al., 2006), auf der anderen Seite aber zytotoxische Substanzen produzieren, die den Krankheitsverlauf fördern (Akiyama et al., 2000(a); Akiyama et al., 2000(b)).

1.6. Mikroglia

Mikroglia sind residente Makrophagen des ZNS und stammen vermutlich von mesenchymal myeloiden Vorläuferzellen ab, die während der Embryogenese die Bluthirnschranke passieren und in das Gehirn migrieren, um dort zu Mikrogliapopulationen heranzureifen. (Streit et al., 2004; Chan et al., 2007; Ransohoff and Perry, 2009). Das ionisierte Calcium bindende Adaptermolekül 1 (Iba-1) wird als Markerprotein zur Identifizierung von Mikroglia genutzt (Perry et al., 2010). Durch das Fehlen von spezifischen Abstammungsmarkern sind die Subtypen von Mikroglia untereinander kaum zu unterscheiden.

Mikroglia sind sehr plastisch und zeigen unterschiedliche Phänotypen, abhängig z.B. vom Alter (Meyer-Luehmann et al., 2008; Streit et al., 2008) und der Hirnregion (de Haas et al., 2008) in der sie sich befinden. Dabei nehmen sie einen „ruhenden“ oder „aktivierten“ Zustand ein. In ihrem ruhenden Zustand zeichnen sich die Zellen morphologisch durch lange, verzweigte und dynamische Filopodien aus, die permanent die Umgebung nach schädlichen Substanzen bzw. Verletzungen des Gewebes absuchen. *In vivo* Mikroskopie-Studien von ruhenden Mikroglia konnten zeigen, dass die Zellen in der Lage sind, das Gehirn innerhalb weniger Stunden einmal vollständig zu durchqueren (Nimmerjahn et al., 2005). Der ruhende Zustand der Mikroglia wird u.a. dadurch erreicht, dass sie mit den auf der Zelloberfläche von Neuronen exprimierten Liganden interagieren (Ransohoff and Perry, 2009).

Der aktivierte Zustand der Mikroglia ist durch eine amöboide Morphologie mit kurzen Filopodien charakterisiert und wird u.a. durch chemische oder zellbasierte Signale herbeigeführt. Es wird angenommen, dass es nicht nur einen phänotypischen „aktivierten“ Zustand gibt, sondern die Aktivierung schrittweise erfolgt (Perry et al., 2010). Die verschiedenen phänotypischen Differenzierungsgrade werden in Bezug auf Zytokin- und Oberflächenrezeptorexpression bestimmt. Dabei werden die Mikroglia klassisch über Toll-Like-Rezeptoren (TLR) oder Interferon- γ aktiviert und exprimieren daraufhin pro-

inflammatorische Moleküle. Daneben sind Mikroglia auch zur Phagozytose fähig (Koenigsknecht-Talboo and Landreth, 2005; Chan et al., 2007; Pan et al., 2011).

1.6.1. Mikroglia in AD und Prionerkrankungen

Im gesunden Gehirn suchen die ruhenden Mikroglia die Umgebung nach schädlichen Substanzen bzw. Verletzungen des Gewebes ab und sind dabei in der Lage sich zu modifizieren und z.B. von ihrer Phagozytoseaktivität Gebrauch zu machen (Tremblay et al., 2011). Sowohl in der AD als auch Prionerkrankung werden Mikroglia von A β - (Koenigsknecht-Talboo and Landreth, 2005) und PrP^{Sc}-Ablagerungen (Marella and Chabry, 2004) angezogen und verändern daraufhin ihre Morphologie. Sie produzieren erhöhte Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen und reaktive Sauerstoffspezies [reactive oxygen species, (ROS)] (McGeer and McGeer, 1995; Frautschy et al., 1998; Bolmont et al., 2008; Rubio-Perez and Morillas-Ruiz, 2012; Vom Berg et al., 2012). Diese phänotypischen und morphologischen Veränderungen der Mikroglia werden im Allgemeinen als aktivierter Zustand beschrieben (Lee and Landreth, 2010; Wyss-Coray and Rogers, 2012). Allerdings funktioniert die Mikrogliaaktivierung nicht nach dem „Alles-oder-nichts-Prinzip, weshalb an Hand der Morphologie nicht unbedingt eindeutige Rückschlüsse auf den funktionellen Zustand der Mikroglia gezogen werden können (Town et al., 2005; Hanisch and Kettenmann, 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass Mikroglia über ihre TLR durch A β aktiviert werden können, wobei das fibrilläre A β den potentesten Aktivator darstellte (Cameron and Landreth, 2010). Zudem fanden Streit und Kollegen heraus, dass die chronische Aktivierung der Mikroglia in AD möglicherweise neben der A β -Akkumulation auch durch hyperphosphoryliertes Tau-Protein begünstigt wird (Streit et al., 1999).

Im Allgemeinen wird die Rolle der Mikroglia im Gehirn von Patienten, die an AD oder TSE erkrankt sind, kontrovers diskutiert. Im frühen Stadium der Erkrankungen sollen sie eine neuroprotektive Rolle in der Neuroinflammation besitzen und zur phagozytotischen A β - (Kopeck and Carroll, 1998; Eikelenboom et al., 2002; Pan et al., 2011) bzw. PrP^{Sc}-Beseitigung (McHattie et al., 1999) beitragen. Zum späteren Zeitpunkt hingegen sollen Mikroglia nach chronischer, amyloid-ausgelöster Aktivierung durch die Sezernierung verschiedener Faktoren, z.B. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), Interleukin (IL)-6, IL-1 β , macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1), monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), Komplement-Komponenten und ROS einen neurotoxischen Effekt ausüben (Lee et al., 2010). Dabei wird vermutet, dass die chronische Produktion pro-inflammatorischer Moleküle durch Mikroglia oder der fortgesetzte Kontakt zu pro-inflammatorischen Molekülen aus der Umgebung zur Herabsetzung der Plaque-Degradations- bzw. Phagozytosefähigkeit der Mikroglia führt (Tan et al., 1999; Tan et al., 2002; Lee and Landreth, 2010). Diese Hypothese wird durch *in vitro* durchgeführte Versuche unterstützt, bei denen Mikroglia mit dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF α stimuliert wurden und es zu einer Herunterregulation von an der A β -Bindung

und Degradation beteiligten Rezeptoren sowie zu einer reduzierten Phagozytose von A β kam (Hickman et al., 2008).

Des Weiteren wurde in einer Vielzahl von Tiermodellen gezeigt, dass sich die ansonsten ineffiziente Degradation von A β -Ablagerungen aus dem Gehirn durch gezielte Stimulierung oder Modulation der Mikroglia-Aktivität erhöhen lässt. Unter physiologischen Bedingungen werden jedoch diese Effektorfunktionen der Mikroglia nicht vollständig aktiviert (Prokop et al., 2013).

1.7. Astrozyten

Astrozyten sind sehr plastische, stern- bzw. spinnenförmig verzweigte Zellen neuroektodermalen Ursprungs, welche rund 50 % der Zellen im ZNS repräsentieren. Diese Zellen stellen eine morphologisch heterogene Population dar. Zudem übernehmen sie vielfältige Funktionen, wie z.B. die Versorgung der Neuronen, die Kontrolle des Energie-, Glutamat-, Ionen-, und des Wasserhaushaltes. Darüber hinaus beeinflussen sie die Aktivierung und Modulation der Synapsen und sind als Teil des Abwehrsystems für die Bildung und Aufrechterhaltung der Bluthirnschranke mitverantwortlich (Sofroniew and Vinters, 2010; Allaman et al., 2011). Astrozyten besitzen phagozytische Eigenschaften (Akiyama et al., 2000(a)) folglich sind astrozytäre Dysfunktionen in eine Reihe von verschiedenartigen neuropathologischen Geschehen involviert (Allaman et al., 2011).

Genau wie Mikroglia werden auch Astrozyten durch chemische oder zellbasierte Signale aktiviert.

1.8. Astrozyten in AD und Prionerkrankungen

Plaque- bzw. PrP^{Sc}-assoziierte Astrozyten wurden im ZNS von AD- und Prion erkrankten Patienten sowie *in vivo* Modellen beobachtet. Sie stellen ein typisches Merkmal dieser Erkrankungen dar (van Keulen et al., 1995; Akiyama et al., 2000(b); Abramov et al., 2003; Kuchibhotla et al., 2009).

Es gibt verschiedene Hypothesen, wie Astrozyten zur Pathogenese von AD und Prionerkrankungen beitragen. So konnten Garwood und Kollegen in einem primären Rattenzellkulturmodell zeigen, dass Astrozyten in Ko-Kultur mit Neuronen nach Stimulation mit A β neurotoxisch sind und zu einer Tau-Phosphorylierung in Neuronen führen (Garwood et al., 2011). Der negative Effekt der Astrozyten auf die Neuronen ist vermutlich auf einen von Astrozyten sezernierten Faktor zurückzuführen, welcher zu einer erhöhten Aktivität des Apoptosefaktors Caspase-3 führt. Da die Astrozyten rund 50 % aller Zellen des Gehirnparenchyms ausmachen, ist es von großem Interesse, ob sie einen direkten Einfluss auf die senile Plaqueablagerung haben. In zwei von Rossner und Kollegen veröffentlichten Publikationen wurde in Tg2576-Mäusen gezeigt, dass in A β -Plaque-assoziierten Astrozyten

BACE1 exprimiert und synthetisiert wird. Die Expression scheint durch die chronische Gliose und durch pro-inflammatorische Zytokine, die von den Mikroglia freigesetzt werden, bedingt zu sein. Auch im Menschen wurde die astrozytische BACE1-Expression im Neocortex von AD-Patienten nachgewiesen (Rossner et al., 2001; Hartlage-Rubsamen et al., 2003).

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Hirngewebsproben von AD-Patienten konnten Kurt und Kollegen in Astrozytenzellfortsätzen A β nachweisen (Kurt et al., 1999). Weiterhin wurde in A β -Plaque-assoziierten Astrozyten granuläres A β erkannt, weshalb vermutet werden kann, dass die Astrozyten sowohl in der Phagozytose als auch in der Synthese des A β eine Rolle spielen (Yamaguchi et al., 1998; Thal, 2012).

Die Annahme, dass Astrozyten zur Phagozytose bzw. A β -Degradation fähig sind, wurde von Wyss-Coray und Kollegen in Versuchen mit hippocampalen Gewebeschnitten bestätigt. Dabei wurden murine adulte Astrozyten auf A β -haltige Gewebeschnitte von humanem APP-exprimierenden Mäusen gegeben. Im Vergleich zu unbehandelten Gewebeschnitten, wiesen die mit Astrozyten behandelten Schnitte eine 40 % geringere A β -Belastung auf. In weiteren *in vitro* Versuchen mit primären Astrozyten wurde auch das fluoreszenzmarkierte A β ₁₋₄₂ nach Exposition im Lumen der Astrozyten nachgewiesen (Wyss-Coray et al., 2003). Dabei wurden Astrozyten durch A β aktiviert, was zur Produktion von Chemokinen, Zytokinen, Stickstoffmonoxid (NO) und ROS führte, die wiederum möglicherweise der Grund einer neuronalen Schädigung sind (Chao et al., 1996; Johnstone et al., 1999; Smits et al., 2002). Zusätzlich locken die durch Astrozyten freigesetzten Chemokine Mikroglia an, die wiederum pro-inflammatorische Moleküle exprimieren und zu einer weiteren neuronalen Schädigung führen.

1.9. Kommunikation zwischen Astrozyten und Mikroglia

Astrozyten und Mikroglia werden durch eine Vielzahl von im Gehirn stattfindenden Prozessen aktiviert und es kommt zu einer verstärkten Kommunikation zwischen beiden Zelltypen. Durch A β aktivierte Mikroglia setzen IL-1 frei, was bei den Astrozyten zu einer Aktivierung, und darüber hinaus zu einer Produktion und Sezernierung von weiteren inflammatorischen Molekülen führen kann. Indirekt besitzt das IL-1 aber auch eine neuroprotektive Wirkung, indem es die Astrozyten veranlasst, als Antwort das Zytokin Transforming Growth Factor β (TGF- β) zu exprimieren (Liu et al., 2011). Dieses TGF- β übt im Gegenzug einen inhibitorischen Effekt auf die Mikroglia aus, wie *in vitro*-Studien mit primären murinen Mikroglia und einer Mikroglia-Zelllinie (BV-2) zeigten (Huang et al., 2010). Durch die TGF- β -Vorbehandlung kam es zu einer verringerten Ansammlung und chemotaktischen Wanderung von Mikroglia in Antwort auf die Exposition von A β -Aggregaten (Huang et al., 2010). Im Allgemeinen scheint die Astrozyten-Mikroglia-Interaktion eine wichtige Rolle für den mikroglialen Aktivierungszustand zu spielen. So wurden in *in vitro*-

Versuchen durch Platzierung von Mikroglia auf Astrozyten-Monolayern, morphologische Veränderungen der Mikroglia beobachtet (Ausbildung kurzer verzweigter Filopodien), die auf eine Aktivierung der Zellen hindeuteten (Rosenstiel et al., 2001; Rezaie et al., 2002). Weiterhin sind Astrozyten in der Lage Mikroglia über eine Ca^{2+} -Ausschüttung bzw. ATP-Freisetzung als Antwort auf eine Verletzung oder Exposition mit einem entsprechenden Stimulus zu aktivieren. Dies führt im weiteren zu einer Proliferation und Migration von Mikroglia und der Freisetzung von zytotoxischen Molekülen (Liu et al., 2011). Bei der AD kann die Kommunikation zwischen Astrozyten und Mikroglia zu einem Kreislauf führen, bei dem A β -aktivierte Mikroglia die Fähigkeit besitzen, die Aktivierung der Astrozyten zu beschleunigen. Diese wiederum aktivieren weiter entferntere Mikroglia, was letzten Endes zu einer Initiierung inflammatorischer Kaskaden führen und in einer Chronifizierung enden kann. Möglich ist auch, dass es zu einer negativen Rückkopplung und einer Beendigung der inflammatorischen Kaskaden kommt, das hängt u.a. von der Dauer der A β -Exposition und dem Grad der Inflammation ab (Johnstone et al., 1999).

1.10. CCAAT/enhancer-binding protein delta (C/EBPD)

Neben den klassischen Faktoren, welche auf eine Gliose hindeuten (z.B. pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine) wurden im Zusammenhang mit chronisch-neuroinflammatorischen Prozessen durch Genexpressionsanalysen auch weitere, bislang nicht mit einer Glia-Aktivierung assoziierte Gene identifiziert. Eines dieser Gene kodiert für den Transkriptionsfaktor C/EBPD, welcher im Gehirn von AD-Patienten und in Prion-infiziertem Hirngewebe stärker exprimiert wird als in einem gesunden Hirngewebe (Li et al., 2004; Riemer et al., 2004; Sorensen et al., 2008). C/EBPD ist eines von 6 Mitgliedern der C/EBP Transkriptionsfaktorfamilie. Typisch für Proteine dieser Familie (C/EBPA, C/EBPB, C/EBPD, C/EBPE, C/EBPG, C/EBPZ) ist eine hochkonservierte C-terminale Region (>90 % Sequenzidentität), die eine basische Leucin-Zipper-(bZIP)-Dimerisationsdomäne und eine basische DNA-Bindungsdomäne enthält, welche für die Transkription von großer Bedeutung sind (siehe Abbildung 3) (Williams et al., 1997).

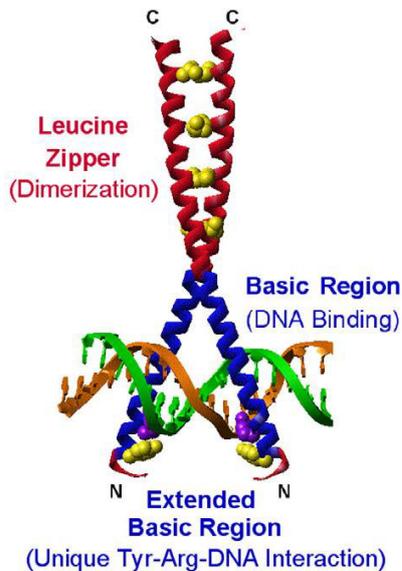


Abbildung 3 Darstellung der Struktur des C/EBP-DNA Komplexes (Tsukada et al., 2011)

Der N-Terminus der C/EBP-Proteine, enthält neben transaktivierenden Domänen auch negativ regulatorische Bereiche, welche sehr verschieden sind (<20 % Sequenzidentität) (Ramji and Foka, 2002). In der Regel bilden die C/EBP-Proteine Homo- und Heterodimere innerhalb der Proteinfamilie, aber auch mit anderen Leucin- und nicht-Leucin-Zipper-Proteinen aus (Akira et al., 1990; Roman et al., 1990; Cao et al., 1991; Wedel and Ziegler-Heitbrock, 1995; Ramji and Foka, 2002).

Alle Familienmitglieder binden auf der DNA an einer spezifischen Promotorregion (5'CCAAT'3 Motiv) verschiedenster Zielgene, die typischerweise in der Proliferation, Differenzierung, Inflammation und dem programmierte Zelltod (Apoptose) von Zellen der angeborenen Immunantwort involviert sind. Die Transkriptionsaktivität der C/EBP-Proteine wird über eine Vielzahl von regulatorischen Mechanismen gesteuert bzw. kontrolliert, wie z.B. auf Genexpressionsebene epigenetisch durch DNA-Methylierung und auf Translationsebene durch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, Acetylierung, Sumoylierung (Ray and Ray, 1994; Kim et al., 2002; Cesena et al., 2007) oder durch Protein-Proteininteraktion mit Co-Repressoren/ Aktivatoren oder anderen Dimerisierungspartnern (Stein et al., 1993; Wang et al., 2007).

C/EBPD wird in verschiedenen Zelltypen z.B. Epithelial-, Nerven- und Fettzellen und Geweben exprimiert. Dabei ist die basale Expression von C/EBPD typischerweise gering, wird aber durch eine Vielzahl von Stimuli induziert (Balamurugan and Sterneck, 2013).

In der Peripherie ist die Rolle von C/EBPD in der Regulation der Akut-Phase-Antwort und allgemeiner in der angeborenen Immunantwort gut erforscht. Zum Beispiel wird durch LPS-Stimulation des TLR-4 auf der Oberfläche von Makrophagen die C/EBPD-Transkription induziert. Dies ist für das Erreichen der maximalen Transkription anderer Gene (u.a. IL-6) von großer Bedeutung (Litvak et al., 2009). Weiterhin ist C/EBPD durch Zytokine wie z.B.

IL-1 β und TNF- α induzierbar (Chang et al., 2012). Im Gegensatz dazu fördert C/EBPD die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine und bildet einen potenziellen, autokrinen pro-inflammatorischen Rückkopplungsmechanismus (Balamurugan and Sterneck, 2013). Möglicherweise führt eine solche selbst verstärkende Art und Weise der C/EBPD-Aktivität zu einer unerwünschten Chronifizierung der angeborenen Immunantwort. Als Gegenspieler bzw. transkriptioneller Repressor, welcher die C/EBPD-angetriebene Antwort in der Peripherie limitiert, wurde der Aktivierungs-Transkriptionsfaktor 3 identifiziert. Dieser wird im Gegenzug hochreguliert, wenn das bakterielle Pathogen völlig beseitigt wurde (siehe Abbildung 4) (Litvak et al., 2009).

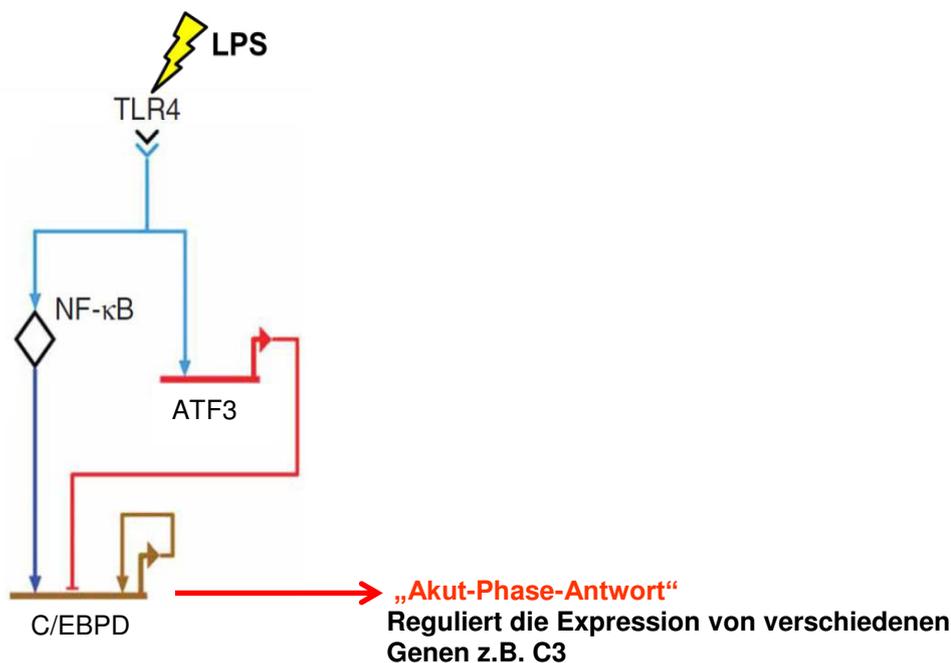


Abbildung 4 Modifizierter Regelkreis der LPS-Antwort (Litvak et al., 2009)

Zudem wurde C/EBPD als Tumorsuppressor beschrieben, der u.a. in der Lage ist, den programmierten Zelltod zu regulieren. Für einige tumorigene Zelllinien konnte gezeigt werden, dass C/EBPD durch Hypermethylierung seiner eigenen Promotorregion deaktiviert war und dadurch das Tumorstadium nicht verzögern kann, während das Tumorstadium ungebremst weiter voranschreitet (Sivko et al., 2004; Thangaraju et al., 2005; Agrawal et al., 2007; Ko et al., 2008; Pan et al., 2010; Pawar et al., 2010; Wang et al., 2010; Sarkar et al., 2012).

Im gesunden Gehirn wurde für C/EBPD eine Funktion vorgeschlagen, in welcher C/EBPD bei der Verknüpfung des Langzeitgedächtnisses eine Rolle spielt und die Expression von Enzymen des Glykogen-Stoffwechsels in Astrozyten reguliert (Cardinaux and Magistretti, 1996; Arguello et al., 2013). Im erkrankten Gehirn wird C/EBPD im Zusammenhang mit der Entwicklung der Neuroinflammation beschrieben (Li et al., 2004; Sun et al., 2008; Morrison et al., 2009; Valente et al., 2013). Tatsächlich wird astrozytäres C/EBPD durch

pro-inflammatorische Zytokine, wie das IL-1 β (Svotelis et al., 2005; Ko et al., 2012) und TNF- α (Cardinaux et al., 2000) induziert. Darüber hinaus wurde die astrozytäre C/EBPD-Überexpression in Gehirngewebe von AD-Patienten (Li et al., 2004) und murinen AD-Modellen (Ko et al., 2012) sowie in Scrapie-infizierten Mäusen (Riemer et al., 2004) beobachtet. Zudem zeigten Astrozyten, die sich in der Nähe von A β -Plaques befanden, eine erhöhte C/EBPD-Expression (Cardinaux et al., 2000; Ejarque-Ortiz et al., 2007). Im Weiteren wurde die stark ausgeprägte Induktion der Expression von C/EBPD nach einem Schädelhirntrauma (traumatic brain injury, TBI) als Verbindung zwischen dem TBI und dem erhöhten Risiko für die spätere Entwicklung der AD vorgeschlagen (Sandhir and Berman, 2010).

Weiterhin wurde berichtet, dass C/EBPD in der Regeneration verletzter Nervenzellen eine wichtige Rolle spielt (de Heredia and Magoulas, 2013).

1.11. Zielsetzung der Arbeit

Eine chronisch-entzündliche Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia ist ein charakteristischer Teil des Krankheitsgeschehens bei neurodegenerativen Proteinopathien, wie z.B. der AD und Scrapie.

Der Transkriptionsfaktor C/EBPD ist in der Peripherie von zentraler Bedeutung für die Regulation der angeborenen Immunantwort und steuert dabei die Expression zahlreicher Gene im Rahmen der „Akut-Phase-Antwort“. Aus vorherigen Genexpressionsanalysen ist bekannt, dass C/EBPD im Gehirn von AD-Patienten und in Prion-infizierten Mäusehirnen astrozytär überexprimiert wird. Bisher wurde C/EBPD als Transkriptionsfaktor in peripheren Immunzellen und in Zelllinien charakterisiert. Aber welche Rolle spielt C/EBPD in den „speziellen Immunzellen“ (Gliazellen) des Gehirns? Wirkt die Überexpression auch hier aktivierend auf die angeborene Immunantwort? Dies könnte eine wesentliche Beteiligung von C/EBPD im Krankheitsgeschehen von AD und Scrapie darstellen. Ziel dieser Arbeit war es daher, C/EBPD im Kontext beider neurologischer Erkrankungen genauer zu untersuchen. Dazu wird einerseits die AD-ähnliche Pathogenese transgener APP/PS1-Mäuse mit der von transgenen APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen verglichen und andererseits die Scrapie-Pathogenese nach intrazerebraler Infektion von C/EBPD^(-/-)-Mäusen und entsprechenden Kontrollmäusen untersucht. In beiden *in vivo* Modellen werden histo- und immunhistochemische Untersuchungen bezüglich der Plaque- bzw. PrP^{Sc}-Ablagerungen, der Astro- und Mikrogliose sowie weitere Untersuchungen zur Glia-Aktivierung mittels quantitativer Real-Time PCR und Western Blot durchgeführt. Weiterhin sollte die Identifikation C/EBPD-regulierter Gene in Mixed-Glia- und Glioblastoma-Zellkulturmodellen mittels quantitativer Real-Time PCR weiter ergänzt und abgesichert werden.

2 Material

2.1. Geräte

Brutschränke	Heraeus Instruments GmbH, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dispergiergerät, <i>Ultra-Turrax®</i>	Ika-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Elektrophorese Netzgeräte, <i>Power Pac – Universal</i>	Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, Kalifornien, USA
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, Kalifornien, USA
ELISA-Reader, <i>TECAN Sunrise</i>	TECAN, Männedorf, Schweiz
Entwässerungsautomat	Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland
Expositionskammer	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Feinpipetten, <i>Research Plus</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Filmentwickler	Kodak, Rochester, USA
Fluoreszenzmikroskop, <i>Axioskop 40</i>	Zeiss, Jena, Deutschland
Image Station	Kodak, Rochester, USA
Lichtmikroskop, <i>Leitz Labovert</i>	Leitz, Lindlar, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Paraffinausgießstation	Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland
PCR-Cycler, <i>T3 Thermocycler</i>	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Pipettierhilfe, <i>Accu jet pro</i>	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Real-Time PCR Cycler, <i>ABI7500</i>	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Real-Time PCR Cycler, <i>Stratagene MX3000</i>	Stratagene, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA
Schlittenmikrotom SM2000 R	Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland
Schüttelinkubator, <i>Thermostat 5320</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schüttler, <i>Vortex MS2 Minishaker</i>	Ika-Werke GmbH & Co. KG GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland
SDS-Gelelektrophoresekammer, <i>Tetracell</i>	Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, Kalifornien, USA
Spektrophotometer <i>NanoDrop® 1000</i>	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Stereomikroskop, <i>SMZ-168 Series</i>	Motic Incorporation Ltd, Hong Kong, China
Sterilwerkbank, <i>LaminAir® HB2472</i>	Heraeus Instruments GmbH, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Ultraschallbad	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Ultraschallsonde, <i>Vibra-Cell</i> (3 mm-Durchmesser Sonotrode)	Sonics Materials, Newtown, USA
Ultrazentrifuge, Hitachi CS 150 GX	Hitachi, Tokyo, Japan
Waagen	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad <i>EcoTemp</i>	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge, <i>Biofuge Pico21</i>	Heraeus Instruments GmbH, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Zentrifuge, <i>Multifuge 3S-R</i>	
Zentrifuge, <i>Megafuge 40R</i>	

2.2. Tier-/ Mausmodelle

APP _{Swe} /PS1dE9 (JAX Lager-Nr. 004462)	Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA (Jankowsky et al., 2001)
APP _{Swe} /PS1dE9 x C/EBPD ^(-/-)	Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
C57/BI6 (WT)	Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
C/EBPD ^(-/-) x C57/BI6	Dr. E. Sterneck, National Cancer Institute Frederick, USA (Sterneck et al., 1998)

Alle Tierexperimente wurden von der lokalen Tierschutzbehörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, Deutschland) zugelassen.

2.2.1. Primer für die Genotypisierung

Der Genotyp der Tiere wurde in der Regel zwei Monate nach der Geburt bestimmt. Dabei wurde aus der Haut der Tiere, die bei der Ohrmarkierung ausgestanzt wurde, die DNA nach Herstellerangaben mittels QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) gewonnen und mittels PCR unter Verwendung genspezifischer Primer (siehe Tabelle 1), der Genotyp bestimmt. Nach Tötung der Tiere wurde der Genotyp noch einmal bestätigt.

Tabelle 1 Übersicht der verwendeten Primer für die Genotypisierung der untersuchten Mäuse

Primer	Sense Primer 5'---3'	Antisense Primer 5'---3'	Amplikon [bp]
C/EBPD	CTCCAGGCTTGGACGGCTAAGTAGG	AAGTTGGCTGTACCTCGCC	205
C/EBPD ^(-/-)	GCTCCAGACTGCCTGGGAAAAGC	CAGTCCAGTGCCCAAGCTGC	305
APP _{Swe}	GACTGACCACTCGACCAGGTTCTG	CTTGTAAGTTGGATTCTCATATCCG	350

2.3. Verbrauchsmaterialien, Medien und Lösungen für die Proteinbiochemie- und Immunhistochemie

40 % Acrylamid/ Bisacrylamid (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
10 mM Na-Citratpuffer pH 6,0	9 ml Stammlsg. A (0,1 M Citronensäurelsg. , 21,01 g C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O/ l dest.) + 41 ml Stammlsg. B (0,1 M Na-Citratlsg. 29,41 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2 H ₂ O/ l dest.) + 450 ml dest.
Acrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Amoniumpersulfat	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Assaypuffer	1 M NaCl; 1 M Tris; pH 9,5
BCA Protein Assay Reagent A + B	Thermo Fisher Scientific Inc Inc, Waltham, USA

Bisacrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Blotpuffer (ohne Methanol) (40 ml Blotpuffer + 10 ml Methanol)	48 mM Tris; 38 mM Glycin, 0,037 % SDS; pH 8,7-9,0
CDP-Star Reagent	Applied-Biosystems , Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
D.P.X.-Einbettmedium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Einweg-Einbettkassette	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin-Stammlösung	1 g/ 100 ml in ddH ₂ O; vor Gebrauch verdünnen → 1:10 mit ddH ₂ O + 1 Tropfen Eisessig/ 100 ml)
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Homogenisierungspuffer	0,5 % Triton X-100, 0,05 % SDS in PBS
Kongorot	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Lysepuffer Stammlösung	1% Triton X-100; 100 mM NaCl; mM EDTA; 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magic Marker XP	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Meyers Hämlaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS	RKI-Nährbodenzentrale, Berlin, Deutschland 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, pH 7,4
PBST-Puffer	0,05 % Tween-20 in PBS
Probenpuffer (2xLPP)	0,125 M Tris; 4 % SDS; 20 % Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau; 10 % β-Mercaptoethanol; pH 6,8

Proteaseinhibitor (Complete Ultra Tablets, Mini)	Roche, Basel, Schweiz
PVDF-Membran (0,45 µm Porendurchmesser)	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Rainbow Marker	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Röntgenfilme für Chemilumineszenz, Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Stripping-Buffer	100 mM NaOH, 2 % SDS, 0,5 % DTT
Synthetisches A β ₁₋₄₂	Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg, Detschland
TBS	10 mM Tris; 133 mM NaCl; pH 7,4
TBST-Buffer	0,05 % Tween 20 in TBS-Buffer
Temed	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol, Aceton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<u>Für SDS-PAGE Gele</u>	
Lämmli Elektrophoresepuffer	250 mM Tris; 1 % SDS; 1,92 M Glycin; pH 8,3- 8,7
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris; pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris; pH 8,8
<u>Für Schägger-Jagow Gele</u>	
Anodenpuffer (außen)	0,2 M Tris; pH 8,9
Acrylamid/ Bisacrylamid	48 % Acrylamid; 1,5 % Bisacrylamid
Gel-Puffer	3 M Tris; 0,3 % SDS; pH 8,45
Kathodenpuffer (innen)	0,1 M Tris; 0,1 M Tricine; 0,1 % SDS; pH 8,25
<u>Für die Kongorot-Färbung</u>	
Gesättigte NaCl-Lösung	NaCl in 80 %-igem EtOH lösen, bis sich ein feiner Bodensatz bildet
0,4 %-ige Kongorot-Stammlösung	0,8 g Kongorot in 200 ml gesättigter NaCl- Lösung über Nacht (ü.N.) unter Lichtschutz lösen/rühren
Alkalisch gesättigte NaCl-Lösung	200 ml gesättigte NaCl-Lösung + 2 ml 1 M NaOH

Für den PET-Blot

3 M Guanidiniumthioisocyanat (für 500 ml)	177,3 g GndSCN in 10 mM Tris-Puffer pH 7,8 lösen und auf 500 ml auffüllen (10mM Tris: 1,21 gTris/l pH auf 7,8 einstellen); Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K (25 µg/ ml in PK-Puffer)	Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, Deutschland
Brom-Chlor-Indolyl-phosphat (BCIP)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
BCIP-Stammlösung	100 mg Brom-Chlor-Indolyl-phosphat in 4 ml DMF (Dimethylformamid)
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid (DMF)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NBT-Stammlösung	200 mg Nitro Blue Tetrazolium in 4 ml 70 % DMF in EtOH (2,8 ml DMF + 1,2 ml EtOH abs.)
NBT/BCIP; frisch ansetzen	aus Stammlösung 132 µl BCIP + 132 µl NBT in 20 ml Substratpuffer lösen
NTM pH 9,5 Tris (100 mM)	12,1 g/l NaCl (100 mM); 5,84 g/l MgCl ₂ (50 mM)x 6 H ₂ O, 10,15 g/l (gelöst zusetzen!)
PK-Puffer	Tris (10 mM) 1,21 g/l; NaCL (100 mM); 5,84 g/l, Brij 35 (0,5%)
Stopplösung (20mM EDTA/ TBS)	20 ml EDTA-Stammlösung (500 mM; pH 8,5) mit 480 ml TBS mischen (46,53 g/ 250ml + ca. 11 ml 10 N NaOH)
Substratpuffer (pH 9,5) (für 500 ml)	Tris (100 mM) 12,1 g/l; NaCl (100 mM) 5,8 g/l; MgCl ₂ x 6 H ₂ O (5 mM) 1,02 g/l (gelöst zusetzen) oder 5 ml einer 1 M MgCl ₂ -Lösung; pH 9,5 mit ca. 300 µl ½ konz. HCL

2.3.1. Antikörper und Immunreagenzien**Tabelle 2** Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Spezifität	Mono- polyklonal	Wirt	Verdünnung	Anwendung	Firma	Bestell- Nr.
Anti Beta Amyloid, 1-16 (6E10)	Mensch, Maus	mAK	Maus	1:2000	WB	BioLegend, San Diego, USA	SIG-39300
Anti Beta Amyloid, 17-24 (4G8)	Mensch, Maus	mAK	Maus	1:500	IHC	BioLegend, San Diego, USA	SIG-39220
Anti-β-Actin (Clone AC-15)	Mensch, Maus	mAK	Maus	1:5000	WB	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A5441
Anti-Complement C3	Maus	pAK	Ziege	1:500	WB	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	ICN55444
Anti-β-Actin	Maus, Mensch	mAK	Maus	1:10000	WB	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A5441

Anti-PrP (4H11)	Maus	mAK	Maus	1:5000	WB	H.Schätzl, Department of Comparative Biology and Experimental Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, Canada	
Anti-PrP (6H4)	Rind, Kanninchen, Schaf, Nerz, Maus, Hamster, Mensch	mAK	Maus	1:1000-1:10000	WB, IHC, Pet-Blot	Prionics AG, Zürich, Schweiz	01-010
Anti Aif1/ Iba1	Maus, Ratte	pAK	Ziege	1:1500	WB	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	PA5-18039
Anti Iba1	Mensch, Maus, Ratte	pAK	Kaninchen	1:1000	IHC	Wako Chemicals, Richmond, USA	016-20001
Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Katze, Hund, Maus, Ratte, Schaf, Mensch, Kuh	pAK	Maus	1:5000 1:1000	WB, IHC	Dako, Glostrup, Dänemark	Z 0334
Anti-PrP (Hans2)	Maus	mAK	Kaninchen	1:5000	WB, IHC, Pet-Blot	Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland	

Tabelle 3 Verwendete Sekundärantikörper und Konjugate

Antikörper	Spezifität	Mono-/polyklonal	Wirt	Verdünnung	Anwendung	Firma	Bestell-Nr.
Anti- mouse IgG, biotinylated (SaM)	Maus	IgG	Schaf	1:100	IHC	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland	RPN1001
Anti-rabbit IgG, biotinylated (DaR-Bio)	Kaninchen	IgG	Esel	1:500	IHC	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland	RPN1004
Donkey anti-Goat IgG alkaline phosphatase (DaG-AP)	Ziege	pAK	Esel	1:5000	WB	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	705-055-147
Goat anti-Mouse Immunoglobulins/AP (GaM-AP)	Maus	pAK	Ziege	1:10000	WB	Dako, Glostrup, Dänemark	D0486
Goat anti-Rabbit IgG (H+L)- alkaline phosphatase (GaR-AP)	Kaninchen	pAK	Ziege	1:5000	WB	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	111-055-144
Goat anti-Rat IgG (H+L)- alkaline phosphatase (GaR-AP)	Ratte	pAK	Ziege	1:5000	WB	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	112-055-003
Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (SA-POD)	Biotinyliert	Conjugate	Meerrettich	1:200	IHC	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland	RPN 1231

2.4. Verbrauchsmaterialien, Medien und Lösungen für die Molekularbiologie

1 Kb DNA-Marker

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

100 bp DNA-Marker

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Agar, Agarose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Baktotrypton	Becton, Dickinson, New Jersey, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	10 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad. 1 l ddH ₂ O
SYBR Safe™ DNA gel stain	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
SYBR® Select Master Mix	Applied-Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
TAE-Puffer	RKI-Nährbodenzentrale, Berlin, Deutschland 24,2 g/l Tris; 18,6 g/l EDTA, 57 ml/l Eisessig; pH 8,5
TaqMan® Gene Expression Assays	Applied-Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
TRIzol® Reagenz	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA

Kits (Versuchssysteme)

InviTrap Spin Cell RNA Mini Kit	STRATEC MOLECULAR GMBH, Berlin, Deutschland
NucleoSpin® Extrakt II	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoBond® Xtra Midi	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

Restriktionsenzyme

AsisSI	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
BamHI	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
MluI	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
XhoI	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA

2.4.1. Bakterienstamm

One Shot® MAX Efficiency® DH5α™-T1R	F- <i>φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA</i> (confers resistance to phage T1) Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
-------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2.4.2. Plasmide

C/EBPD (GFP-tagged)- Human OriGene Technologies, Inc., Rockville, USA
CCAAT/enhancer
binding protein (C/EBP), delta (C/EBPD)

C/EBPD (untagged)- Human CCAAT/enhancer OriGene Technologies, Inc., Rockville, USA
binding protein (C/EBP), delta (C/EBPD)

pcDNA 3.1 Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc,
Waltham, USA

2.4.3. TaqMan-Sonden und Primer für die Real-Time PCR

In Tabelle 4 und Tabelle 6 ist eine Übersicht der verwendeten murinen und humanen TaqMan-Sonden und in Tabelle 5 und Tabelle 7 Primer für die Real-Time PCR dargestellt. Die TaqMan-Sonden wurden von der Firma Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA) bezogen und die Primer wurden von der Firma Metabion International AG (München) synthetisiert.

Tabelle 4 Verwendete murine TaqMan-Sonden für die Real-Time PCR

Gen	Assay ID	Amplikon [bp]	Referenzsequenz
Actb (β-actin)	Mm00607939_s1	115	NM_007393.3
Aif1/ Iba-1	Mm00479862_g1	82	NM_019467.2
C3	Mm00437838_m1	70	NM_009778.2
Ccl3	Mm00441258_m1	78	NM_011337.2
Cxcl2	Mm00436450_m1	67	NM_009140.2
Gapdh	Mm99999915_g1	107	NM_008084.2
Gfap	Mm01253033_m1	75	NM_010277.3
Il-6	Mm00446190_m1	78	NM_031168.1

Tabelle 5 Verwendete murine Primer für die Real-Time PCR

Gen	Sense Primer 5'---3'	Antisense Primer 5'---3'	Amplikon [bp]	Referenzsequenz
Ace1	TGGCCCAGCGGCAGCAGTA	CCCTCCCAGGCAAACAACAAC	172	NM_207624.5
Actb (β-actin)	ACTCTTCCAGCCTTCCTTC	ATCTCCTTCTGCATCCTGTC	171	NM_007393.3
ApoE	GAGGACACTATGACGGAAGTAAA	TCTGTGCTCTGGCCCAGCATG	199	NM_009696.3
Cp	GACAACACCACTGATTTTCAACGG	TCTCCAGGACTTGGCTCATTGG	95	NM_007752.3
CtsB	AGCCATTTCTGACCGAACCT	TTGTCCAGAAGCTCCATGCT	146	NM_007798.3
Cxcl9	AAAACCTGAAATCATTGCTACTG	CTCTTTTGCCTTTTCTTTTGGCTG	125	NM_008599.4
Ece1	ACACCGACAAATGTCTGCTCAA	CCGTGTCACTCACACAAAACCT	168	NM_199307.2
Gapdh	CCATGTTTTGTGATGGGTGTGAACCA	ACCAGTGGATGCAGGGATGATGTTTC	251	NM_008084.2
Ide	CCGGCCATCCAGAGAATAGAA	ACGGTATTCCCGTTTGTCTTCA	69	NM_031156.2
Lrp1	CGCCATGGGGAAGGTGTTCTT	CCCTTCGTAGTCTACCACCTCG	204	NM_008512.2
Mme	CTTGCTTTGCTCCTGACTATCAT	TCAAAATTAATGTATCGGGAACCT	224	NM_008604.3
Ager (RAGE)	TAGAATGGAACTGAACACAGGA	GTTAGTTGCCCGACACCGG	161	NM_007425.3
Saa3	CCAGAGAGGCTGTTCCAGAAAGTTCAC	TCGGAAGTGGTTGGGGTCTTTG	107	NM_011315.3
Tnfaip6	CAGCTAGAGGCAGCCAGAAAA	TCCATAATCGATGATACCCGTT	135	NM_009398.2

Tabelle 6 Verwendete humane TaqMan-Sonden für die Real-Time PCR

Gen	Assay ID	Amplikon [bp]	Referenzsequenz
ACTB	Hs03023943_g1	122	NM_001101.3
CCL3	Hs00234142_m1	53	NM_002983.2
CP	Hs00236810_m1	85	NM_000096.3
CXCL2	Hs00601975_m1	100	NM_002089.3
CXCL9	Hs00171065_m1	60	NM_002416.1
GAPDH	Hs99999905_m1	122	NM_002046.3
IL-6	Hs00985639_m1	66	NM_000600.3

Tabelle 7 Verwendete humane Primer für die Real-Time PCR

Gen	Sense Primer 5'---3'	Antisense Primer 5'---3'	Amplikon [bp]	Referenzsequenz
C3	TACTACACGCTGATCGGTGC	GCTTTTTACCACCAGCGAGC	102	NM_000064.2
ACTB	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	AAGGGACTTCTGTAAACAATGCA	140	NM_001101.3
GAPDH	TGGTATCGTGAAGGACTCATGAC	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC	189	NM_002046.4
TNFAIP6	TGCTGCTGGATGGATGGCTA	CACTCCTTTGCGTGTGGGT	159	NM_007115.3

Die Rohdaten bzw. Ct-Werte quantitativer Real-Time PCR wurden mit den Programmen MxPro (Stratagene La Jolla, California, USA) bzw. ABI7500 v.2.0.6 (Applied Biosystems/ Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA) ausgewertet und nach Microsoft Excel extrahiert, wo alle weiteren statistischen Auswertungen stattfanden.

2.5. Verbrauchsmaterialien, Medien und Lösungen für die Zellkultur

CaCl ₂ , Essigsäure, Ethanol, Glycerol, KCl, KH ₂ PO ₄ , Methanol, NaCl, NaHCO ₃ , Na ₂ HPO ₄ , β-Mercaptoethanol, Paraformaldehyd (PFA), Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Einfrierbehälter, Einfrierröhrchen	Nunc, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Ethanol, Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Lipofectamin LTX Reagent	Invitrogen Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Opti-MEM	Invitrogen Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Plus Reagent	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Sterilfilter	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	Biochrom AG Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ultra-Pure distilled Water (ddH ₂ O)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Zellkultureinwegmaterialien	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland; Nunc, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Zellsieb (70 µm)	BD Biosciences, San Jose, USA

2.5.1. Zelllinie

U-373 MG: humane Astrozytoma-Glioblastoma
Zelllinie

Dr. N. Holtkamp
(Charite- Universitätsmedizin Berlin)

2.5.2. Wachstumsmedium für die U-373 MG Zelllinie

DMEM High Glucose with L-Glutamine
Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc,
Waltham, USA; Kat.Nr. 41966-029)

L-Glutamin	4 mM
D-Glucose	4500 mg/ L
Sodium Pyruvat	110 mg/ L
Fötale Kälberserum (FKS)	10 % (v/v)
Penicillin G	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
β-Mercaptoethanol	0,1 % 50 mM

2.5.3. Einfriermedium für die U-373 MG Zelllinie

Wachstumsmedium	80 % (v/v)
Fötale Kälberserum (FKS)	10 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)

3 Methoden

3.1. Mausmodelle für AD und Prionerkrankungen

3.1.1. AD-Modell

Als AD-Mausmodell wurden kommerziell erworbene APP_{Swe}/PS1dE9-Mäuse, im Weiteren als APP/PS1 bezeichnet, verwendet. Dabei handelt es sich um eine doppelt-transgene Maus, die ein humanes APP mit der schwedischen Mutation APP_{Swe} sowie das humane PS1-Gen mit der PS1dE9-Mutation trägt. Die Auswirkungen dieser Mutationen sind in Abschnitt 1.4 beschrieben. Alle APP/PS1-Mäuse wurden für mindestens 10 Generationen auf C57Bl/6 rückgekreuzt. In den APP/PS1-Mäusen waren bereits nach 6 Monaten erste A β -Plaques nachweisbar. Ein weiterer Mausstamm, APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Maus wurde durch Kreuzung von APP/PS1- mit C/EBPD^(-/-)-Mäusen (C/EBPD^(-/-)-Mäuse wurden zuvor mindestens 10 Generationen auf C57Bl/6 rückgekreuzt) erzeugt. Es wurden Untersuchungen nach 6, 9, 12 und 18 Monaten durchgeführt und die Nestbauaktivität sowie Gewichtsunterschiede zu 6, 9 und 12 Monaten erfasst.

3.1.2. Prion-Modell

Im Prion-Modell wurden C57Bl/6 (WT)- und C/EBPD^(-/-)-Mäuse verwendet. Die von Sterneck (Sterneck et al., 1998) erhaltenden C/EBPD^(-/-)-Mäuse wurden zuvor für mindestens 10 Generationen auf C57Bl/6 rückgekreuzt. Im Alter von 6 bis 8 Wochen wurden die Tiere intracerebral (i.c.) mit 20 μ l eines 10⁻⁵ verdünnten 10 %-igen Hirnhomogenat aus Scrapie-infizierten Mäusen infiziert. Das zur Infektion verwendete Hirnhomogenat wurde von terminal erkrankten WT-Mäusen gewonnen, die zuvor mit dem Scrapie-Stamm 139A infiziert wurden (Schultz et al., 2004; Riemer et al., 2008). Der Scrapie-Stamm 139A wurde ursprünglich aus einem Gehirn-Pool dreier Scrapie-infizierter Schafe isoliert (Dickinson, 1976). Mock-Infektionen (Kontrollinfektionen) wurden mit entsprechenden Hirnhomogenaten aus uninfizierten, gesunden WT-Mäusen durchgeführt. Die infizierten Tiere wurden zweimal pro Woche auf die Entwicklung klinischer Krankheitssymptome begutachtet, welche sich typischerweise als schlechter Zustand des Fells, eine gekrümmte Haltung, die Entwicklung einer Hinterbeinlähmung, Gewichtsverlust und Verhaltensveränderungen zeigten (Burwinkel et al., 2004; Riemer et al., 2008). Die Mäuse wurden 125 Tage nach Infektion (dpi=days post infection) bzw. zum terminalen Zeitpunkt der Krankheit getötet. Erreicht wurde der terminale Zeitpunkt, wenn abzusehen war, dass die Mäuse krankheitsbedingt innerhalb der nächsten 48 Stunden sterben würden. Die Überlebenszeit der Tiere wurde statistisch erfasst und mittels des ungepaarten t-Tests und des Log Rank Tests analysiert.

3.2. Verhaltensstudien/ Nestbauaktivität/ Gewichtsmessung

In Versuchen mit Mäusen wurde gezeigt, dass es bei Hirnverletzungen, Behandlung mit pharmakologischen Agenzien und genetischen Manipulationen zu Veränderungen des Nestbaus kommt (Deacon, 2006). Auch in verschiedenen murinen Alzheimer-Modellsystemen wurde ein verschlechtertes Nestbauverhalten gegenüber den Kontrollen beobachtet (Deacon et al., 2008; Filali and Lalonde, 2009). Diese Beobachtung animierte mich dazu, diesbezüglich Untersuchungen im Alzheimer-Modellsystem durchzuführen und herauszufinden, welchen Einfluss C/EBPD auf den Nestbau ausübt. Eine Stunde vor der gewohnten Verdunkelungszeit wurden die Tiere einzeln in Käfige gesetzt. Als Nestbaumaterial bekamen sie ein standardisiertes, quadratisches (5 x 5 cm) Baumwollkissen (Nestlet) in den Käfig gelegt. Am nächsten Tag wurde die Qualität des Nestbaus anhand einer Skala von 1-5 Punkten (siehe Tabelle 8 und Abbildung 5) bewertet.

Tabelle 8 Bewertungsskala für den Nestbau

Punkte	Bewertungsskala
1	Nestlet mehr als 90 % intakt
2	Nestlet teilweise zerrissen (50-90 % intakt)
3	Nestlet größtenteils (50-90 %) zerrissen, aber kein richtiges Nest erkennbar. Weniger als 90 % des zerrissenen Nestlets befindet sich in einem Viertel des Käfigs an einem Ort.
4	Mehr als 90 % des Nestlets zerrissen, Material befindet sich innerhalb eines Viertels des Käfigs. Ein identifizierbares, aber flaches Nest ist erkennbar. Die Kuhle ist tiefer als die Körperhöhe der Maus.
5	Mehr als 90 % des Nestlets zerrissen, Nest bildet eine Kuhle, die tiefer als die Körperhöhe der Maus ist. Die Maus ist teilweise von Nestmaterial verborgen.

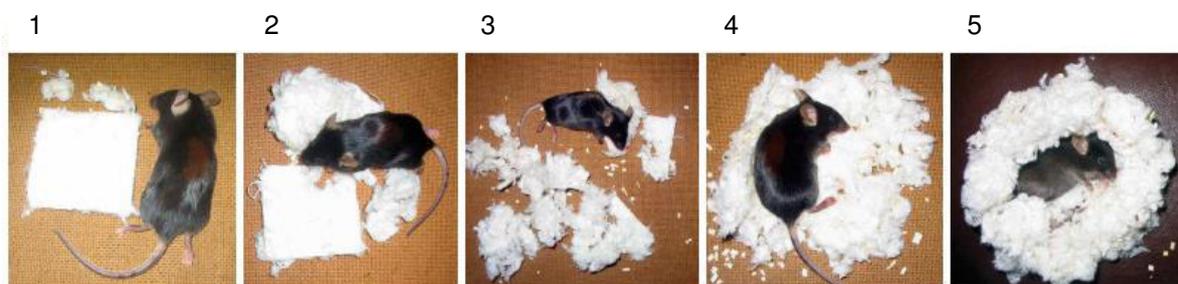


Abbildung 5 Bewertungsskala für den Nestbau. Die Mäuse wurden über Nacht in separaten Käfigen mit einem gepressten Baumwollplättchen (Nestlet) gehalten. Ihre Nestbaufähigkeit/ Aktivität wurde am nächsten Tag bestimmt. Dabei entspricht 1 Punkt dem schlechtesten und 5 Punkte dem besten Nestbau (Abbildungen entnommen aus Deacon, 2006).

3.3. Histologische und Immunhistochemische Methoden

3.3.1. Gewebefixierung

Gehirngewebe, welches für Paraffinschnitte vorgesehen war, wurde für 24 Stunden bei 4 °C in 4 %-iger Formaldehydlösung fixiert und anschließend in 2 %-iger Formaldehydlösung für mindestens 48 Stunden und bis maximal 14 Tage bei 4 °C gelagert. Zur Vorbereitung für die Entwässerung wurden die Hirnhälften in Einwegkassetten gegeben und für 4 Stunden in 70 %-tigem EtOH auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgten eine automatisierte Entwässerung und Einbettung der Gehirne in Paraffin. Zum Abschluss wurden die Hirnhälften in einer Paraffinausgießstation mittels einer Histokinette und der umgedrehten Einwegkassette in schnittfähige Paraffinblöcke gegossen. Zum Nachweis von Proteinantigenen (Western Blot) oder zur RNA-Isolierung wurde das Gehirngewebe in zwei Hälften geteilt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.3.2. Anfertigung von Gewebeschnitten

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden serielle 6 µm dicke Sagittalschnitte mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms in horizontaler Schnittrichtung bei Raumtemperatur (RT) angefertigt. Die Schnitte wurden zum Strecken in ein 50 °C warmes Wasserbad überführt und auf speziell beschichtete Objektträger (SuperFrostPlus) aufgezogen, um ein späteres Ablösen der Gewebeschnitte von den Objektträgern zu verhindern. Diese Schnitte wurden über Nacht (ü.N.) bei 37 °C im Brutschrank getrocknet. Für den PET-Blot vorgesehene Paraffinschnitte wurden auf zugeschnittene Nitrocellulosemembranen aufgezogen und ü.N. bei 60 °C getrocknet.

3.3.3. Anfertigung von Hämalaun- Eosin (HE)- Übersichtsfärbungen

Zur besseren Orientierung der entsprechenden Schnittebenen wurde von jedem 10. Paraffinschnitt eine HE-Übersichtsfärbung angefertigt. Dabei färbt Hämalaun alle basophilen Gewebestandteile, wie z.B. das Chromatin der Zellkerne blau und Eosin das Zytoplasma und die Interzellulärsubstanz rot an. In einer Färbeküvette wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert, indem die Schnitte 2-mal 5 min in Xylol, 2-mal 5 min in Aceton und 1- bis 2-mal kurz in ddH₂O inkubiert wurden. Die Färbung mit vor Gebrauch filtriertem Meyers Hämalaun erfolgte für 30 s, nach dreimaligen Spülen mit Leitungswasser wurden die Schnitte für 10 min in Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Schnitte in ddH₂O gespült und für 5 bis 10 min in Eosin-Lösung inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte in einer mit Leitungswasser gefüllten Küvette, bis keine Farbe mehr austrat. Die Schnitte wurden kurz abgetropft, bevor sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %-, 80 %-, 96 %- und 99 %-igem EtOH) 2-mal für 30 s in Xylol dehydriert wurden. Nachfolgend wurden die

Schnitte mit D.P.X. überschichtet und luftblasenfrei eingedeckt. Die Schnitte trockneten ü.N. unter dem Abzug. Am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger gesäubert und die gefärbten Präparate mittels Mikroskop durchgemustert.

Ein Beispiel für eine HE-Übersichtsfärbung ist in Abbildung 6 dargestellt.



Abbildung 6 Beispiel für eine HE-Übersichtsfärbung, 10-fache Vergrößerung

3.3.4. Immun-/ histochemische Färbemethoden an Paraffinschnitten

3.3.4.1. Bestimmung des Astrozyten-Markers GFAP

Astrozyten exprimieren auf der Oberfläche ihrer Zellfortsätze Saures Gliafaserprotein (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP), welches mittels eines spezifisch gegen dieses Protein gerichteten Antikörpers (AK) nachgewiesen wurde. Zunächst wurden die Schnitte, wie bereits in Abschnitt 3.3.3 beschrieben, entparaffiniert und für 2-mal 5 min mit PBS gewaschen. Nach Blockierung endogener Peroxidaseaktivität mit einem 1 %-igem H_2O_2 /Methanol-Gemisch (20 min bei RT) wurden die Schnitte für 2-mal 5 min in PBST-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie mit 3 %-igem FKS/ PBS für 30 min geblockt. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-GFAP (1:1000 in 3 %-igem FKS/ PBS; siehe Tabelle 2) ü.N. bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte für 2-mal 5 min mit PBS gewaschen und anschließend für 30 min bei 37 °C mit dem biotinylierten Sekundärantikörper anti-Kaninchen (1:100 in 3 %-igem FKS/ PBS; siehe Tabelle 3) inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten für je 5 min mit PBS erfolgte die Zugabe des Streptavidin-HRP-Konjugates für 1 Stunde bei 37 °C (Verdünnung 1:200 in 3 %-igem FKS/ PBS; siehe Tabelle 3). Im Anschluss wurde für 2-mal 10 min mit PBS gewaschen. Im weiteren Verlauf erfolgte die DAB-Färbung der Schnitte, welche sich zum Einen aus der 10-minütigen Vorinkubation in der Vorinkubationslösung (siehe Tabelle 9) und zum Anderen aus der sich anschließenden 3-minütigen Färbung in der Färbelösung (siehe Tabelle 10) zusammensetzte.

Tabelle 9 Zusammensetzung der Vorinkubationslösung

Vorinkubationslösung	pro Schnitt
ddH ₂ O	190 µl
1 M Tris; pH 7,6	10 µl
1 M Imidazol; pH 7,6	2 µl
50 mg/ ml DAB.Lsg. (im Dunkeln auftauen)	2 µl
Gesamt	204 µl

Tabelle 10 Zusammensetzung der Färbelösung

Färbelösung	pro Schnitt
Vorinkubationslösung	100 µl
3 %-ige Ammoniumnickelsulfatlsg. <small>= 1/10 Ansatzvolumen, Endkonz. 0,3 %</small>	10,5 µl
0,3 %-ige H ₂ O ₂ (Vorverdünnung aus 30 %)	5 µl
Gesamt	115,5 µl

Nach zwei Waschschritten für je 10 min in PBS wurde mit Meyers Hämalaunlösung für 30 s gegengefärbt. Danach wurden die Schnitte 3-mal in Leitungswasser gespült und „bläuten“ für 10 min in Leitungswasser. Anschließend wurden die Schnitte kurz abgetropft, dehydriert (siehe Abschnitt 3.3.3) und mit D.P.X. luftblasenfrei eingedeckt wurden.

Zur Auswertung wurden mit Hilfe eines Mäusehirnatlas (George Paxinos, 2002) zwei anatomische Regionen bestimmt: der Hippocampus und der sekundäre motorische Cortex (M2-Cortex). Zum relativen Vergleich der Färbeintensitäten wurde das Programm ImageJ (National Institutes of Health, USA) verwendet. Zudem wurde ein Schwellenwert (Threshold) für alle innerhalb einer Gruppe zu vergleichenden Gewebsschnitte festgelegt, ab dem die zu untersuchenden Parameter als positiv galten. Gemessen wurden die von Astrozyten bedeckten Flächen im Bereich des Hippocampus und des M2-Cortex pro mm².

3.3.4.2. Bestimmung des Mikroglia-Marker Aif1/ Iba-1

Für den Nachweis von Mikroglia wurde der gegen den „*Allograft inflammatory factor 1 (Aif1)*“ bzw. im weiteren alternativ verwandten Name „*ionized calcium binding adapter molecule*“ (Iba-1) gerichtete anti-Iba-1-AK verwendet. Die Färbung lief größtenteils analog zu der in Abschnitt 3.3.4.1 beschriebenen GFAP-Färbung ab. Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert und anschließend zur Antigendemaskierung für 10 min in 10 mM Natriumcitratpuffer, pH 6,0, gekocht. Nach 20-minütiger Abkühlungsphase, Blockierung endogener Peroxidaseaktivität und Vorinkubation in 3 %-igem FKS/PBS (siehe Abschnitt 3.3.4.1) erfolgte die Inkubation mit dem Primäantikörper anti-Iba-1 (Verdünnung 1:1000 in

3 %-igem FKS/PBS; siehe Tabelle 2) ü.N. bei 4 °C. Die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper anti-Kaninchen (Verdünnung 1:500 in 3 %-igem FKS/PBS; Tabelle 3) wurde für 30 min bei 37 °C durchgeführt. Gefolgt von der Zugabe des Streptavidin-HRP-Konjugates aus dem TSA-Kit wurden die Schnitte für 1 Stunde bei RT (Verdünnung 1:200 in 3 %-igem FKS/PBS; siehe Tabelle 3) inkubiert. Es folgte eine Tyramid-Farbverstärkung (1:100 biotinyliertes Tyramid plus 0,0015 % H₂O₂ in Amplifikationspuffer) für 10 min bei RT. Es schlossen sich die Inkubation des Streptavidin-HRP-Konjugates für 1 Stunde bei 37 °C (Verdünnung 1:200 in 3 %-igem FKS/PBS; siehe Tabelle 3) und die Färbung mit 3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) für 3 min an (siehe Tabelle 9 und Tabelle 10). Die Gegenfärbung erfolgte mit Häkalaunlösung für 30 s. Nach Dehydrierung wurden die Schnitte mit D.P.X. luftblasenfrei eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte analog zu der für Astrozyten beschriebenen Methode unter Verwendung des Programmes ImageJ. Bestimmt wurden die Mikroglia bedeckten Flächen im Bereich des Hippocampus und des M2-Cortex pro mm².

3.3.4.3. Nachweis von A β - und Amyloid-Plaques mittels Antikörper und Kongorot-Färbung

Zum Nachweis von Beta-Amyloid (A β) Plaques wurde der anti-Beta-Amyloid 4G8-AK eingesetzt. Dieser erkennt spezifisch die AS 17-24 des A β -Peptids. Die Färbung lief größtenteils analog zu der in Abschnitt 3.3.4.1 beschriebenen GFAP-Färbung ab. Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert und anschließend zur Antigendemaskierung 10 min bei RT in 70 %-iger Ameisensäure inkubiert. Nach der Blockierung endogener Peroxidaseaktivität und Vorinkubation in 3 %-igem FKS/PBS (siehe Abschnitt 3.3.4.1) erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-Beta Amyloid (A β), 17-24 (4G8) (Verdünnung 1:500 in 3 %-igem FKS/PBS; siehe Tabelle 2) ü.N. bei 4 °C. Die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper anti-Maus (Verdünnung 1:100 in 3 %-igem FKS/PBS; siehe Tabelle 3) wurde für 30 min bei 37 °C durchgeführt. Es schlossen sich die Inkubation des Streptavidin-HRP-Konjugates für 1 Stunde bei 37 °C (Verdünnung 1:200 in 3 %-igem FKS/PBS; siehe Tabelle 3) und die Färbung mit DAB für 3 min an (siehe Tabelle 9 und Tabelle 10). Die Gegenfärbung erfolgte mit Häkalaunlösung für 30 s. Nach Dehydrierung wurden die Schnitte mit D.P.X. luftblasenfrei eingedeckt.

Die durchgeführte Kongorot-Färbung wurde an die Veröffentlichungen von Chauhan et al. und Wilcock et al. (Chauhan et al., 2004; Wilcock et al., 2006) angelehnt. Die entparaffinierten Schnitte wurden für 20 min in alkalisch gesättigter NaCl-Lösung inkubiert. Der Kongorot-Stammlösung wurde nach Filtration vor Gebrauch 2 ml 1 M NaOH zugegeben.

Die Schnitte wurden 30 min bei RT in der Kongorot-Färbelösung inkubiert und anschließend kurz in ddH₂O gewaschen, mit Mayers Hämalaun-Lösung gegengefärbt und nach Dehydrierung mit D.P.X. überschichtet und luftblasenfrei eingedeckt.

Auch die A β - und Amyloid-Plaquelastung wurde mit dem Programm ImageJ ausgewertet und die Anzahl der A β - und Amyloid-Plaques im Bereich des Hippocampus und des M2-Cortex pro mm² bestimmt.

3.3.4.4. Paraffin-Embedded Tissue (PET)-Blot

Der PET-Blot wurde zum Nachweis von PrP^{Sc} eingesetzt. Er ermöglichte die Differenzierung zwischen zellulärem PrP^C und seiner pathologischen Isoform, dem PrP^{Sc}. Durch die Behandlung der Gewebeschnitte mit PK wurde PrP^C verdaut, so dass in der anschließenden immunhistochemischen Färbung ausschließlich die pathologische Isoform PrP^{Sc} detektiert wurde. Zum Erhalt ihrer Morphologie wurden die Gewebeschnitte auf Nitrocellulosemembranen aufgezogen. Für die Durchführung des PET-Blots wurde ein modifiziertes Protokoll von Schulz-Schaeffer und Kollegen (Schulz-Schaeffer et al., 2000) verwendet. Zunächst wurden die Schnitte für 2-mal 5 min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Isopropanolreihe (95 %, 80 %, 70 %, 50 %) für je 5 min inkubiert. Anschließend wurden sie für 2-mal 10 min in 0,1 %-igem Tween-20/ddH₂O permeabilisiert. Die Membranen wurden für 10 min bei 55 °C getrocknet, zugeschnitten und in 8-Well Platten auf einen Schüttler überführt, auf dem anschließend ein Waschschrift (3-mal 10 min in TBST) durchgeführt wurde. Danach folgte der PK-Verdau (25 µg/ml in PK-Puffer) für 2 Stunden bei 55 °C, an dem sich wiederum ein Waschschrift (3-mal 10 min mit TBST) anschloss. Zur Denaturierung des PrP^{Sc} wurden die Schnitte für 10 min bei RT in 3 M Guanidin-Thiocyanat in Tris-Puffer inkubiert. Auf einen weiteren Waschschrift (3-mal 10 min in TBST) folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen in 0,2 %-igem Casein/TBST für 30 min bei RT. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (RKL-eigener Antikörper) „Hans2“ (1:10000 in 0,2 %-igem Casein/TBST; siehe Tabelle 2) oder 6H4 (Verdünnung 1:5000 in 0,2 %-igem Casein/TBST) erfolgte ü.N. bei 4 °C. Nach einem Waschschrift (3-mal 10 min mit TBST) wurden die Schnitte für 1 Stunde bei RT mit dem alkalisch Phosphatase konjugierten Zweitantikörper anti-Kaninchen-AP (Verdünnung 1:5000 in 0,2 %-igem Casein/TBST; siehe Tabelle 3) inkubiert. Es folgten ein Waschschrift (3-mal 10 min mit TBST) und die Zugabe der Vorinkubationslösung NTM für 2-mal 10 min. Die anschließende Färbung wurde mit NBT/BCIP für 10 min bei RT durchgeführt. Die Farbreaktion wurde mit Stopplösung für 5 min bei RT gestoppt und die Schnitte 3-mal kurz in ddH₂O gespült. Im weiteren Verlauf wurden die Membranen für 1 Stunde bei 55 °C getrocknet und zum Glätten zwischen zwei

Objektträgern eingelegt. Diese wurden mit Klebeband zusammengeklebt, eingescannt und ausgewertet.

Zur Auswertung der PET-Blot-Färbungen wurden mit Hilfe eines Mäusehirnatlas (George Paxinos, 2002) acht anatomische Regionen bestimmt: Cerebellum (Cereb), Medulla oblongata (Med), Mittelhirn (Mh), Thalamus (Th), Hippocampus (Hc), Striatum (Stri), Cortex (Cort) und Bulbus olfactorius (Olf) (siehe Abbildung 32C). Jede der Regionen wurde lichtmikroskopisch bei 40-facher Vergrößerung bzw. eingescannten PET-Blots durchgemustert und der Schweregrad der Veränderung der untersuchten Parameter (PrP^{Sc}-Ablagerungen) bestimmt. Alle Auswertungen wurden an anonymisierten Schnitten von mindestens zwei Untersuchern unabhängig voneinander durchgeführt.

3.4. Proteinbiochemische Methoden

3.4.1. Extraktion von murinem A β -Protein aus Gehirn

3.4.1.1. Extraktion von PBS-löslichem A β

Hirnextrakte wurden von 6-20 Monate alten APP/PS1- und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-transgenen Mäusen sowie von C/EBPD^(-/-)- und WT-Mäusen gewonnen. Dabei wurde mit Hilfe eines Dispergiergerätes [Ultra Turrax (bei ca. 20000 rpm)] 10%-iges (w/v) Hirnhomogenat in sterilem PBS hergestellt, das Protease- (1 Tablette/10 ml PBS, 1x Konz.) und Phosphataseinhibitoren (Phosphatase, 1:100) enthält. Anschließend wurde das Homogenat 3-mal 5 s mittels Ultraschallstab (1 Zyklus; Amplitude 50 %) beschallt und bei 3000 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert (Meyer-Luehmann et al., 2006; Eisele et al., 2009; Langer et al., 2011). Der Überstand (S1-Fraktion) wurde gesammelt, aliquotiert und sofort bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Wenn nichts anderes angegeben wurde, war die S1-Fraktion Ausgangsmaterial für weitere Experimente bzw. Aufreinigungsschritte (z.B. Western Blots, Extraktion von Ameisensäure-löslichem A β).

3.4.1.2. Extraktion von Ameisensäure-löslichem A β

Ausgehend von der S1-Fraktion wurden 500 μ l der S1-Fraktion mittels Ultrazentrifugation (Hitachi CS 150 GX, Tokyo, Japan) bei 100000 x g für 1 Stunde und 4 °C separiert. Der Überstand (S2) wurde eingefroren und die A β -Extraktion mit dem entstandenen Pellet (P2) fortgeführt. Das Pellet wurde in 500 μ l 1 %-iger PBS/SDS (sodium dodecyl sulfate) Lösung resuspendiert und für 3-mal 5 s mittels Ultraschallstab (1 Zyklus; Amplitude 50 %) beschallt und anschließend bei 100000 x g für Stunde und 4 °C zentrifugiert. Der resultierende Überstand (S3) wurde eingefroren und das entstehende Pellet (P3) in insgesamt 100 μ l

88 %-iger Ameisensäure resuspendiert. Anschließend wurden die Proben in einem Ultraschallbad bei 475 W für 5 min und 4 °C beschallt, bevor sie in einem Thermoblock bei 600 rpm für 4 Stunden und 23 °C inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Proben gesammelt, aliquotiert und sofort bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Die folgende Abbildung fasst die einzelnen Schritte der murinen A β -Extraktion zusammen.

Extraktion von murinen A β -Protein aus Gehirn

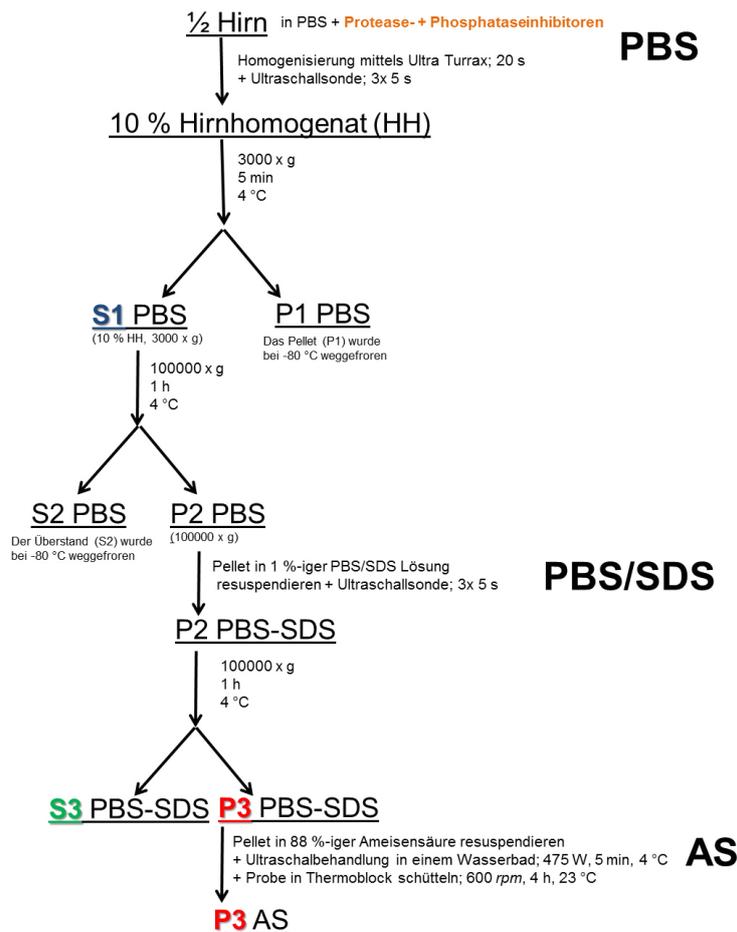


Abbildung 7 Darstellung der Durchführung der einzelnen Extraktionsschritte bei der Extraktion des A β -Proteins

3.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Nach A β -Extraktion (siehe Abschnitte 3.4.1.1 und 3.4.1.2) wurde die Proteinkonzentration mittels des BCA-Protein-Assays in einer 96-Well-Zellkulturtestplatte nach Herstellerangaben bestimmt. Hierbei reduzieren die in der Probe enthaltenen Proteine zweiwertige Cu²⁺ zu einwertigen Cu¹⁺. Bicinchoninsäure (BCA) reagiert mit einwertigen Kupferionen zu einem violetten Farbstoff (Cu¹⁺-Bicinchoninsäure-Komplex), dessen Absorption quantitativ mittels eines ELISA Readers bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch bestimmt und unter Verwendung von bekannten Standards ausgewertet wurde.

3.4.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Herstellung von 10 %- bzw. 12,5 %-igen SDS-PAGE-Gelen (Laemmli, 1970) wurde zunächst das Trenngel (3,2 ml/Gel) gegossen und vorsichtig mit Isopropanol überschichtet. Nach 30-minütiger Auspolymerisierung bei RT wurde das Isopropanol restlos entfernt. Das 5 %-ige Sammelgel wurde anschließend auf das Trenngel gegossen und mit einem Taschenkamm bestückt. Die Gele polymerisierten weitere 30 min bei RT aus, bevor sie für die entsprechenden Versuche bereit standen.

Nachfolgend sind die Komponenten zur Herstellung des Trenn- bzw. Sammelgels aufgelistet.

12,5 %-iges Trenngel (für 2 Gele/ Spacer 0,75 mm)

4,3 ml	ddH ₂ O
+ 2,5 ml	Trenngelpuffer
+ 3,1 ml	40 %-iges Acrylamid/ Bisacrylamid (37,5:1)
+ 50 µl	20 %-iges SDS
+ 30 µl	10 %-iges Ammoniumpersulfat (APS)
+ 10 µl	Temed

10 %-iges Trenngel (für 2 Gele/ Spacer 0,75 mm)

4,9 ml	ddH ₂ O
+ 2,5 ml	Trenngelpuffer
+ 2,5 ml	40 %-iges Acrylamid/ Bisacrylamid (37,5:1)
+ 50 µl	20 %-iges SDS
+ 30 µl	10 %-iges APS
+ 10 µl	Temed

5 %-iges Sammelgel

6,14 ml	ddH ₂ O
+ 2,5 ml	Sammelgelpuffer
+ 1,25ml	40 %-iges Acrylamid/ Bisacrylamid (37,5:1)
+ 50 µl	10 %-iges APS
+ 10 µl	Temed

3.4.2.2. Schägger-Jagow Gele

Zur Größenauftrennung besonders kleiner Proteine (5-20 kDA, z.B. A β -Protein), wurde ein von Schägger und Jagow (Schagger and von Jagow, 1987) entwickeltes Gelsystem modifiziert und verwendet. Es ist speziell zum Nachweis von oligomeren und monomeren A β -Protein geeignet und mit einem SDS-PAGE Gelsystem vergleichbar. Als Besonderheit wurden zwei unterschiedliche Laufpuffer, ein Innen- und ein Außenlaufpuffer, eingesetzt. Lediglich im Innenlauf- und dem Probenpuffer war SDS enthalten. Zunächst wurde das 16 %-ige Trenngel (3,2 ml/Gel) und anschließend direkt darauf vorsichtig das 4 %-ige Sammelgel gegossen und der Taschenkamm eingesteckt. Die Polymerisierungszeit betrug 20 min bei 55 °C.

16,5 %-iges Trenngel (für 2 Gele/ Spacer 0,75 mm)

3,5 ml	48 % Acrylamid/1,5 % Bisacrylamid
+ 3,5 ml	Gelpuffer
+ 3,5 ml	32 %-iges Glycerol
+ 50 µl	10 %-iges APS
+ 10 µl	Temed

4 %-iges Sammelgel

1,5ml	48 % Acrylamid/1,5 % Bisacrylamid
+ 2,5ml	Gelpuffer
+ 3,5ml	ddH ₂ O
+ 50µl	10 %-iges APS
+ 10µl	Temed

3.4.2.3. Probenvorbereitung A β

Zur Probenvorbereitung (siehe Abschnitt 3.4.1) wurden, wenn nicht anders angegeben, 20 µg Proteinlysate der S1- Fraktion eingesetzt und 2- oder 4-fach konzentrierter LPP-Probenpuffer sowie Harnstoff (0,5 M Endkonzentration) zugegeben. Bei der Untersuchung des Ameisensäure-löslichen A β (2 µl) wurde die Ameisensäure-Fraktion zuvor mit 25 µl 2 M Tris neutralisiert und im Anschluss mit 27 µl 2-fach konzentriertem LPP-Probenpuffer versetzt. Die Probenansätze wurden für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Gele wurden in die Laufvorrichtung eingespannt und mit dem entsprechenden Laufpuffer befüllt. Es folgte die Beladung der zu untersuchenden Proben, Markern und Standards. Für die SDS-PAGE Gele betrug die Laufzeit 15 min bei 100 V und 35 min bei 200 V. Die Schagger-Jagow Gele liefen für 15 min bei 80 V und anschließend 105 min bei 120 V.

3.4.2.4. Probenvorbereitung PrP^{Sc}

Für Western Blot-Analysen von PK-resistenten-PrP^{Sc} wurde ein 10 %-iges Hirnhomogenat in Homogenisierungspuffer (0,5 % Triton X-100, 0,05 % SDS in PBS) hergestellt. Dazu wurde ein halbes Hirn (~ 250 mg) in 2,25 ml Homogenisierungspuffer überführt, für 3-mal 5 s (1 Zyklus; Amplitude 50 %) beschallt und anschließend einem PK-Verdau (siehe Tabelle 11) in einem Thermoblock für 1 Stunde und 37 °C bei 650 rpm unterzogen (Baier et al., 2003; Riemer et al., 2008).

Tabelle 11 Darstellung eines Pipettieransatzes für einen PK-Verdau

	PK+	PK-
10 % Hirnhomogenat (100 µg/ µl)	50 µl	50 µl
13 %-iges Sarkosyl (N-Lauroylsarcosine-sodium-salt)	5 µl	5 µl
Proteinase K (PK) (1 µg/ ml)	10 µl	-
ddH ₂ O	-	10 µl
	1 Stunde (h) bei 37 °C und 650 rpm	Auf Eis
2x LPP	85 µl	85 µl
	5 min, 95 °C erhitzen	

Nach dem PK-Verdau wurden die zu untersuchenden Proben, der Marker und die Standards auf ein 12,5 %-iges SDS-PAGE Gel geladen und für 15 min bei 100 V und für weitere 35 min bei 200 V aufgetrennt.

3.4.3. Western Blot

Zum Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde das Fastblot System der Firma Biometra GmbH verwendet. Die PVDF-Membran wurde zunächst für 5 min in 100 %-igem Methanol aktiviert und anschließend in Blotpuffer mit 20 %-igem Methanol überführt. Die verwendete Anode bildete die Unterseite und die Kathode die Oberseite des Sandwiches. Das „Blotting-Sandwich“ setzte sich aus zwei in Blotting-Puffer getränkten Lagen Filterpapier, der PVDF-Membran, dem luftblasenfrei positionierten Gel und zwei weiteren Lagen Filterpapier zusammen. Das Fastblot System transferierte die Proteine binnen 30 min bei 300 mA (pro Membran) auf die PVDF-Membran. Nach dem Elektroblooming folgte der 30 minütige Blockierungsschritt mit 3 %-iger Magermilch, 5 %-igem BSA oder 5 %-igem Slim-Fast (Schoko) in 0,05 %-igem TBST-Puffer. Bei der Verwendung des Schagger-Jagow Gelsystems wurde die PVDF-Membran nach dem Blotting für 5 min in PBS gekocht bevor der Blockierungsschritt folgte. Die Inkubation mit den verwendeten Primärantikörpern (siehe Tabelle 2) fand ü.N. bei 4 °C statt. Am darauffolgenden Tag wurde nicht gebundener AK durch dreimaliges Waschen für 10 min mit TBST-Puffer entfernt. Nach einem weiteren 10-minütigen Blockierungsschritt mit 3 %-iger Magermilch in 0,05 %-igem TBST-Puffer, folgte die Inkubation für 1 Stunde bei RT mit dem entsprechenden sekundären AK (siehe Tabelle 3), welcher mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt war. Nach der Inkubation wurden nicht gebundene sekundäre AK durch dreimaliges Waschen für 10 min mit TBST-Puffer entfernt. Die Membran wurde zweimal für je 5 min mit Assay-Puffer gewaschen, bevor sie für 5 min mit dem chemilumineszenten Substrat CDP-Star (0,25 mM in Assay-Puffer) inkubiert wurde. Entsprechend der Stärke des Signals wurde die Expositionsdauer auf 15 s, 30 s, 1 min, 2 min oder 5 min festgelegt.

Zur nochmaligen Verwendung der Blots wurden die gebundenen AK durch Inkubation in Stripping-Buffer für 1 Stunde bei 55 °C entfernt.

Die Menge an geladenem Protein wurde mittels dem anti- β -Aktin AK kontrolliert.

3.4.3.1. Quantifizierung der mittels Western Blot detektierten Proteine

Die Quantifizierung und Analyse der erhaltenden Bandenintensitäten der untersuchten Proben wurden mittels der Quantity One Software nach Herstellerangaben (Bio-Rad Laboratories Inc.) durchgeführt.

3.5. Molekularbiologische Methoden

3.5.1. DNA-Isolierung und Genotypisierung

Die genomische DNA wurde aus Ohrproben mittels des säulen-basierenden QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert.

Die Überprüfung des Genotyps der Tiere erfolgte mittels PCR unter Verwendung genspezifischer Primer (siehe Tabelle 1).

Der PCR-Ansatz und die Laufbedingungen sind im Folgenden aufgelistet.

PCR-Ansatz:

10 µl 2x RED PCR-Mix
 + 0,8 µl Primer (10 µM)
 + 0,8 µl Primer (10 µM)
 + 7,9 µl ddH₂O
 + 0,5 µl DNA
 Σ 20 µl

PCR-Bedingungen:

1.) 2 min; 97 °C
 2.) 30 s; 95 °C
 3.) 30 s; 63 °C
 4.) 30 s; 72 °C
 5.) 7 min; 72 °C
 6.) Pause; 4 °C

} 2.)- 4.) 35x

Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 2 %-igem Agarosegel für 40 min bei 100 V.

3.5.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkultur und aus Hirngewebe

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkultur wurde das auf säulen-basierende InviTrap Spin Cell RNA Mini Kit der Firma Stratec Molecular GmbH genutzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die RNA-Konzentration und Qualität der Proben wurden unter Verwendung des NanoDrop-Photometers bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Hirngewebe wurde das TRIzol Reagenz der Firma Invitrogen genutzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Hierzu wurden die Gehirne in 15 ml Röhrchen mit 1 ml TRIzol/100 mg Gewebe mittels Ultra-Turrax für 3-mal 10 s homogenisiert. Um den entstandenen Schaum zu brechen wurden die Homogenate 1 bis 3 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben nach Resuspendierung in Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in neue Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei RT inkubiert. Zur Trennung der Phasen wurden pro Gefäß 0,2 ml Chloroform zugegeben und 15 s geschwenkt. Nach dreiminütiger Inkubation bei RT wurden die Proben 15 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der RNA-Überstand (wässrige Phase) wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Anschließend wurde jeder Probe 0,5 ml Isopropanol zugesetzt und 15 s geschwenkt. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurden die Proben bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene RNA-Pellet mit 1 ml eiskaltem 70 %-igem Ethanol gewaschen. Hierzu wurde 5 min bei 7500 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte die Trocknung der RNA-Pellets und die Resuspendierung in 100 µl RNase-freiem Wasser. Die RNA-Konzentration wurde unter Verwendung des NanoDrop-Photometers bestimmt und bis zur weiteren Verwendung lagerten die Proben bei -80 °C.

3.5.3. Reinigung der Gesamt-RNA von genomischer DNA und Reverse Transkription

Sowohl der genomische DNA-Verdau als auch die Reverse Transkription der Gesamt-RNA in cDNA erfolgte mittels des QuantiTect Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen. Dabei wurden aus Zellen 0,5 µg Gesamt-RNA und aus Gewebe 1 µg Gesamt-RNA einem DNase-I-Verdau unterzogen, um mögliche Kontaminationen genomischer DNA zu eliminieren. Die Umschreibung der RNA in cDNA fand in einem 20 µl Reaktionsvolumen statt und erfolgte nach Herstellerangaben.

Verdau genomischer DNA:

- 10 min bei 42 °C
- auf Eis lagern

Folgende Parameter wurden für die RT-PCR gewählt:

- 30 min bei 42 °C
- 3 min bei 95 °C
- halten bei 4 °C

Der Erfolg der Umschreibung von RNA in cDNA wurde mittels einer β -Aktin Kontroll-PCR überprüft.

PCR-Ansatz:

10 µl 2x RED PCR-Mix
 + 0,8 µl Primer a (10 µM)
 + 0,8 µl Primer b (10 µM)
 + 7,9 µl ddH₂O
 + 0,5 µl cDNA
 Σ 20 µl

PCR-Bedingungen:

10 min; 95 °C
 45 s; 95 °C
 30 s; 52 °C
 1 min; 72 °C

} 35x

Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1,4 %-igem Agarosegel für 40 min bei 100 V.

3.5.4. Expressionsanalysen mittels Real-Time PCR

Die Quantifizierung der Expression ausgesuchter Zielgene aus cDNA erfolgte mittels Real-Time PCR unter Verwendung des TaqMan[®]-Assays bzw. SYBR[®] Green Dye-Based Gene Expression Detection Kit von Applied Biosystem. Grundlage der Real-Time PCR ist eine konventionelle PCR unter Verwendung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs (z.B. FAM oder SYBR Green I), welcher an die doppelsträngige DNA der entstehenden PCR-Produkte bindet und ein Fluoreszenzsignal emittiert. Dieses Fluoreszenzsignal wird während der PCR, also in Echtzeit (Real-Time) nach Anregung durch einen Laser emittiert und mit Hilfe eines Detektionssystems, und einer Detektionssoftware als Verlaufskurve aufgezeichnet. Dabei erfolgt die Zunahme des Fluoreszenzsignals proportional zur Zunahme an vervielfältigtem Produkt in einem exponentiellen Verlauf. Das entspricht im Idealfall einer Verdoppelung der Zielsequenz (Template) während eines Zyklus.

Der TaqMan[®]-Assay beinhaltet zusätzlich zu den anderen Komponenten einer Real-Time-PCR eine für ein Zielgen Exon-Exon spezifische Sonde, welche die Spezifität der Methode erhöht. Bestandteile der Sonde sind ein Reporter und ein Quencher. Befinden sich beide in räumlicher Nähe, absorbiert der Quencher das vom Reporter emittierte Signal. Wird die Zielsequenz im Laufe der stattfindenden PCR zu einem Doppelstrang synthetisiert und kommt die verwendete Taq-Polymerase in die Nähe der Sonde, wird der Quencher durch die 5'-3' Exonukleasefunktion der Taq-Polymerase hydrolysiert, so dass dieser nicht mehr in räumlicher Nähe zum Reporter ist. Durch diesen Vorgang emittiert der mittels Laser angeregte Reporter nun ein Signal, das mit Hilfe eines entsprechenden Detektionssystems aufgezeichnet wird.

Die eingesetzte Taq-DNA Polymerase liegt zunächst in einer inaktiven Form vor und wird erst bei 95 °C aktiviert. Dieser sogenannte „hot start“ der PCR hat den Vorteil, dass Fehlhybridisierungen der Primer verhindert und dadurch die Spezifität erhöht wird. Um mögliche Kontaminationen durch PCR-Produkte aus vorherigen Ansätzen (carry-over contamination) zu eliminieren, wurde vor Beginn der eigentlichen PCR ein Uracil-N-Glykosylase (UNG)-Verdau durchgeführt.

In einer Dreifachbestimmung wurden von den untersuchten Proben die Genexpression der Zielgene durch das TaqMan-ABI7500- und Stratagene-MX3000P-Detektionssystem dokumentiert. Um Kontaminationen mit Fremd-DNA bei der cDNA-Synthese ausschließen zu können, wurden jeweils Negativkontrollen mitgeführt. Der Master-Mix wurde für alle zu vergleichenden Proben zusammen angesetzt und in entsprechende optische 96-Well-Platten vorgelegt. Zusätzlich wurde bei der Verwendung des SYBR[®] Green Dye-Based Gene Expression Detection Kit am Ende der Real-Time PCR eine Schmelzkurve aufgenommen,

um mögliche falschpositive Signale auszuschließen, die eventuell durch Primerdimere entstehen könnten.

Folgende Parameter wurden für die Real-Time PCR gewählt:

<u>PCR-Ansatz für TaqMan</u>	<u>PCR-Bedingungen:</u>
9 µl TaqMan Gene Expression Master Mix (2x)	2 min; 50 °C
+ 0,9 µl TaqMan Gene Expression Assay (20x)	10 min; 95 °C
+ 8,1 µl ddH ₂ O	15 s; 95 °C
+ 2 µl cDNA (1:10)	1 min; 60 °C
Σ 20 µl	40 x

<u>PCR-Ansatz für SYBR-Green</u>	<u>PCR-Bedingungen:</u>
10 µl SYBR Select Master Mix (2x)	2 min; 50 °C
+ 0,3 µl Forward Primer (20 µM)	2 min; 95 °C
+ 0,3 µl Reverse Primer (20 µM)	15 s; 95 °C
+ 7,4 µl ddH ₂ O	1 min; 60 °C
+ 2 µl cDNA (1:10)	40 x
Σ 20 µl	

Zur Auswertung wurde ein Schwellenwert t (Threshold) der Fluoreszenz festgelegt. Ziel dieser Festlegung war es ein „echtes“ Signal von Hintergrundsignalen zu unterscheiden. Die Anzahl der Zyklen, die nötig sind, um den Schwellenwert zu erreichen, werden als Ct-Wert bezeichnet. Die Auswertesoftware zeichnete die Zunahme an Fluoreszenz auf und zeigte den Ct-Wert jeder Probe für den vom Benutzer definierten Schwellenwert an. Je niedriger der Ct-Wert der Probe war, desto höher war die Expression des untersuchten Gens. Im logarithmischen-linearen Verlauf der Kurve bedeutete jeder Zyklus (x) eine Verdopplung des Templates (Formel: 2^x).

Die Datenauswertung erfolgte durch die modifizierte Anwendung der $\Delta\Delta Ct$ -Methode (Pfaffl, 2001). Dabei wurden zwei endogene „Haushaltsgene“, hier Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und Beta-Aktin (β -Aktin) mitquantifiziert, um die unterschiedlichen Mengen an eingesetzter DNA und die Effizienz der Reversen Transkription zu kompensieren. Die Ergebnisse wurden auf diesen Referenzwert (bestehend aus GAPDH und β -Aktin) normalisiert. Eine Quantifizierung der Signale wurde dadurch erreicht, dass der Schwellenwert (Threshold) an den Beginn der exponentiellen Phase der PCR gesetzt und der Zyklus (Ct) bestimmt wurde, bei dem der Wert diesen Schwellenwert (Threshold) übersteigt. Um ΔCt zu berechnen, wurde der jeweils für GAPDH und β -Aktin erhaltende Ct-Wert arithmetisch gemittelt und von dem Ct-Wert des Zielgenes subtrahiert. Die Zunahme der Expression des Zielgenes wurde mittels folgender Formel berechnet: $2^{-(\Delta Ct1 - \Delta Ct2)}$, wobei es sich bei $\Delta Ct1$ um den normalisierten Wert des Zielgenes und bei $\Delta Ct2$ um den normalisierten Kontrollprobenwert handelt (Pfaffl, 2001).

3.5.5. Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Das Einbringen von Plasmid DNA in kompetente Bakterienzellen erfolgte mittels Hitzetransformation. Zunächst wurden 50 µl kompetenter *E.coli* Bakterienzellen auf Eis aufgetaut, 1 µl Plasmid DNA hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 30 s bei 42 °C ein Hitzeschock durchgeführt. Der Ansatz wurde für 2 min auf Eis inkubiert, 250 µl SOC-Medium hinzugefügt und für 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Folgend wurde der Transformationsansatz in verschiedenen Verdünnungen auf Agar-Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.5.6. Plasmidisolierung

Von einer *E.coli* Übernachtskultur erfolgte die Präparation von Plasmid DNA mittels dem auf säulen-basierenden NucleoSpin® Plasmid bzw. NucleoBond® Xtra Midi Kit von Macherey Nagel. Die photometrische Bestimmung der Reinheit sowie der DNA Konzentration wurde unter Verwendung des NanoDrop-Photometers durchgeführt.

3.5.7. Restriktionsverdau und Gelelektrophorese von Plasmid-DNA

In einem 50 µl Restriktionsverdau wurde 1 µg Plasmid DNA, 1x Reaktionspuffer sowie die entsprechenden Restriktionsendonukleasen (10 U) eingesetzt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach dem Verdau wurden dem Ansatz 5 µl 10x Bromphenolblau (BPB) zugegeben und 15 µl des Ansatzes auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte für 1 Stunde bei 120 V.

3.6. Zellkulturtechniken

3.6.1. Herstellung primärer, muriner Mixed-Glia-Zellkulturen

Die Isolierung primärer, muriner Mixed-Glia-Zellen (bestehend aus Astrozyten und Mikroglia) wurde nach einem modifizierten Protokoll von Floden und Combs bzw. Chen und Kollegen (Floden and Combs, 2007; Chen et al., 2012) durchgeführt. Das Gehirn von 0 bis max. 3 Tage alten neonatalen C/EBPD^(-/-)- und WT- Mäusen wurde freipräpariert und die Hirnhäute entfernt. Der Cortex, das Kleinhirn und das Stammhirn eines Tieres wurden in einem mit „Hank's Balanced Salt Solution“ (HBSS) mit Mg²⁺(1,26 mM) und Ca²⁺(0,49 mM) befüllten 15 ml Tube gesammelt. Die HBSS-Lösung wurde durch eine HBSS Lösung ohne Mg²⁺ und Ca²⁺ ersetzt. Anschließend wurde die HBSS-Lösung bis auf ein Volumen von 2 ml abgenommen und 1 ml einer 0,25 %-igen Trypsin/EDTA Lösung hinzugegeben. Der Ansatz inkubierte für 12 min bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad. Der Trypsin-Verdau wurde durch die Zugabe von 6 ml Wachstumsmedium gestoppt. Die Lösung wurde bis auf ein Volumen von 4 ml abgenommen und 20 µl DNase I (10 mg/ml, Roche) hinzugefügt. Das

Gewebe wurde durch vorsichtiges auf- und abpipettieren dissoziiert und anschließend mit Wachstumsmedium aufgefüllt. Die dissoziierten Zellen wurden bei 300 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet in 5 ml Wachstumsmedium resuspendiert und durch ein 70 µm Zellsieb (BD Falcon) gedrückt. Die Zellsuspension wurde in eine mit Poly-L-Lysine (0,1 mg/ml) vorbehandelte 75 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Die Zellen wurden in DMEM-Medium plus 10 % (v/v) FKS bei 37 °C, 95 %-iger Luftfeuchtigkeit und 5 %-igem CO₂-Gehalt kultiviert. Einen Tag nach Isolierung der Zellen wurde das komplette Wachstumsmedium vorsichtig durch frisches Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für 10 bis 14 Tage ohne Mediumwechsel kultiviert und wie in Abschnitt 3.6.4 beschrieben passagiert. Für Expressions- (quantitativer Real-Time PCR; siehe Abschnitt 3.5.4) bzw. Proteinstudien (Western Blotting; siehe Abschnitt 3.4.3) wurden die RNA (siehe Abschnitte 3.5.2 und 3.5.3) bzw. die Proteine (siehe Abschnitt 3.6.2) isoliert.

3.6.2. Proteinisolierung und Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Proteingewinnung wurden ca. $3,5 \times 10^5$ Zellen in einer Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät und bei 37 °C, 95 %-iger Luftfeuchtigkeit und 5 %-igem CO₂-Gehalt kultiviert. Mit dem Erreichen der vollständigen Konfluenz wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 250 µl Lysepuffer, der Protease- (1 Tablette/10 ml PBS, 1x Konz.) und Phosphataseinhibitoren (Phosphatase, 1:100) enthielt. Die lysierten Zellen wurden mittels Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst, in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden kurz durchgemischt und 10 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dessen Proteingehalt (Konzentration) mittels BCA-Methode (siehe Abschnitt 3.4.2) bestimmt.

3.6.3. Kultivierung von U-373 MG Zellen

U-373 MG Zellen wurden in DMEM Medium plus 10 % (v/v) FKS bei 37 °C, 95 %-iger Luftfeuchtigkeit und 5 %-igem CO₂-Gehalt kultiviert. Mit dem Erreichen von etwa 90 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. In der Regel wurde an jedem dritten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.6.4. Passagieren von primären Mixed-Glia- und U-373 MG Zellen

Zum Passagieren der Zellen wurde zunächst das Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA versetzt und für 3 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 3 min wurde der Fortschritt

des Ablöseprozesses, welcher durch das Abrunden der Zellen charakterisiert ist, mikroskopisch kontrolliert und durch Schlagen mit der flachen Hand auf die Seite der Zellkulturflasche verstärkt. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von FKS-haltigen Wachstumsmedium. Im Anschluss wurden die Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1000 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Wachstumsmedium aufgenommen und ein Teil der Zellsuspension wieder in eine mit frischem Wachstumsmedium befüllte Zellkulturflasche resuspendiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 95 %-iger Luftfeuchtigkeit und 5 %-igem CO₂-Gehalt.

3.6.5. Transfektion von U-373 MG Zellen

Unter dem Begriff der Transfektion versteht man die Übertragung genetischer Information in eine Zelle mittels eines Vektors. In dieser Arbeit wurde die Lipofektion gewählt, die eine transiente Expression des eingebrachten DNA-Fragmentes erlaubt. Die Überexpression des Transkriptionsfaktors C/EBPD wurde durch Transfektion eines C/EBPD-kodierenden Vektors (pCMV6 huC/EBPD) in die Zelllinie U-373 MG durchgeführt. Als Kontrollvektor wurde der pcDNA3.1 Vektor verwendet.

Abbildung 8 zeigt die durchgeführte Transfektion schematisch.

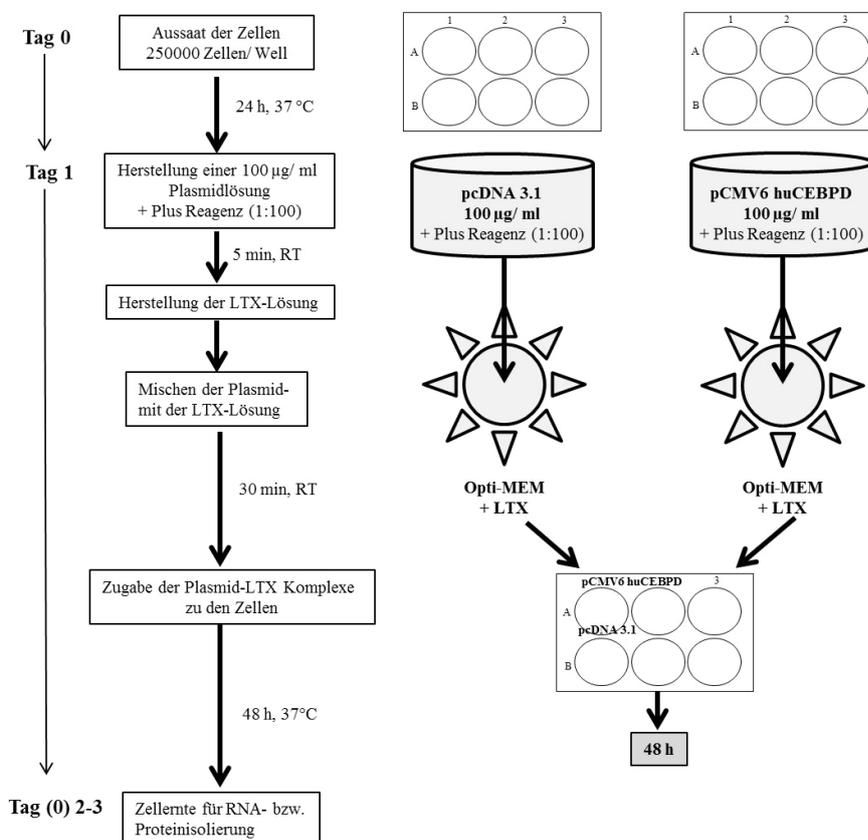


Abbildung 8 Darstellung der durchgeführten Transfektion

An Tag 0 wurden für einen Transfektionsansatz 250000 Zellen in 2 ml DMEM Medium pro Well in einer 6-Well Zellkulturtestplatte ausgesät. An Tag 1 wurden die Transfektionsansätze für beide Vektoren hergestellt. Dazu wurde je 200 µl einer 100 µg/ml Plasmidlösung angesetzt. Die Verdünnungen erfolgten mit Opti-MEM Medium. Zusätzlich wurde in einem Volumenverhältnis von 1:100 zur Plasmidlösung das PLUS-Reagenz dazugegeben. Die Plasmidlösungen inkubierten für 5 min bei RT. In der Zwischenzeit erfolgte die Herstellung der LTX-Lösung. Dafür wurde zu 200 µl Opti-MEM 66 µl LTX-Lösung pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl der 100 µg/ml Plasmid- /Plus Reagenzlösung zu der LTX-Lösung. In einer Inkubationszeit von 30 min bei RT erfolgte die Komplexbildung zwischen Plasmid DNA und dem LTX Reagenz. Von diesen Komplexen wurden anschließend jeweils 106,5 µl auf die Zellen gegeben. Dies entspricht einem Einsatz von 4,5 µg DNA und 16,5 µl LTX Reagenz pro Transfektionsansatz. Die Ansätze wurden dann für 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 95 %-iger Luftfeuchtigkeit und 5 %-igem CO₂-Gehalt inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 Stunden und 48 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mittels eines Zellschabers geerntet, 5 min bei 1000 x g pelletiert und anschließend deren RNA (siehe Abschnitt 3.5.2) bzw. Protein (siehe Abschnitt 3.6.2) isoliert.

4 Ergebnisse

4.1. Untersuchungen der Rolle von C/EBPD im AD-Modell

Um die Rolle von C/EBPD in der Pathogenese von AD zu untersuchen wurden APP/PS1-Mäuse mit APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen im Verlauf der Plaque- und Krankheitsentwicklung untersucht. In Abbildung 9 ist der experimentelle Versuchsaufbau des untersuchten AD-Modells dargestellt. Die APP/PS1-Mäuse (AD-Modell, siehe Abschnitt 3.1.1) dienten als Kontrollgruppe und wurden mit den APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen zu den Zeitpunkten von 6, 9, 12 und 18 Monaten miteinander verglichen. Es wurden Untersuchungen bezüglich der A β -Plaquerablagerungen, Astrozytose und Mikrogliose durchgeführt sowie Verhaltensunterschiede (Nestbauaktivität, siehe Abschnitt 3.2) und die Körperkonstitutionen (Gewichtsunterschiede, siehe Abschnitt 3.2) erfasst.



APP/PS1

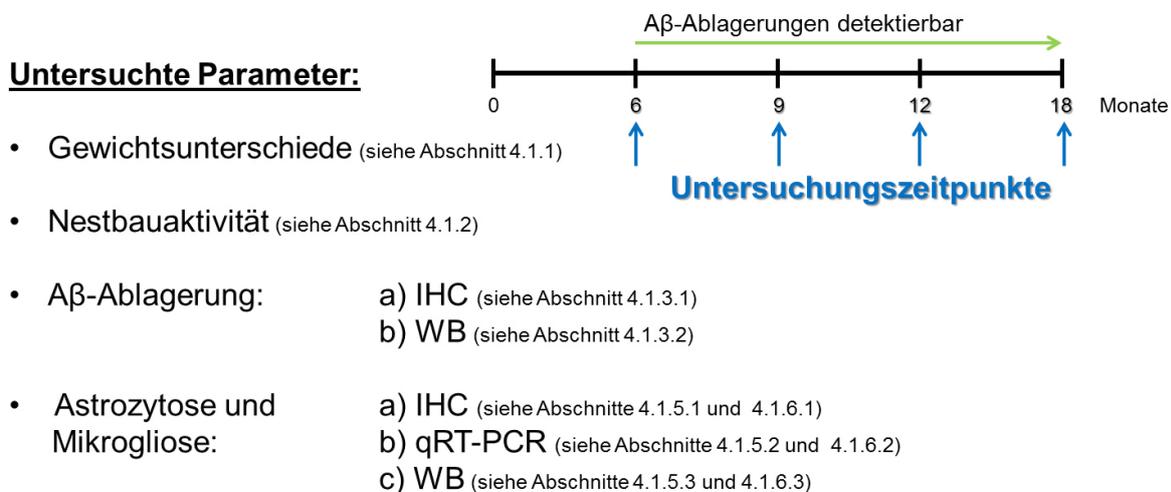
APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)

Abbildung 9 Experimenteller Versuchsaufbau des untersuchten AD-Modells

4.1.1. Gewichtsunterschiede im AD-Modell

Um den Einfluss von C/EBPD auf die Gewichtsentwicklung in der Pathogenese von Alzheimer zu untersuchen, wurden zu vier Zeitpunkten (3, 6, 9 und 12 Monaten) je drei APP/PS1- und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäuse gewogen (siehe Abschnitt 3.2). Wie in Abbildung 10 dargestellt, konnten keine signifikanten Gewichtsunterschiede im AD-Modell festgestellt werden.

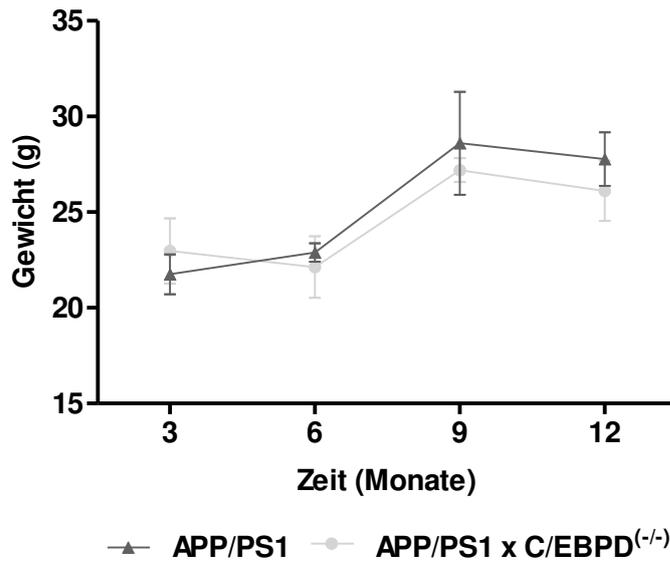


Abbildung 10 Es konnten in den Untersuchungszeiträumen von 3-12 Monaten keine signifikanten Gewichtsunterschiede zwischen APP/PS1- und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen [Anzahl (n)=3] festgestellt werden (Signifikanzwert (p)>0.05; t-Test).

4.1.2. Nestbauaktivität im AD-Modell

Um den Einfluss von C/EBPD auf das Verhalten in der AD-Pathogenese zu untersuchen, wurde die Nestbauaktivität (siehe Abschnitt 3.2) beurteilt. Hierzu wurden zu drei Untersuchungszeitpunkten (3, 6 und 12 Monaten) je drei APP/PS1- und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäuse untersucht. Anhand einer Skala von 1-5 Punkten (siehe Abschnitt 3.2, Tabelle 8) wurde die Qualität des Nestbaus bewertet. Wie in Abbildung 11 dargestellt, nimmt der Nestbau-Score in den APP/PS1-Mäusen bis zum Zeitpunkt von 6 Monaten zu und fällt dann ab. In den APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen nimmt er hingegen bis zum Zeitpunkt von 6 Monaten kontinuierlich ab, um dann wieder zuzunehmen. Dabei zeigten die APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäuse im Vergleich zu APP/PS1-Mäusen im Zeitverlauf von 3 - 6 Monaten ein sich tendenziell verschlechterndes Nestbauverhalten, allerdings war der Aktivitätsunterschied zu keinem Zeitpunkt signifikant. Zum 12-monatigen Zeitpunkt konnte kein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Mäusestämmen festgestellt werden.

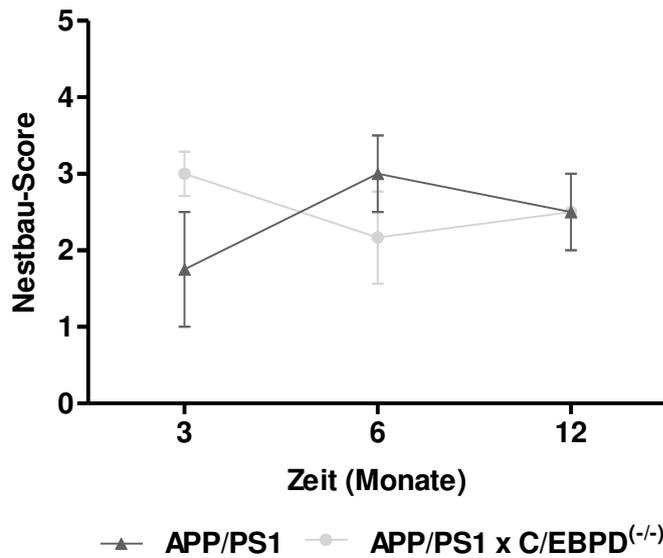


Abbildung 11 Es konnte in dem Untersuchungszeitraum von 3-12 Monaten kein signifikanter Unterschied bezüglich der Nestbauaktivität zwischen APP/PS1- und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen (n=3) festgestellt werden ($p > 0.05$; t-Test).

4.1.3. Plaques (A β -Plaques/ Amyloid-Plaques) im AD-Modell

Bestimmt werden soll, ob C/EBPD einen Einfluss auf die Plaque-Pathologie bzw. A β -Aggregation im untersuchten AD-Modell besitzt. Hierfür wurden die Histochemie und der Western Blot eingesetzt.

Histochemisch wurden zwei Hirnregionen [sekundärer motorischer Cortex (M2-Cortex) und Hippocampus] mit je zwei Auswertungssystemen (1. Anzahl der Plaques pro mm²; 2. Plaquebedeckenden Flächen pro mm²) analysiert. Es wurde die Kongorot-Färbung (siehe Abschnitt 3.3.4.3) durchgeführt und immunhistochemisch der AK 4G8 (siehe Abschnitt 3.3.4.3) eingesetzt. Die A β -Belastung des gesamten Gehirns wurde mittels Western-Blot-Untersuchung und dem AK 6E10 bestimmt und quantifiziert (siehe Abschnitte 3.4.3 und 3.4.3.1).

4.1.3.1. Histochemie

Mit Hilfe des A β -spezifischen AK 4G8 wurden immunhistochemisch A β -Plaques und mittels Kongorot-Färbung histochemisch Amyloid-Plaques von jeweils drei 6, 9, 12 und 18 Monate alten APP/PS1- und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen nachgewiesen. In allen untersuchten Schnitten konnten A β - bzw. Amyloid-Plaques nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14). Abbildung 12 und Abbildung 13 zeigen repräsentative Ergebnisse (für den 6- bzw. 18-monatigen Zeitpunkt) von Cortex (siehe Abbildung 12) bzw. Hippocampus (siehe Abbildung 13). In beiden Abbildungen lassen sich die besonders starken A β - bzw. Amyloid-Ablagerungen gut verfolgen. Die Kleinhirnregion wies leichte und mit zunehmendem Alter stärkere A β - bzw. Amyloid-Ablagerungen auf.

Dabei war die Anzahl der 4G8-positiven Plaques im Gehirn von APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen zu allen Untersuchungszeitpunkten (6-18 Monate) größer, besonders im M2-Cortex (siehe Abbildungen 12A+B und Abbildung 14A). Die Anzahl der A β -immunreaktiven Plaques nahm im Zeitverlauf in den Cortices beider Mäusegruppen zu, war aber in den APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen über alle Altersstufen hinweg (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; bei 6*; 9***; 12*** und 18** Monaten) signifikant höher (siehe Abbildung 12B und Abbildung 14A).

Färbungen von Amyloid-Plaques mit Kongorot bestätigten diese Beobachtungen (siehe Abbildung 12 12C+D und Abbildung 14B). Die Anzahl der Amyloid-Plaques nahm im Zeitverlauf in den Cortices beider Mäusegruppen zu, war über alle Altersstufen hinweg in den APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen (*p<0.05; **p<0.01; bei 6**; 9*; 12** und 18** Monaten) signifikant höher (siehe Abbildung 12D und Abbildung 14B).

Im Hippocampus waren A β -Plaques von der Tendenz her über den Untersuchungszeitraum in den APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen in größerer Zahl vertreten als in der Kontrollgruppe. Allerdings konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied erreicht werden (siehe Abbildung 13A+B und Abbildung 14C).

Die Amyloid-Ablagerungen im Hippocampus waren auch in den APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen generell erhöht (siehe Abbildungen 13C+D und Abbildung 14D) und erreichten zum 18-monatigen Zeitpunkt einen deutlichen signifikanten Unterschied (p<0.01) zwischen beiden untersuchten Gruppen (siehe Abbildung 13D, exemplarische Darstellung des 18-monatigen Zeitpunktes).

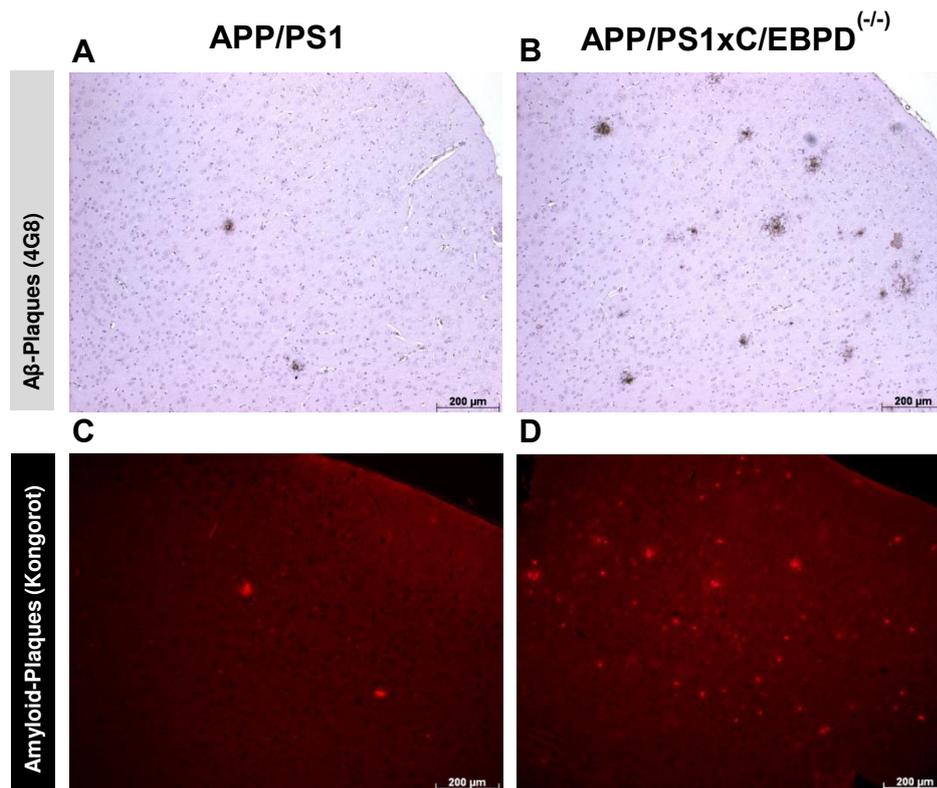


Abbildung 12 (A+B) Immunhistochemischer Nachweis der A β -Plaques mit dem 4G8-AK im M2-Cortex. (C+D) Nachweis von Amyloid-Plaques mit der Kongorot-Färbung. 6 Monate alte APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäuse zeigen eine deutlich erhöhte Anzahl von Plaques, verglichen mit APP/PS1-Mäusen. 100-fache Vergrößerung, Maßstab: 200 μ m.

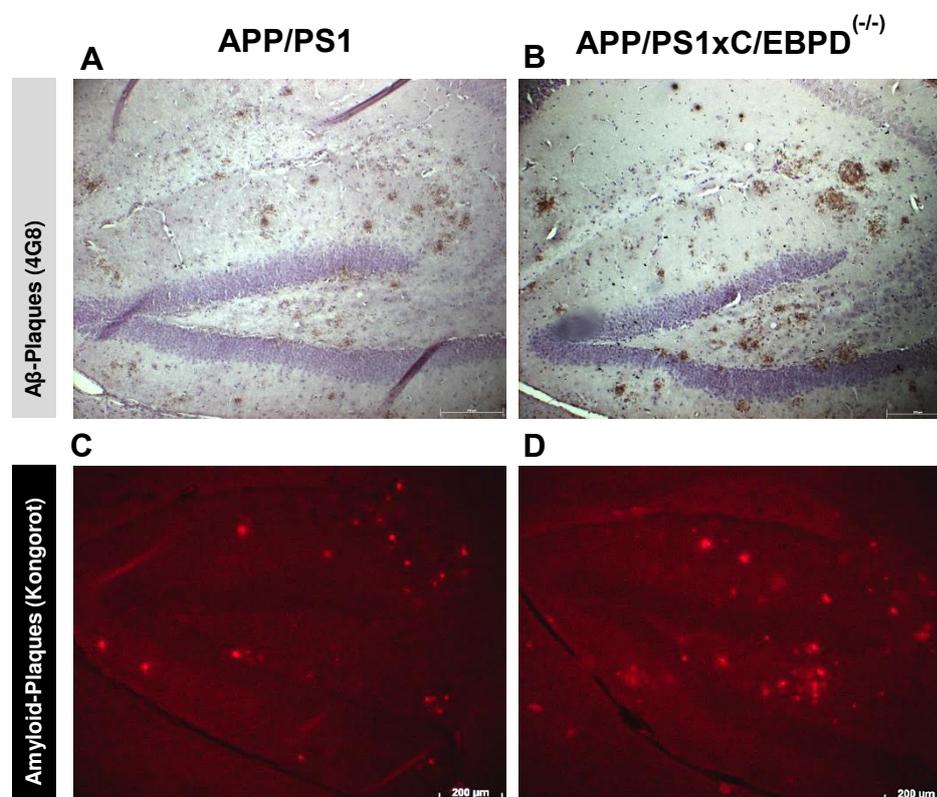


Abbildung 13 (A+B) Immunhistochemischer Nachweis der A β -Plaques mit dem 4G8-AK im Hippocampus. (C+D) Nachweis von Amyloid-Plaques mit der Kongorot-Färbung. 18 Monate alte APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäuse zeigen nur bei der Anzahl der Amyloid-Plaques signifikante Unterschiede verglichen mit APP/PS1-Mäusen. 100-fache Vergrößerung, Maßstab: 200 μ m.

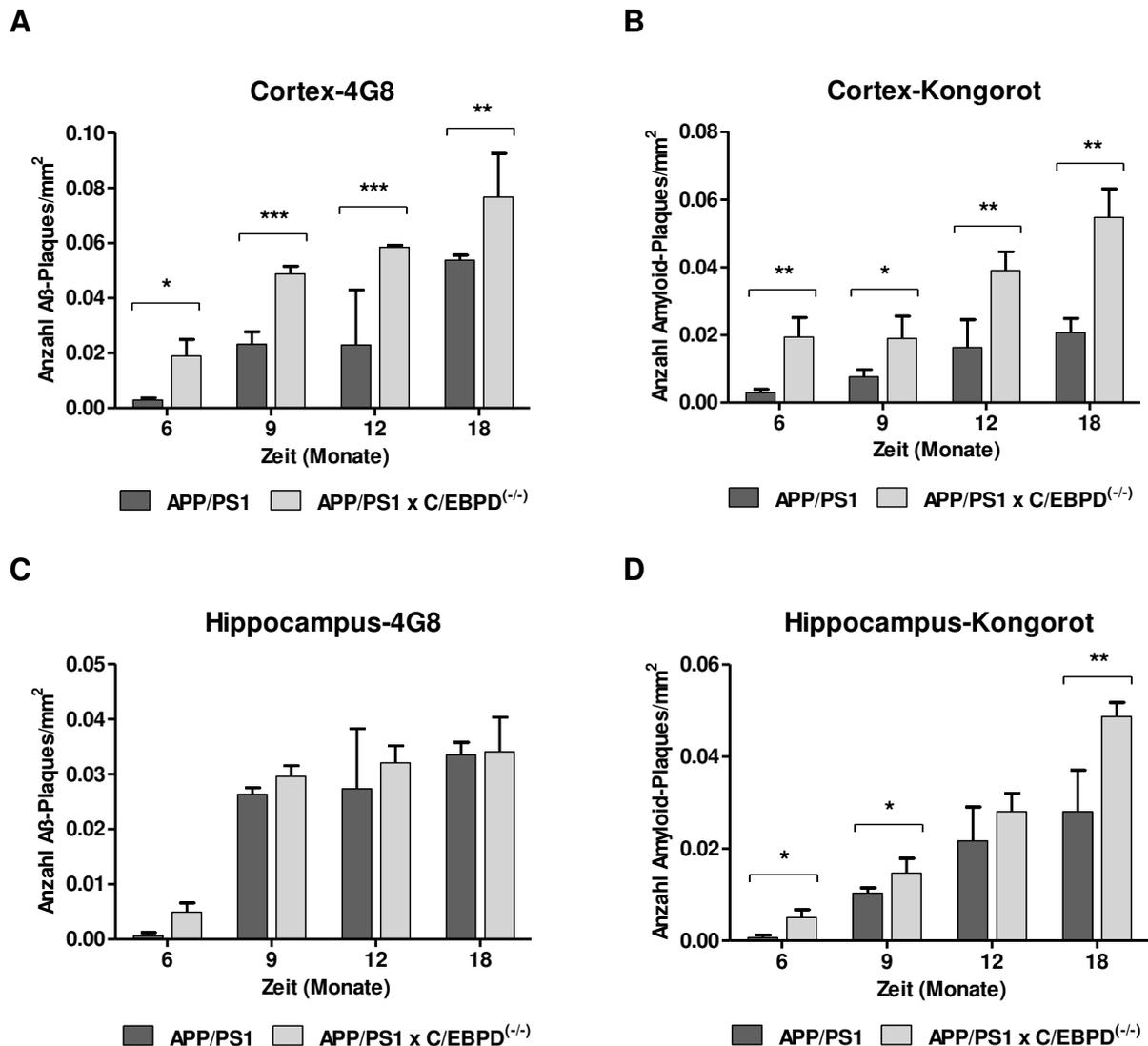


Abbildung 14 Auszählung der Plaques im Bereich des sekundären motorischen Cortex (M2-Cortex) und Hippocampus pro mm² nach immunhistochemischer Färbung mit dem 4G8-AK (A+C) bzw. histochemischer Kongorot-Färbung (B+D). Die Anzahl der Aβ-bzw. Amyloid-Plaques war signifikant (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; t-Test) erhöht in APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen (n=3) im Vergleich zu APP/PS1-Mäusen (n=3)

Zusätzlich zur Plaque-Anzahl wurden die durch Ablagerungen von Amyloid-Plaques bedeckten Flächen pro mm² in den untersuchten Regionen M2-Cortex und Hippocampus zu den Zeitpunkten 6, 9, 12 und 18 Monaten mit Hilfe des Programms ImageJ bestimmt. Nahezu über alle Altersstufen hinweg konnte eine Vergrößerung der durch Plaques bedeckten Flächen in den APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen, verglichen mit APP/PS1-Mäusen festgestellt werden. Dies war besonders im M2-Cortex sehr stark ausgeprägt. Die bedeckten Flächen der mittels 4G8-AK gefärbten Aβ-Plaques im Bereich des M2-Cortex war in den APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen besonders zum 6-monatigen Zeitpunkt signifikant erhöht (p<0,01) (siehe Abbildung 15A). Färbungen von Amyloid-Plaques mit Kongorot bestätigten diese Beobachtungen und zeigten zusätzlich noch eine signifikante Erhöhung der bedeckten Flächen der Amyloid-Plaques zum Zeitpunkt 9 und 12 Monate (p<0,01; 6, 9 und 12 Monate)

(siehe Abbildung 15B). Färbungen von A β -Plaques im Bereich des Hippocampus zum 6 und 12-monatigen Zeitpunkt zeigten ebenfalls signifikante Unterschiede ($p < 0.01$) zwischen den untersuchten Mausstämmen (siehe Abbildung 15C). Für den Bereich des Hippocampus war die durch Ablagerungen von Amyloid-Plaques bedeckten Flächen auch in den APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen generell vergrößert und erreichte zu den 6, 12 und 18-monatigen Zeitpunkten ebenfalls einen signifikanten Unterschied ($p < 0.01$) (siehe Abbildung 15D).

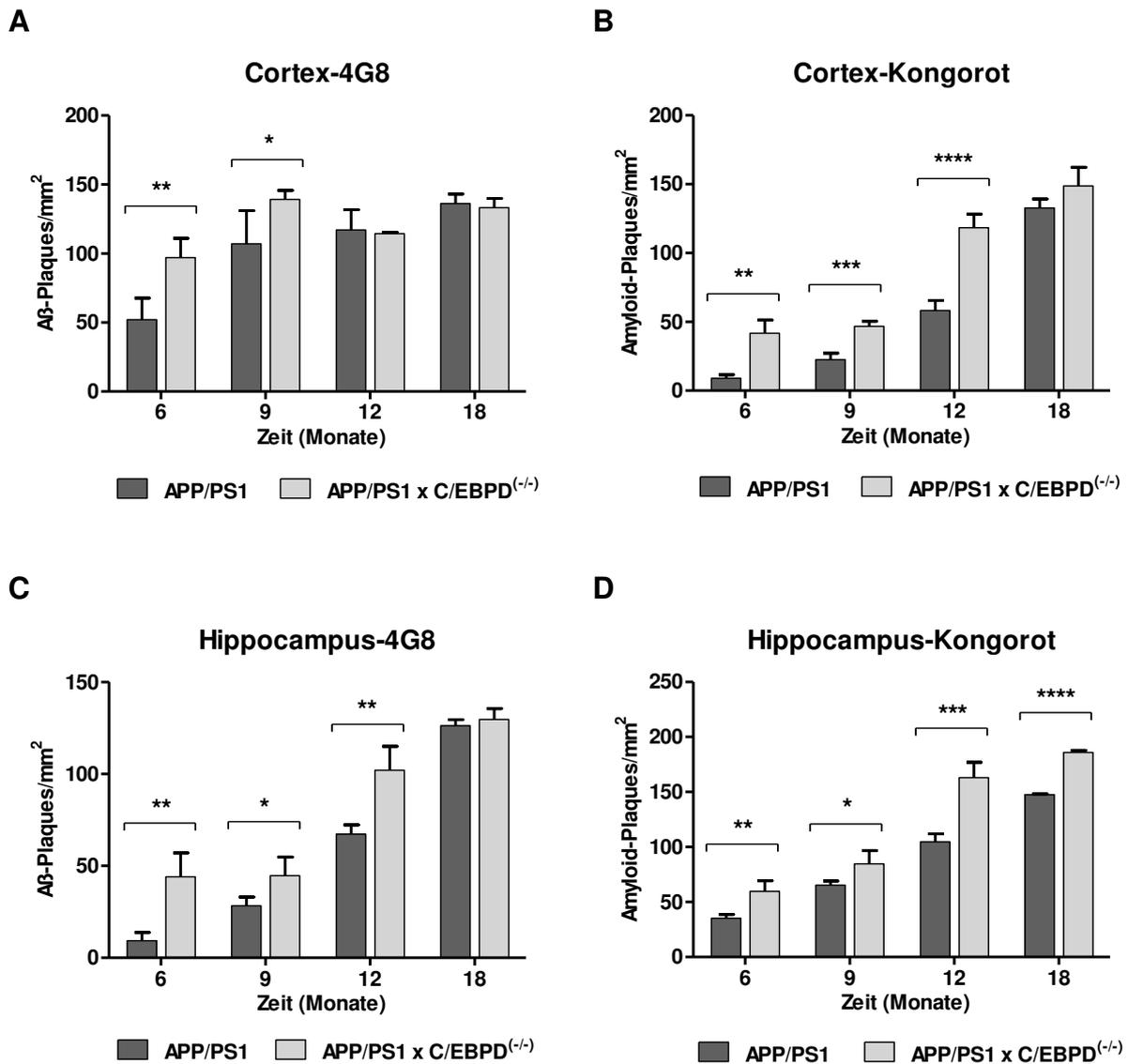


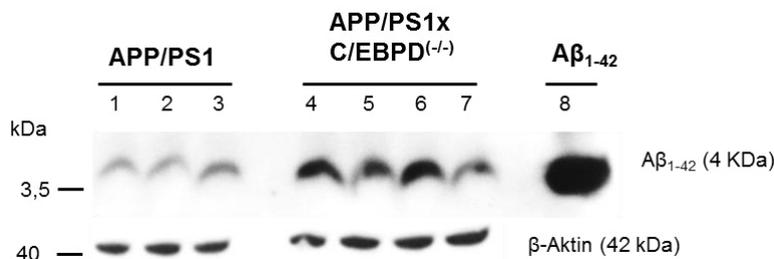
Abbildung 15 Messungen der A β - bzw. Amyloid-Plaques bedeckten Flächen im Bereich des M2-Cortex und Hippocampus pro mm² mittels ImageJ. A β -Plaques wurden immunhistochemisch mit 4G8-AK (A+C), Amyloid-Plaques mittels histochemischer Kongorot-Färbung (B+D) detektiert. APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäuse (n=3) zeigten bei nahezu allen untersuchten Zeitpunkten (6, 9, 12 und 18 Monaten) eine signifikant vergrößerte, von Plaques bedeckten Flächen im Vergleich zu APP/PS1-Mäusen (n=3). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; t-Test).

4.1.3.2. Western Blot

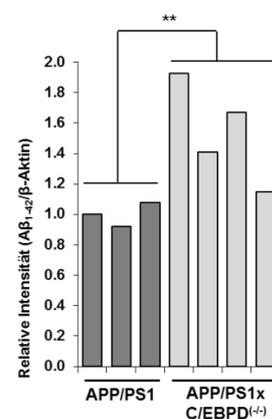
Mittels Western Blot wurde die Menge an A β im Gesamthirnhomogenat von drei APP/PS1- und vier APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen in PBS- und Ameisensäure-Fractionen bestimmt. Als Positivkontrolle wurde synthetisches A β ₁₋₄₂ eingesetzt. Abbildung 16 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Western Blot Analyse zum Zeitpunkt 9 Monate. Die A β -Banden sowohl der PBS-Fraktion (siehe Abbildung 16A) als auch der Ameisensäure-Fraktion (siehe Abbildung 16C) waren in APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen, bei gleichem β -Aktin-Gehalt, signifikant stärker ($p < 0.01$) (siehe Abbildung 16, exemplarisch für den 9-monatigen Zeitpunkt dargestellt). Sowohl in der PBS-Fraktion (siehe Abbildungen 16A+B), als auch in der Ameisensäure-Fraktion (siehe Abbildungen 16C+D) zeigten die APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäuse eine deutlich höhere Menge an A β als die Kontrolltiere, was auch die densitometrischen Auswertungen in den Abbildungen 16B+D bestätigen.

A

PBS-Fraktion

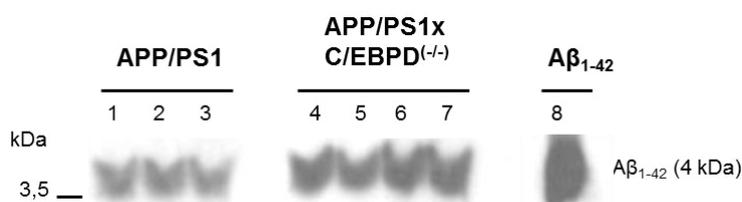


B



C

Ameisensäure-Fraktion



D

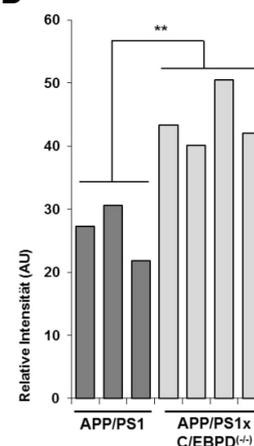


Abbildung 16 Western Blot zur Bestimmung der Menge an A β in der PBS-Fraktion (A) und der Ameisensäure-Fraktion (C) mittels 6E10-AK in 9 Monate alten Tieren. Spur 1-3 APP/PS1-Proteinlysate, Spur 4-7 APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Proteinlysate, Spur 8 synthetisches A β ₁₋₄₂ als Positivkontrolle. Die densitometrische Auswertung für beide Fraktionen (B+D) zeigte signifikant erhöhte Plaque-Ladungen in den APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen ($n=4$) verglichen mit den APP/PS1-Mäusen ($n=3$), bei gleichem β -Aktin-Gehalt. Aufgrund der Ameisensäurebehandlung der in (C) verwendeten Proben konnte der β -Aktin-Gehalt nicht bestimmt werden ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; t-Test). Bei der Angabe der relativen Intensität in „(AU)“ handelt es sich um eine willkürliche Einheit (engl. Arbitrary Unit [AU]).

Zusammenfassend zeigt Abbildung 17 die densitometrisch ermittelten Abweichungen in der Bandenstärke für A β in der PBS-löslichen (siehe Abbildung 17A) und der Ameisensäure-löslichen Fraktion (siehe Abbildung 17B) für die APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäuse zu allen untersuchten Zeitpunkten (6-18 Monate). Bei den APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen konnte eine 10- 75 %-ige höhere Menge an A β gegenüber den APP/PS1-Mäusen nachgewiesen werden. Dabei war die Menge an A β der APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäuse, verglichen mit den APP/PS1-Mäusen, zum Zeitpunkt von 9 und 18 Monaten in den beiden untersuchten Fraktionen signifikant erhöht ($p < 0.05$ und $p < 0.01$) (siehe Abbildung 17).

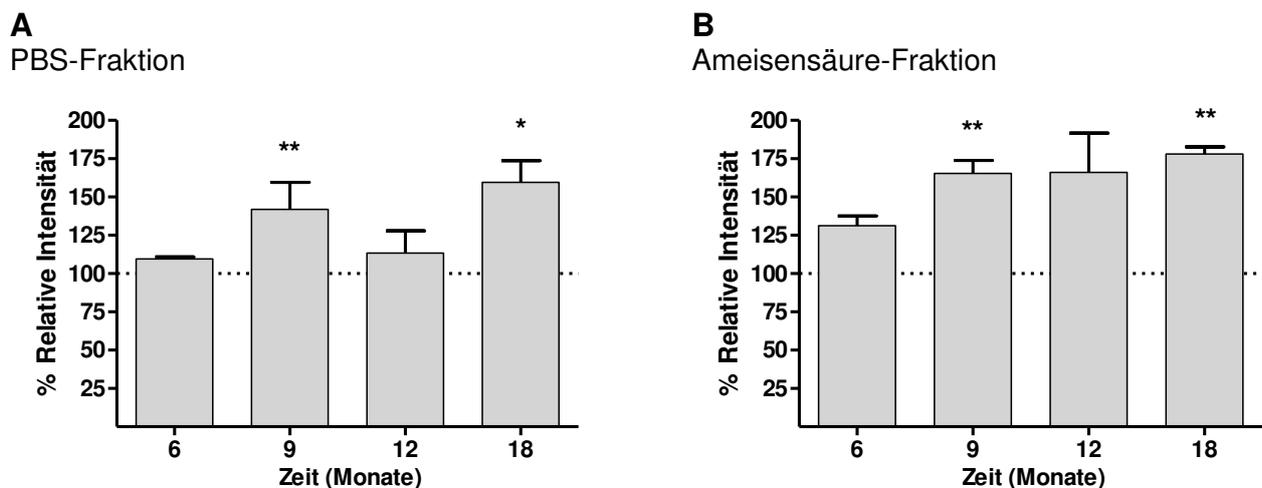


Abbildung 17 Densitometrische Auswertung der im Western Blot ermittelten Gesamtmenge an A β in PBS- (A) und Ameisensäure-Fraktion (B). Signifikant erhöhte Menge an A β im Gehirn von 9 und 18 Monate alten APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen ($n=4$) verglichen mit APP/PS1-Mäusen in beiden Fraktionen ($n=3$). Die Menge an A β im Gehirn von APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen wurde relativ zu APP/PS1-Mäusen = 100 % dargestellt. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; t-Test).

Um auszuschließen, dass die vermehrte A β -Ablagerung in den APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Tieren auf eine erhöhte APP-Expression zurückzuführen ist, wurden zu allen Untersuchungszeitpunkten APP-Bestimmungen mittels Western-Blot (siehe Abschnitte 3.4.2.3 und 3.4.3) durchgeführt. Abbildung 18 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Bestimmung des APP-Gehaltes im Western Blot mit Hilfe des 6E10-AK in Gesamthirnhomogenat von drei APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)- und zwei APP/PS1-Mäusen (siehe Abbildung 18A) zum Zeitpunkt 9 Monate. Als Ladekontrolle wurde das Haushaltsgen β -Aktin mittels anti- β -Aktin-AK nachgewiesen. Wie in Abbildung 18A gezeigt, entspricht der APP-Gehalt im Gehirn der APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäuse dem der Kontrolltiere, bei gleichem β -Aktin-Gehalt, bestätigt durch die densitometrische Auswertung in Abbildung 18B. Zu keinem Zeitpunkt wurde ein Unterschied in der Menge an APP-Proteinen festgestellt (Daten hier nicht gezeigt).

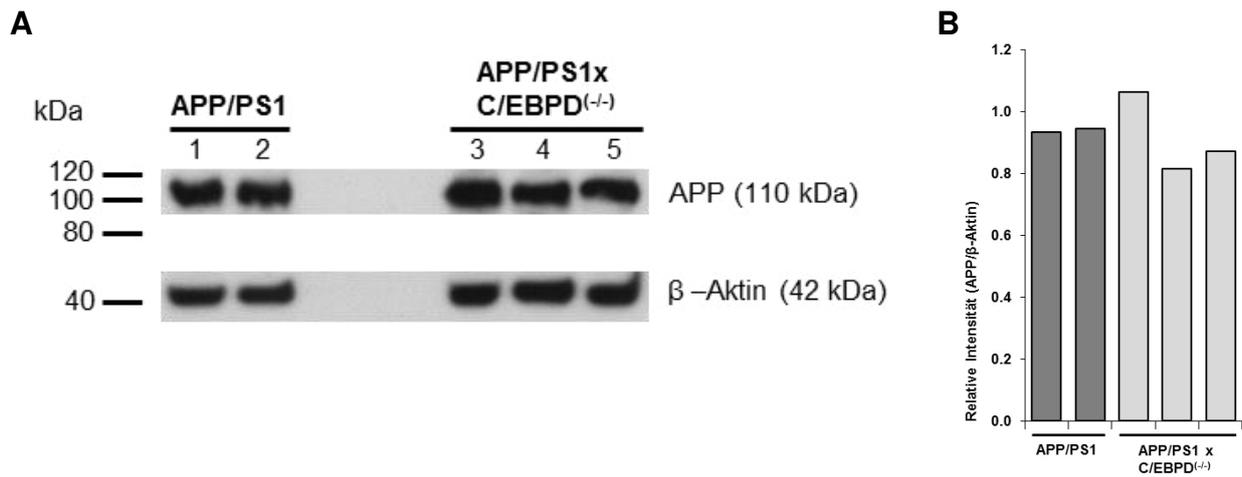


Abbildung 18 (A) Der APP-Gehalt im Hirnhomogenat von APP/PS1- bzw. APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Tieren wurde mittels Western Blot, unter Verwendung des A β -spezifischen 6E10-AK (exemplarisch für den 9-monatigen Zeitpunkt) bestimmt. Spur 1-2 APP/PS1-Proteinlysate, Spur 3-5 APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Proteinlysate. (B) zeigt die densitometrische Quantifizierung der in (A) dargestellten APP- und β -Aktin-Proteinmenge.

4.1.4. Expressionsanalyse ausgewählter Gene, die an der Beseitigung und Degradation von A β beteiligt sind

Um zu untersuchen, inwiefern die erhöhte Menge von A β -Plaques auf eine veränderte Gen-Expression zurückzuführen ist, welche bei der Degradation von A β beteiligt sein sollen, wurde eine Real-Time PCR (siehe Abschnitt 3.5.4) ausgewählter Gene zum Zeitpunkt 18 Monate durchgeführt. Hierfür wurde die Regulation von Neprilysin (*Mme*), Apolipoprotein E (*ApoE*), low density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (*Lrp1*), Cathepsin B (*CtsB*), Endothelin-converting Enzyme 1 (*Ece1*), Angiotensin-converting Enzyme (*Ace*), Insulin-degrading Enzyme (*Idc*) und Advanced glycosylation end product-specific receptor (*Ager*; früher Rage) analysiert. Wie in Abbildung 19 gezeigt, konnte kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression zwischen APP/PS1- und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen festgestellt werden.

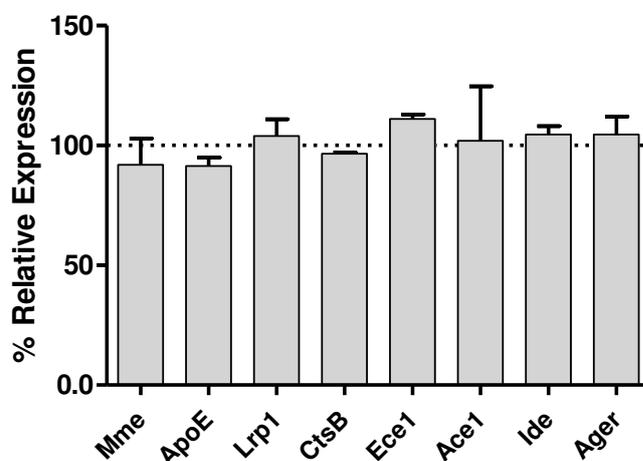


Abbildung 19 mRNA-Expression von *Mme*, *ApoE*, *Lrp1*, *CtsB*, *Ece1*, *Ace1*, *Idc* und *Ager* wurden mittels Real-Time PCR bestimmt. Die mRNA-Expression von 18 Monate alten APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen wurde dabei relativ zu den APP/PS1-Mäusen = 100 % dargestellt.

4.1.5. Astrozytose im AD-Modell

Ein wesentliches Merkmal der AD-Pathogenese ist die β -Amyloidablagerung mit nachfolgender Neuroinflammation, bei der es zu einer Aktivierung der Astrozyten und Mikroglia kommt. In diesem Zusammenhang galt es der Frage nachzugehen, ob C/EBPD einen Einfluss auf die mit der Erkrankung assoziierte Gliaaktivierung hat. Es wurde zunächst die Astrozytose und im darauffolgenden Abschnitt 4.1.6 die Mikrogliose im Gehirn von APP/PS1- und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen mittels Immunhistochemie (siehe Abschnitte 3.3.4.1 und 3.3.4.2), quantitativer Real-Time PCR (siehe Abschnitt 3.5.4) und Western Blot (siehe Abschnitte 3.4.3, 3.4.3.1 und 3.4.2.3) untersucht.

4.1.5.1. Immunhistochemie

Mit Hilfe des GFAP-spezifischen AK anti-GFAP wurden aktivierte Astrozyten in Gewebeschnitten von jeweils drei APP/PS1- und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen im Alter von 6, 9, 12 und 18 Monaten nachgewiesen. In allen untersuchten Schnitten konnten GFAP-positive Astrozyten nachgewiesen werden, deren Zahl im Zeitverlauf deutlich zunahm. Dabei zeigten beide Mausstämme eine besonders starke Aktivierung der Astrozyten im Bereich des Hippocampus und Striatums. Die Regionen Cortex, Kleinhirn und Pons wiesen eine mittelgradige Aktivierung der Astrozyten auf, während in der Medulla oblongata, im Mittelhirn, im Thalamus und im Bulbus olfactorius die geringste Aktivierung der Astrozyten feststellbar war (Daten hier nicht gezeigt). Im Zeitverlauf konnte in beiden Mausstämmen eine Steigerung der Astrozytose in allen Hirnregionen beobachtet werden. Die von aktivierten Astrozyten bedeckten Flächen pro mm² wurden im Bereich des Hippocampus und M2-Cortex (siehe Abbildung 20) mittels ImageJ quantitativ bestimmt. Die Quantifizierung ergab, dass 9 Monate alte APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäuse eine signifikant stärkere Astrozytose im Bereich des Hippocampus und Cortex im Vergleich zu APP/PS1-Mäusen zeigten (siehe Abbildungen 21A+B). Zu den anderen untersuchten Zeitpunkten zeigten die APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)- im Vergleich zu den APP/PS1-Mäusen im Bereich des Hippocampus, als auch des Cortex, eine nicht signifikante Erhöhung der bedeckten Flächen der aktivierten Astrozyten (siehe Abbildungen 21A+B). Weiterhin waren teilweise Plaque-assoziierte, überwiegend diffus verteilte Astrozyten in Bereichen des Hippocampus und Cortex vorzufinden.

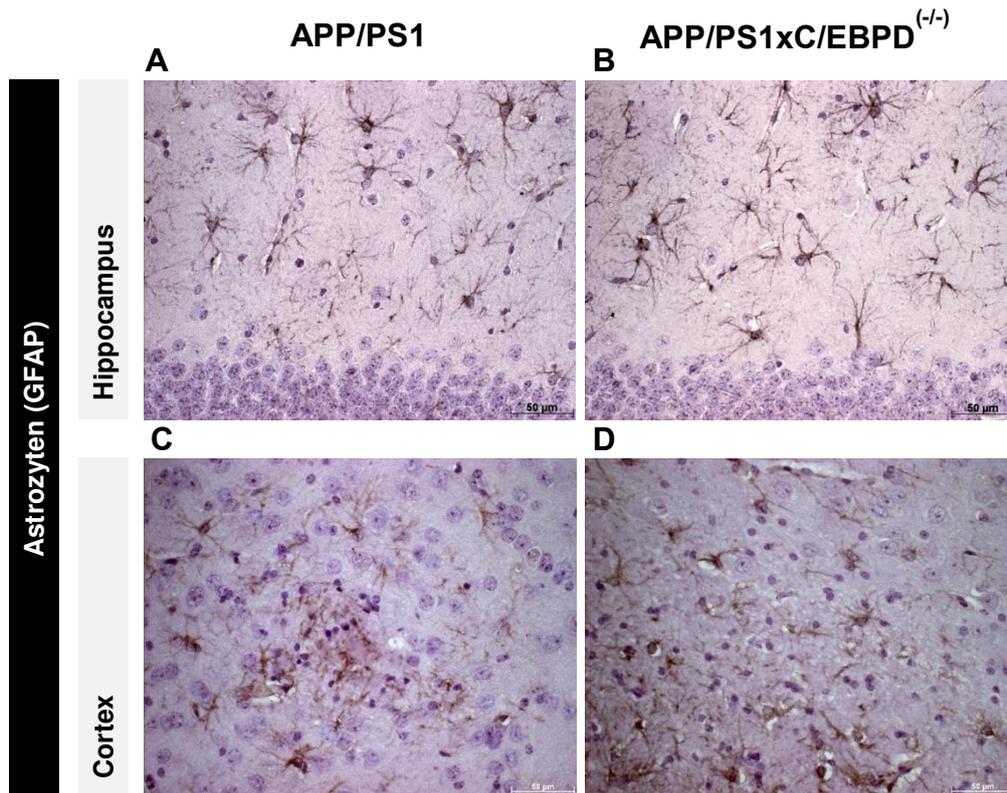


Abbildung 20 Immunhistochemischer Nachweis von aktivierten Astrozyten mittels GFAP-spezifischem AK im Hippocampus und M2-Cortex von APP/PS1- (A+C) und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen (B+D), (n=3), Zeitpunkt 9 Monate, 400-fache Vergrößerung, Maßstab: 50 µm

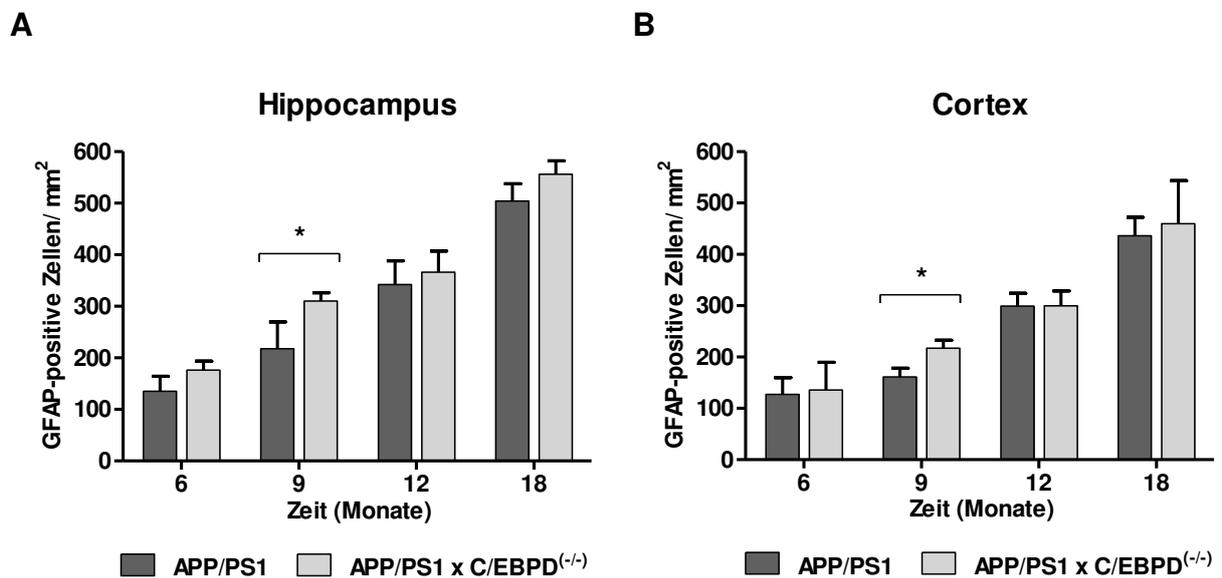


Abbildung 21 Quantitative Auswertung der von aktivierten Astrozyten bedeckten Flächen pro mm² im Bereich des Hippocampus (A) und M2-Cortex (B), (n=3). Zum Zeitpunkt 9 Monate konnte eine signifikant stärkere Astrozytose in APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen festgestellt werden. (*p<0.05; t-Test).

4.1.5.2. Real-Time PCR

Mittels *Gfap*-spezifischer TaqMan-Sonden wurde die *Gfap* mRNA-Expression im Gehirn von je drei APP/PS1- und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen im Alter von 6 und 18 Monaten bestimmt. Dabei konnte zu keinem der beiden Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied der *Gfap* mRNA-Expression festgestellt werden (siehe Abbildung 22).

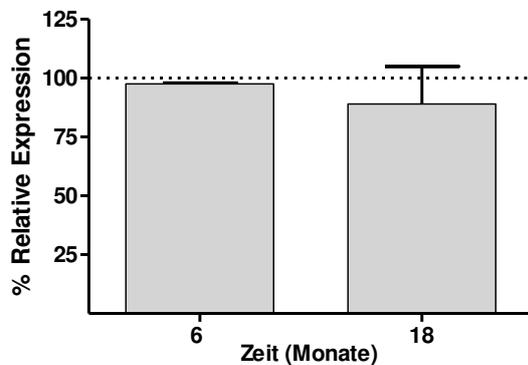


Abbildung 22 Quantitative Real-Time PCR zur Untersuchung der *Gfap* mRNA-Expression zum Zeitpunkt 6 und 18 Monaten (n=3). Die m-RNA-Expression von APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen wurde relativ zu APP/PS1-Mäusen = 100 % dargestellt.

4.1.5.3. Western Blot

Mit dem Astrozyten-spezifischen AK anti-GFAP wurde im Western Blot die Proteinmenge von GFAP im Hirnhomogenat von je drei APP/PS1- und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen im Alter von 6, 9, 12 und 18 Monaten bestimmt. Es konnte die für GFAP typische 50 kDa große Bande detektiert werden, deren Intensität im Hirnhomogenat von APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen im Vergleich zu APP/PS1-Mäusen tendenziell erhöht, aber zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikant verändert war (siehe Abbildung 23C).

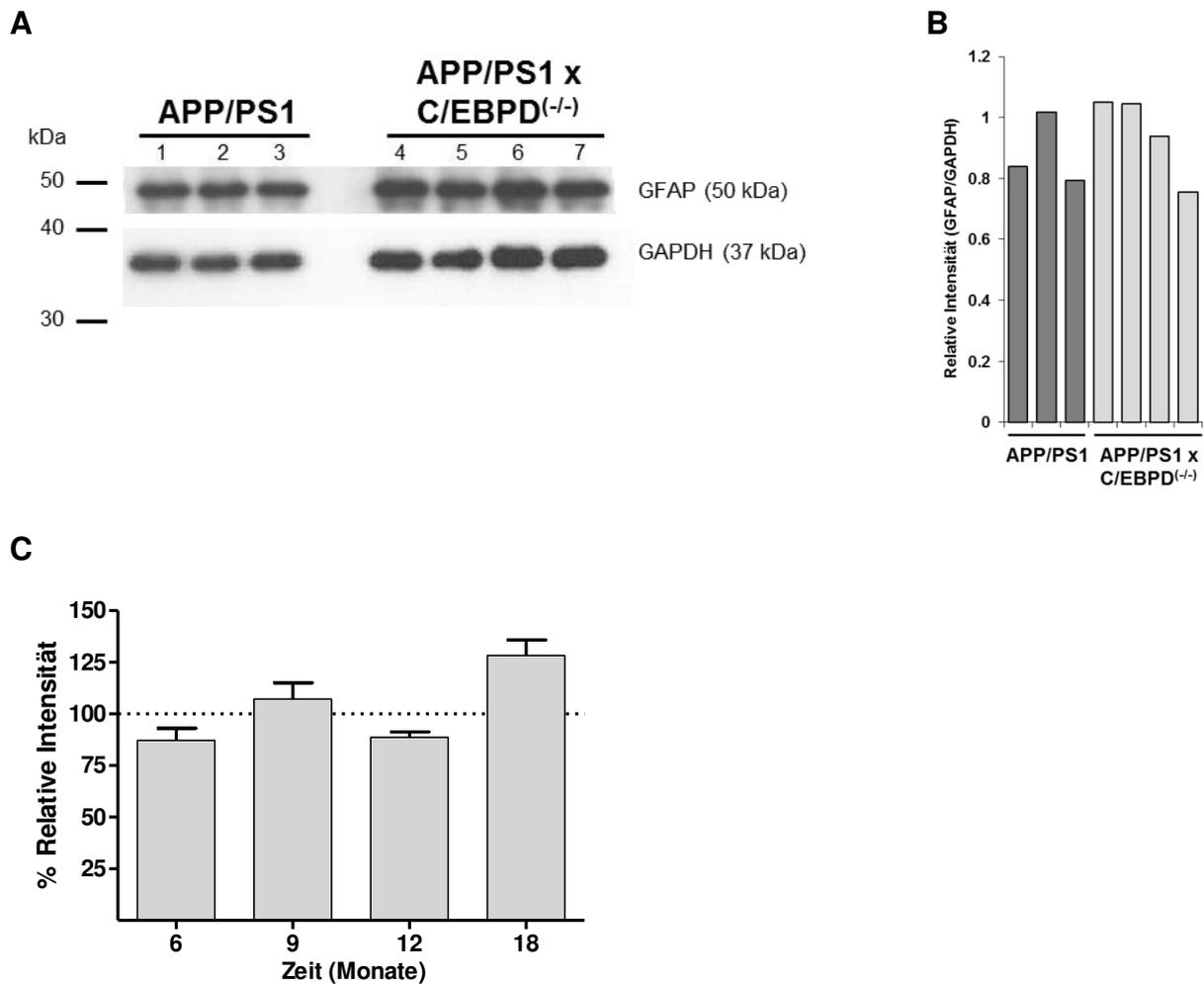


Abbildung 23 (A) GFAP-Nachweis im Western Blot, exemplarisch für den 18-monatigen Zeitpunkt. Spur 1-3 APP/PS1-Proteinlysate, Spur 4-7 APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Proteinlysate. (B) densitometrische Quantifikation der in (A) dargestellten Astrozyten-Aktivierung. (C) Quantitative Auswertung der mittels Western Blot durchgeführten Untersuchungen zu 6, 9, 12 und 18 Monaten (n=3). In 18 Monate alten APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen konnte im Vergleich zu APP/PS1-Mäusen eine tendenziell erhöhte, jedoch keine signifikant veränderte Astrozytose festgestellt werden. Die Bandenintensität des WB von APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen wurde relativ zu APP/PS1-Mäusen = 100 % dargestellt.

4.1.6. Mikrogliose im AD-Modell

In der AD-Pathogenese kommt es nach β -Amyloidablagerung im Gehirn, als Zeichen der Neuroinflammation, neben der Astrozytose auch zur Aktivierung von Mikroglia. Diese Mikrogliose wurde im Gehirn von APP/PS1-Mäusen im Vergleich zu APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen mittels Immunhistochemie (siehe Abschnitte 3.3.4.1 und 3.3.4.2), quantitativer Real-Time PCR (siehe Abschnitt 3.5.4) und Western Blot (siehe Abschnitte 3.4.3, 3.4.3.1 und 3.4.2.3) untersucht.

4.1.6.1. Immunhistochemie

Aktivierte Mikroglia wurden mit Hilfe des Iba-1-spezifischen AK in Gewebeschnitten von jeweils drei APP/PS1- und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen im Alter von 6, 9, 12 und 18 Monaten nachgewiesen. In allen untersuchten Schnitten konnten Iba-1-positive Mikroglia nachgewiesen werden, deren Zahl im Zeitverlauf deutlich zunahm. Dabei zeigten beide Mausstämme beispielhaft für den 12-monatigen Zeitpunkt eine besonders starke Aktivierung der Mikroglia im Bereich des Hippocampus und Cortex (siehe Abbildung 24). Die Regionen Striatum, Kleinhirn, Mittelhirn und Thalamus wiesen eine mittelgradige Aktivierung der Mikroglia auf, während in der Pons, der Medulla oblongata und im Bulbus olfactorius die geringste Aktivierung der Mikroglia feststellbar war (Daten hier nicht gezeigt). Die von aktivierten Mikroglia bedeckten Flächen pro mm² wurden mittels ImageJ quantitativ bestimmt. Die Quantifizierung ergab, dass 12 Monate alte APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäuse eine signifikant stärkere Mikrogliaaktivierung im Bereich des Cortex im Vergleich zu APP/PS1-Mäusen zeigten (siehe Abbildung 25B). Zu den anderen untersuchten Zeitpunkten im Cortex sowie im Hippocampus (siehe Abbildungen 25A+B) zeigten APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)- im Vergleich zu den APP/PS1-Mäusen eine etwas verstärkte Mikrogliaaktivierung. Weiterhin waren verstärkt Plaque-assoziierte, ansonsten teilweise auch diffus verteilte Mikroglia in Bereichen des Hippocampus und Cortex vorzufinden.

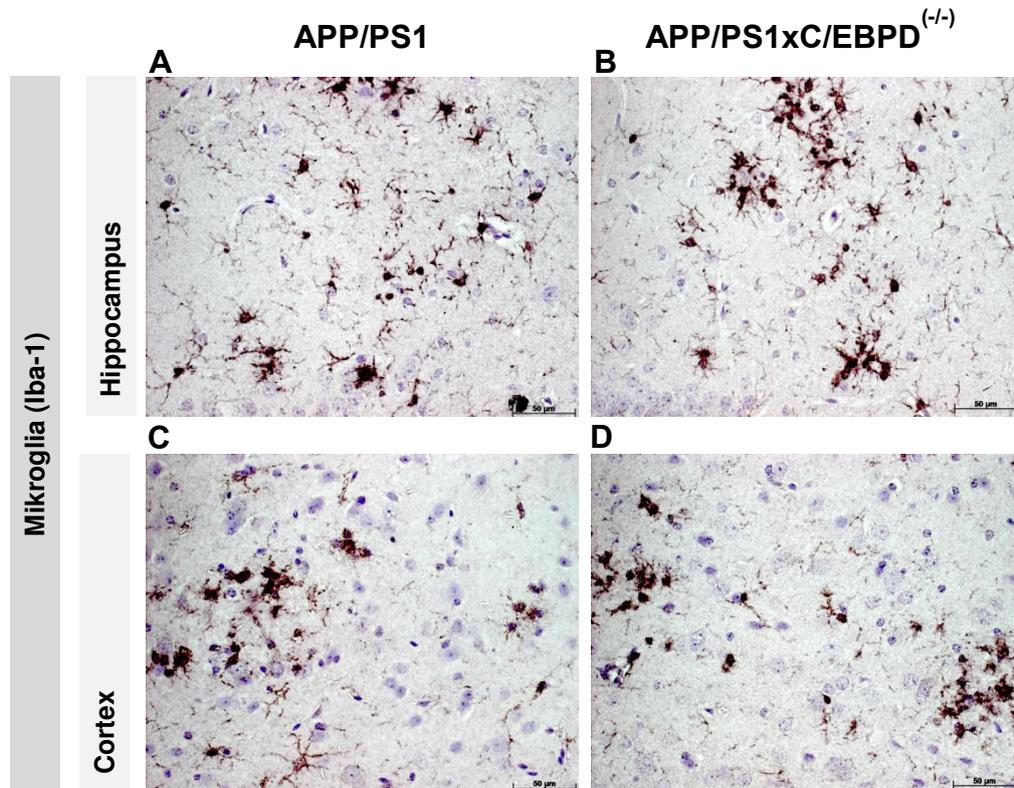


Abbildung 24 Immunhistochemischer Nachweis von aktivierten Mikroglia mittels Iba1-spezifischem AK im Hippocampus und M2-Cortex von APP/PS1- (A+C) und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen (B+D), (n=3), Zeitpunkt 12 Monate, 400-fache Vergrößerung, Maßstab: 50 µm.

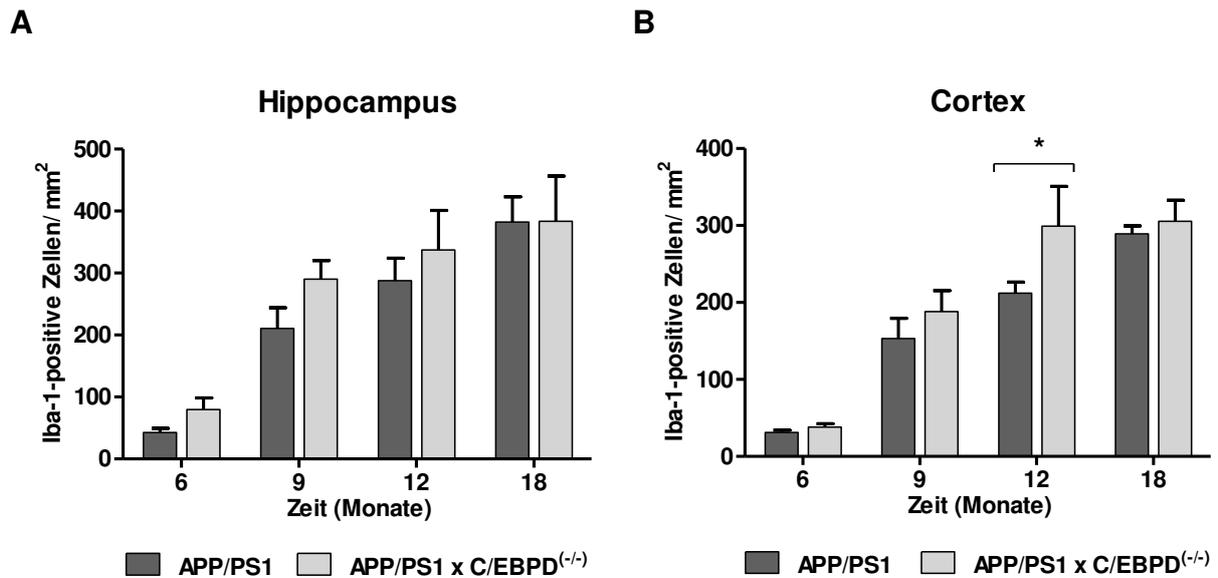


Abbildung 25 Quantitative Auswertung der von aktivierten Mikroglia bedeckten Flächen pro mm² im Bereich des Hippocampus (A) und M2-Cortex (B), (n=3). In 12 Monate alten APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen konnte im Bereich des Cortex eine signifikant erhöhte Mikrogliose im Vergleich zu APP/PS1-Mäusen festgestellt werden (*p<0.05; t-Test).

4.1.6.2. Real-Time PCR

Mittels *Iba-1*-spezifischer TaqMan-Sonden wurde die *Iba-1* mRNA-Expression im Gehirn von je drei APP/PS1- und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen im Alter von 6 und 18 Monaten bestimmt. Dabei war, im Vergleich zu den APP/PS1-Mäusen, eine nicht signifikante Zunahme der *Iba-1* mRNA-Expression zum 6-monatigen Zeitpunkt von 20 % in den APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen zu verzeichnen. Zum 18-monatigen Zeitpunkt konnte kein Unterschied festgestellt werden (siehe Abbildung 26).

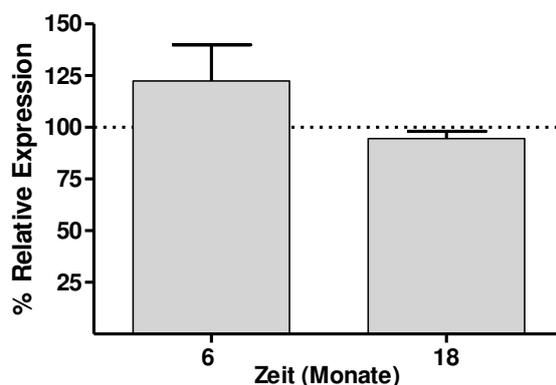


Abbildung 26 Quantitative Real-Time PCR zur Untersuchung der *Iba-1* mRNA-Expression zum Zeitpunkt 6 und 18 Monaten (n=3). Die mRNA-Expression von APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen wurde relativ zu APP/PS1-Mäusen = 100 % dargestellt.

4.1.6.3. Western Blot

Mit dem Iba-1-spezifischen AK anti-Iba-1 wurde im Western Blot die Proteinmenge von Iba-1 im Hirnhomogenat von je drei APP/PS1- und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen im Alter von 6, 9, 12 und 18 Monaten bestimmt. Es konnte die für Iba-1 typische 17 kDa große Bande detektiert werden, deren Intensität im Hirnhomogenat von APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen im Vergleich zu APP/PS1-Mäusen zum 6- und 18-monatigen Zeitpunkt gering stärker (siehe Abbildung 27) und zum 9- und 12-monatigen Zeitpunkt gering schwächer war (siehe Abbildung 27C). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen APP/PS1- und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen festgestellt werden.

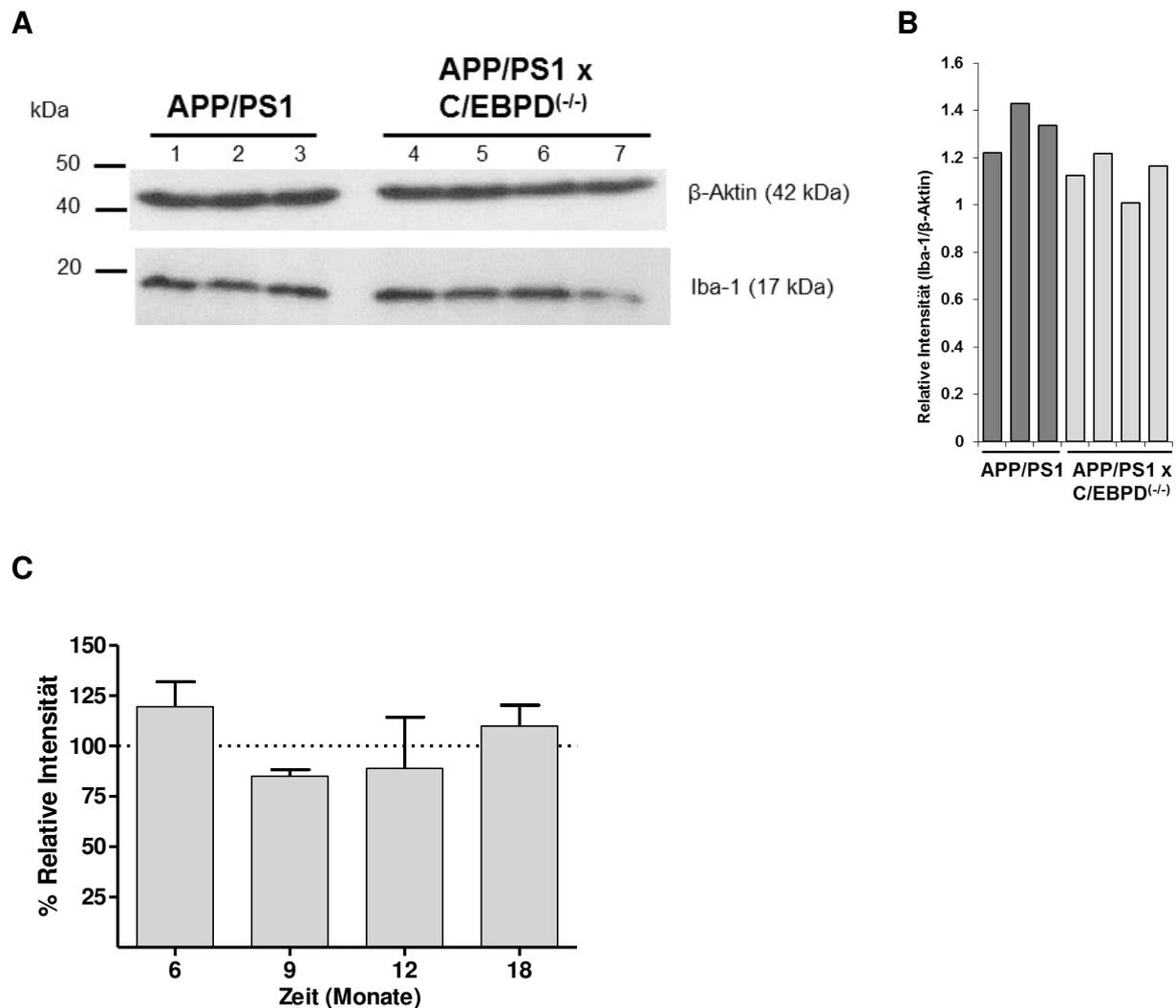


Abbildung 27 (A) Iba-1-Nachweis im Western Blot, exemplarisch für den 18-monatigen Zeitpunkt. Spur 1-3 APP/PS1-Proteinlysate, Spur 4-7 APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Proteinlysate. (B) densitometrische Quantifizierung der in (A) dargestellten Mikroglia-Aktivierung. (C) Quantitative Auswertung der mittels Western Blot durchgeführten Untersuchungen zu 6, 9, 12 und 18 Monaten (n=3). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen APP/PS1- und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen festgestellt werden. Die Bandenintensität des WB von APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen wurde relativ zu APP/PS1-Mäusen = 100 % dargestellt.

4.1.7. Expressionsanalysen C/EBPD-regulierter Gene im AD-Modell

Aus vorangegangenen immunologischen Studien aus dem Bereich der angeborenen Immun- und Akut-Phase-Antwort konnte gezeigt werden, dass C/EBPD Gene, welche an der angeborenen Immunantwort beteiligt sind, reguliert. Hierbei handelt es sich um die Komplementkomponenten C3 (*C3*), Serum amyloid A 3 (*Saa3*), chemokine (C-X-C motif) ligand (*Cxcl*) 9, Ceruloplasmin (*Cp*), chemokine (C-C motif) ligand (*Ccl*) 3, *Cxcl2*, TNF- α induced protein (*Tnfaip*) 6 und *Il-6* (Cardinaux et al., 2000; Bruder et al., 2004; Li et al., 2004; Sun et al., 2008; Litvak et al., 2009; Chang et al., 2012; Ko et al., 2012; Moore et al., 2012; Yan et al., 2012). Die mRNA-Expression dieser Gene wurde mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (siehe Abschnitt 3.5.4) in 18 Monate alten APP/PS1- und APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen überprüft. Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR (siehe Abbildung 28) bestätigten, dass das *C3*, *Saa3* und *Cxcl2* mRNA-Expression in APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen signifikant reduziert war. *C3* zeigte hierbei mit nur 57 % die am stärksten reduzierte Expression. Die *Saa3*-Expression lag bei 67 % und die Expression von *Cxcl2* bei 69 % gegenüber der von APP/PS1-Mäusen. Dagegen war die mRNA-Expression von *Cxcl9*, *Cp*, *Ccl3*, *Tnfaip6* und *Il-6* in APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen gegenüber APP/PS1-Mäusen nahezu unverändert (siehe Abbildung 28).

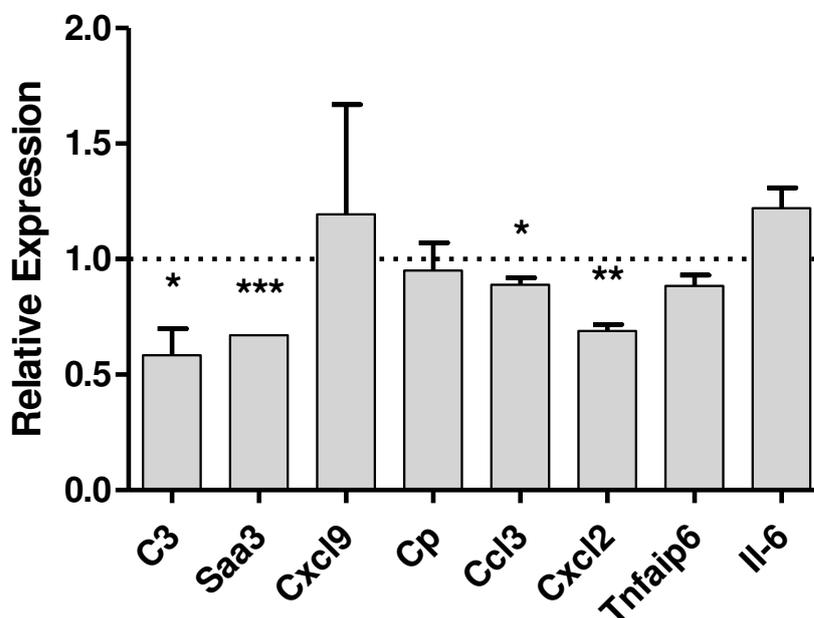


Abbildung 28 mRNA-Expression von *C3*, *Saa3*, *Cxcl9*, *Cp*, *Ccl3*, *Cxcl2*, *Tnfaip6* und *Il-6* wurden im AD-Modell zum 18-monatigen Zeitpunkt mittels Real-Time PCR bestimmt (n=3). Die mRNA-Expression von APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen wurde dabei relativ zu den APP/PS1-Mäusen = 100 % dargestellt. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; t-Test).

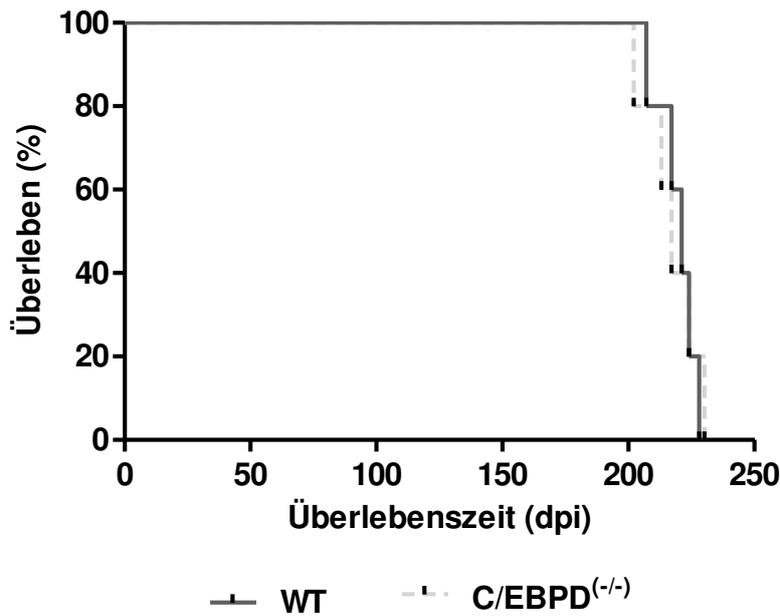


Abbildung 30 Überlebenszeit von C/EBPD^(-/-)-Mäusen (n=9) verglichen mit WT-Kontrollen (n=9) nach Scrapieinfektion

4.2.2. PrP^{Sc}-Ablagerungen im Prion-Modell

Um der Frage nachzugehen, ob C/EBPD einen Einfluss auf die PrP^{Sc}-Ablagerungen im Prion-Modell hat, wurden zum Zeitpunkt 125 dpi und zum terminalen Zeitpunkt der Erkrankung Untersuchungen mittels Western Blot (siehe Abschnitte 3.4.2.4, 3.4.3 und 3.4.3.1) und PET-Blot (siehe Abschnitt 3.3.4.4) durchgeführt.

4.2.2.1. Western Blot von PrP^{Sc}

Mit Hilfe des Prion-spezifischen AK 4H11 konnten zum Zeitpunkt 125 dpi sowie zum terminalen Zeitpunkt der Erkrankung im Hirnhomogenat aller untersuchten Tiere (jeweils drei Individuen pro Mausstamm) PrP^{Sc} nachgewiesen werden. PrP^{Sc} liegt in un-, mono- und diglykosylierter Form vor, was sich im Western Blot als Bandentriplett darstellt (siehe Abbildung 31A, exemplarisch für den terminalen Zeitpunkt). Es konnte kein Unterschied in der PrP^{Sc}-Menge im Hirnhomogenat der Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)- und WT-Tiere festgestellt werden. Auch die densitometrische Messung (siehe Abschnitt 3.4.3.1) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen (siehe Abbildungen 31B+C).

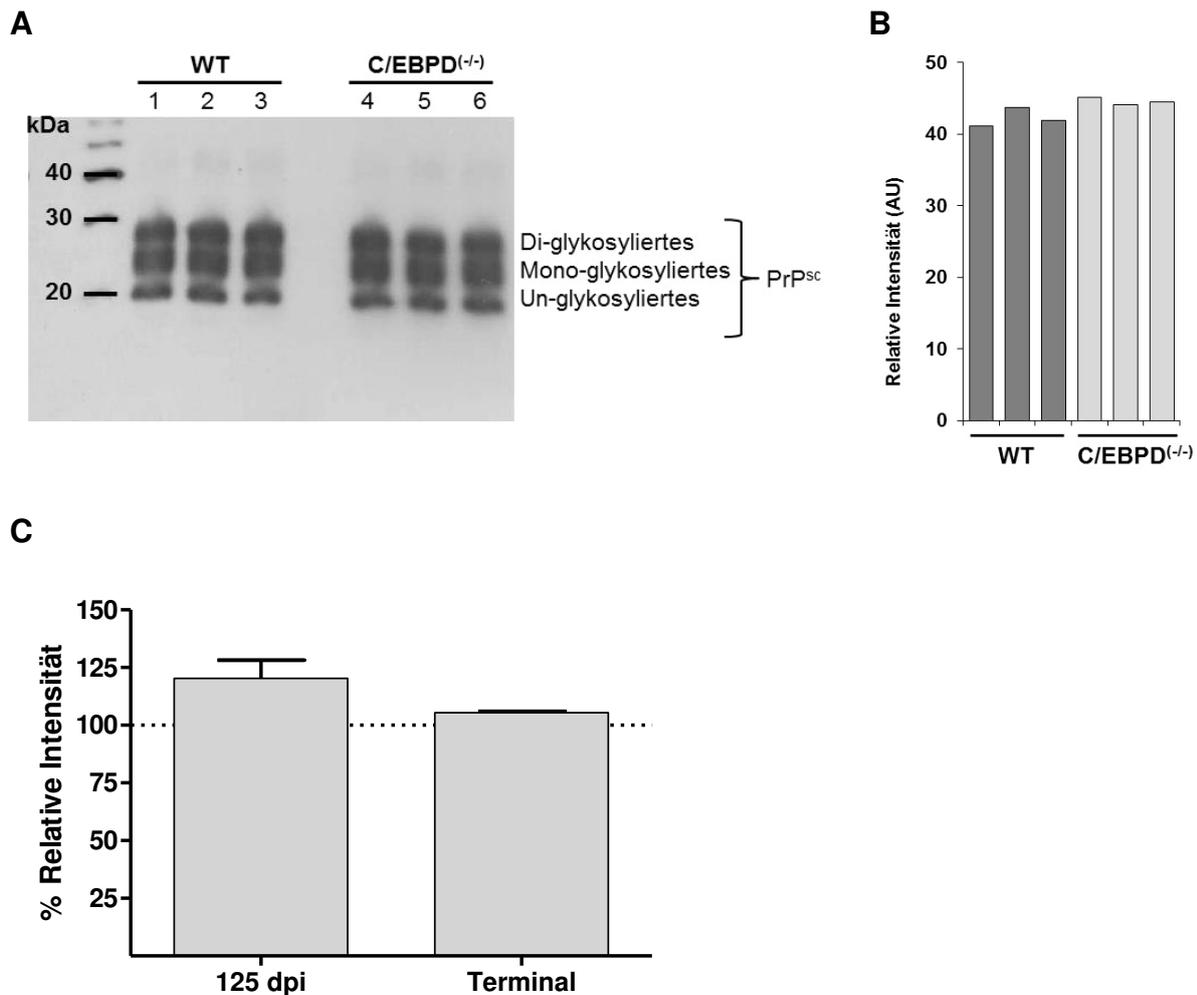


Abbildung 31 (A) Western Blot zur Bestimmung der PrP^{Sc}-Ablagerungen im Gehirn von Scrapie-infizierten WT und C/EBPD^(-/-)-Mäusen zum terminalen Zeitpunkt der Erkrankung. Spur 1-3 Scrapie-infiziertes WT-Proteinlysat, Spur 4-6 Scrapie-infiziertes C/EBPD^(-/-)-Proteinlysat. (B) Densitometrische Quantifikation der in (A) dargestellten PrP^{Sc}-Ablagerungen. (C) Densitometrische Quantifikation der Western Blots zum Zeitpunkt 125 dpi und terminal erkrankter Tiere. Es konnte zwischen den beiden Mäusestämmen kein signifikanter Unterschied in der Menge an pathogenen PrP^{Sc} festgestellt werden. Die PrP^{Sc}-Menge aus dem Gehirn von Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)-Mäusen wurden relativ zu Scrapie-infizierten WT-Mäusen = 100 % dargestellt.

4.2.2.2. Paraffin-embedded tissue (PET)-Blot

Im PET-Blot wurde der Prion-spezifische AK 6H4 eingesetzt. Hiermit konnten weder hinsichtlich der Menge, noch bei der Lokalisation von PrP^{Sc} Unterschiede zwischen Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)- und WT-Mäusen zu dem Zeitpunkt 125 dpi (siehe Abbildung 32) bzw. terminal festgestellt werden. Beide untersuchten Mausstämmen zeigten besonders starke PrP^{Sc}-Ablagerungen im Thalamus, Cortex und Hippocampus. Die Regionen Medulla oblongata, Mittelhirn und Striatum wiesen mittelgradige PrP^{Sc}-Ablagerungen auf, während im Cerebellum und Bulbus olfactorius die geringsten Mengen an PrP^{Sc} feststellbar waren. Dagegen waren im Gehirn einer mock-infizierten WT-Maus, welche als Kontrolle der PrP^{Sc}-spezifischen Anfärbung fungierte (siehe Abbildung 32C), keine PrP^{Sc}-Ablagerungen nachweisbar.

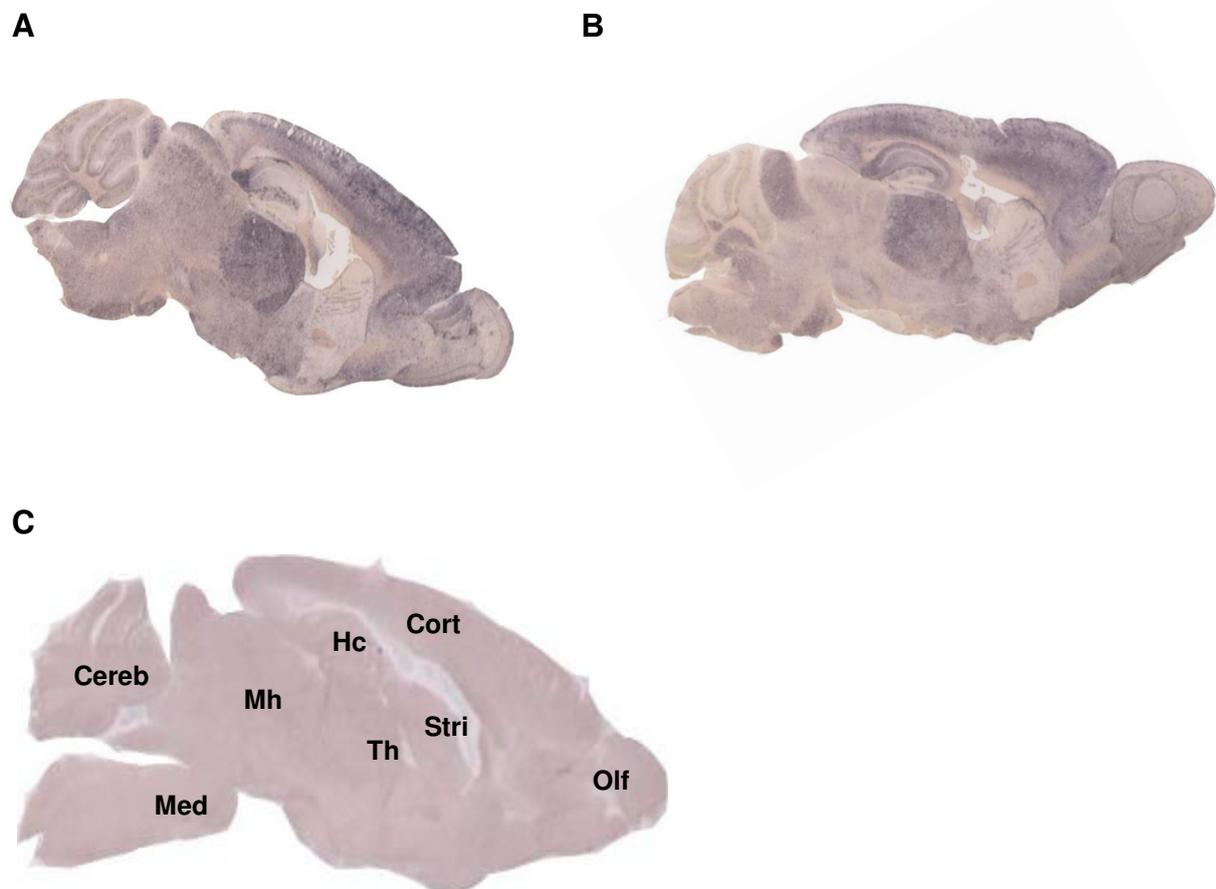


Abbildung 32 (A + B) PrP^{Sc} von Scrapie-infizierten WT (A)- und C/EBPD^(-/-)-Mäusen (B) wurde mittels Paraffin-embedded tissue (PET) Blot, unter Verwendung eines monoklonalen anti-PrP 6H4-AK in den Hirnregionen Cerebellum (Cereb), Medulla oblongata (Med), Mittelhirn (Mh), Thalamus (Th), Hippocampus (Hc), Striatum (Stri), Cortex (Cort), Bulbus olfactorius (Olf) nachgewiesen. Es konnte zwischen den beiden Mausstämmen kein Unterschied in der Menge und Lokalisation des pathogenen Prionproteins (PrP^{Sc}) festgestellt werden (exemplarische Darstellung zum Zeitpunkt 125 dpi). (C) stellt das präparierte Gehirngewebe eines mock-infizierten WT-Individuums dar.

4.2.3. Astrozytose

Ein wesentliches Merkmal der TSE-Pathogenese sind die PrP^{Sc}-Ablagerungen mit nachfolgender Neuroinflammation, bei der es zu einer Aktivierung der Astrozyten und Mikroglia kommt. In diesem Zusammenhang galt es der Frage nachzugehen, ob C/EBPD einen Einfluss auf die mit der Erkrankung assoziierte Gliaaktivierung hat. Es wurde zunächst die Astrozytose und im darauffolgenden Abschnitt 4.2.4 die Mikrogliose im Gehirn von Scrapie-infizierten WT- und C/EBPD^(-/-)-Mäusen mittels Immunhistochemie (siehe Abschnitte 3.3.4.1 und 3.3.4.2), quantitativer Real-Time PCR (siehe Abschnitt 3.5.4) und Western Blot (siehe Abschnitte 3.4.3, 3.4.3.1 und 3.4.2.3) untersucht.

4.2.3.1. Immunhistochemie

Mit Hilfe des GFAP-spezifischen AK anti-GFAP wurden zum Zeitpunkt 125 dpi aktivierte Astrozyten in Gewebeschnitten von jeweils vier mit Scrapie-infizierten WT- und C/EBPD^(-/-)-Mäusen nachgewiesen. In allen untersuchten Schnitten konnten GFAP-positive Astrozyten nachgewiesen werden. Dabei zeigten beide Mausstämme eine besonders starke Aktivierung der Astrozyten im Bereich des Hippocampus, Cortex, Thalamus, Mittelhirn, Kleinhirn, Pons und Medulla oblongata. Das Striatum wies eine mittelgradige Aktivierung der Astrozyten auf, während im Bulbus olfactorius die geringste Aktivierung der Astrozyten feststellbar war. Zwischen Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)- und WT-Mäusen konnte, hinsichtlich der Quantität der nachgewiesenen Astrozyten, kein Unterschied festgestellt werden (siehe Abbildung 33). Die von aktivierten Astrozyten bedeckten Flächen pro mm² wurden im Bereich des Hippocampus und M2-Cortex mittels des Programms ImageJ quantitativ bestimmt. Die Quantifizierung bestätigte, dass Scrapie-infizierte C/EBPD^(-/-)- und WT-Mäuse keine signifikanten Unterschiede im Ausmaß der Astrozytose zeigten (siehe Abbildungen 34A+B). Im Bereich des Hippocampus zeigten Scrapie-infizierte WT- gegenüber den Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)-Mäusen eine kleine, nicht signifikante Erhöhung der bedeckten Flächen der aktivierten Astrozyten (siehe Abbildung 34A). Wohingegen im Cortex die bedeckten Flächen der aktivierten Astrozyten der Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)-Mäuse im Vergleich zu den Scrapie-infizierten WT-Mäusen leicht erhöht waren (siehe Abbildung 34B).

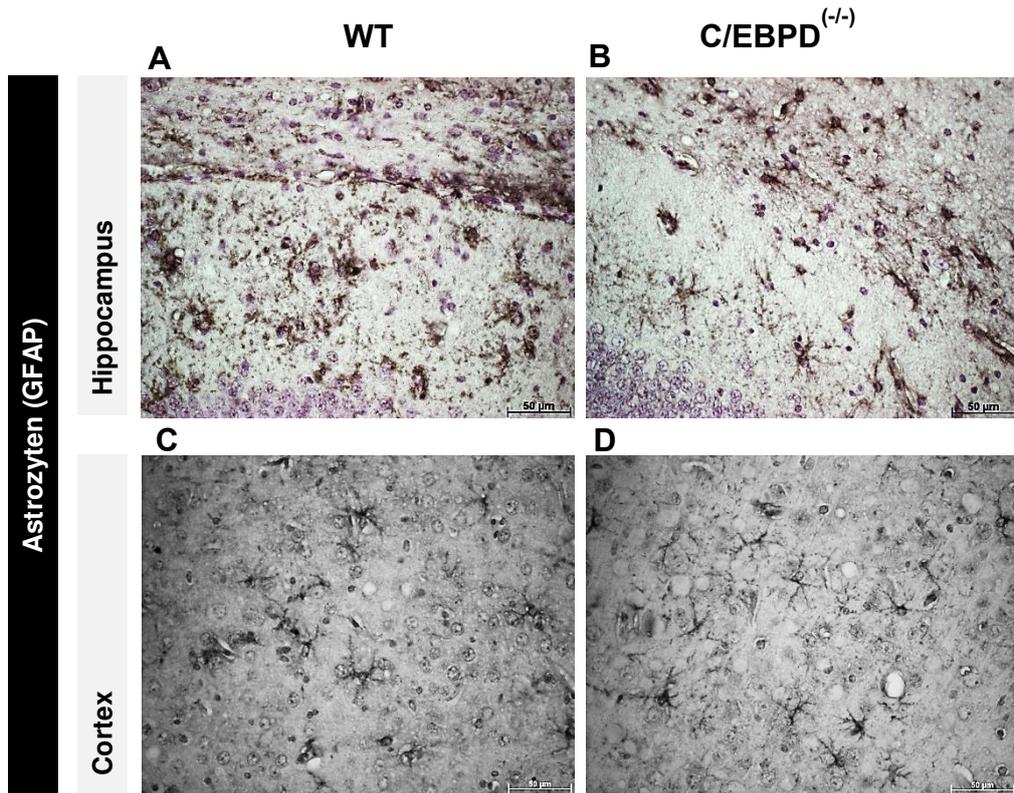


Abbildung 33 Immunhistochemischer Nachweis von aktivierten Astrozyten mittels GFAP-spezifischem AK im Hippocampus und M2-Cortex von Scrapie-infizierten WT- (A+C) und C/EBPD^{-/-}-Mäusen (B+D), (n=4), Zeitpunkt 125dpi, 400-fache Vergrößerung, Maßstab: 50 µm

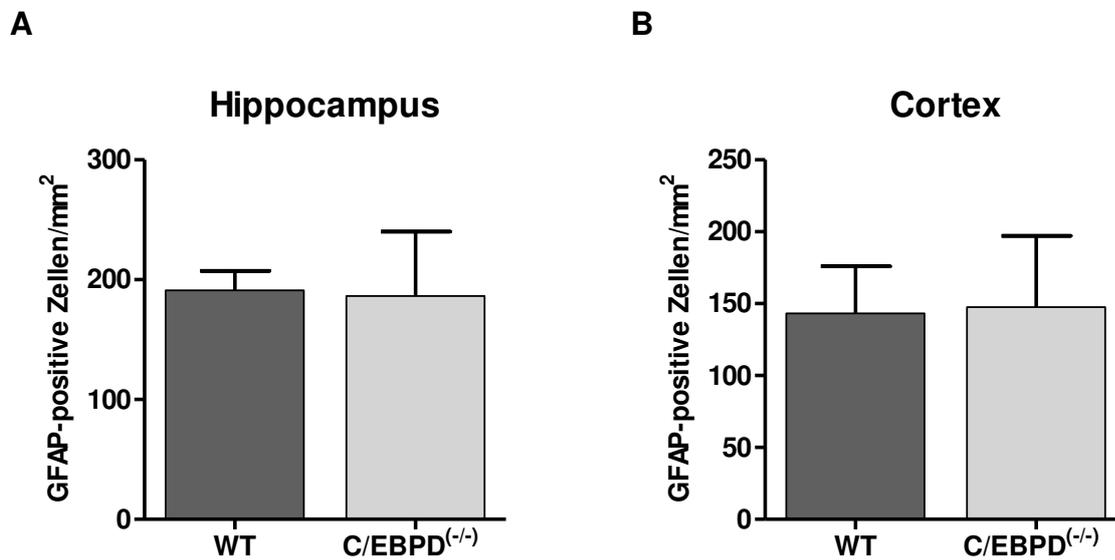


Abbildung 34 Quantitative Auswertung der von aktivierten Astrozyten bedeckten Flächen pro mm² im Bereich des Hippocampus (A) und M2-Cortex (B), (n=4) zum Zeitpunkt 125 dpi. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und C/EBPD^{-/-}-Mäusen festgestellt werden.

4.2.3.2. Real-Time PCR

Mittels *Gfap*-spezifischer TaqMan-Sonden wurde die *Gfap* mRNA-Expression im Gehirn von je drei Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)- und WT-Mäusen zum Zeitpunkt 125 dpi sowie zum terminalen Zeitpunkt der Erkrankung bestimmt. Dabei war im Vergleich zu den Scrapie-infizierten WT-Mäusen eine Zunahme der *Gfap* mRNA-Expression zum Zeitpunkt 125 dpi in Höhe von 49 % in den Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)-Mäusen zu verzeichnen. Allerdings zeigt die statistische Auswertung, dass das Ergebnis bei einem Signifikanzwert (P-Wert) von 0,06 knapp unter dem Signifikanzniveau liegt. Zum terminalen Zeitpunkt konnte zwischen den beiden Mausstämmen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (siehe Abbildung 35).

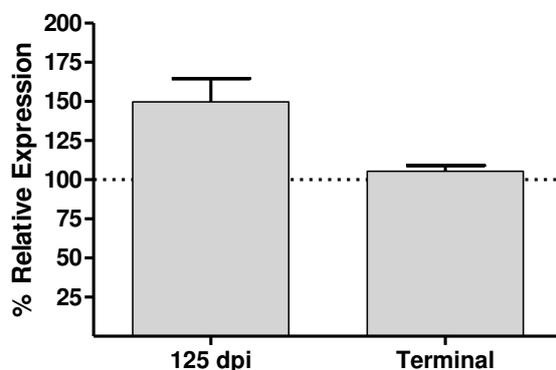


Abbildung 35 Quantitative Real-Time PCR zur Untersuchung der *Gfap* m-Expression zum Zeitpunkt 125 dpi und terminal der Erkrankung (n=3). Die mRNA-Expression Scrapie-infizierter C/EBPD^(-/-)-Mäuse wurde relativ zu Scrapie-infizierten WT-Mäusen = 100 % dargestellt.

4.2.3.3. Western Blot

Mit dem Astrozyten-spezifischen AK anti-GFAP wurde im Western Blot die Proteinmenge von GFAP im Hirnhomogenat von je vier mit Scrapie infizierten C/EBPD^(-/-)- und WT-Mäusen zum Zeitpunkt 125 dpi sowie zum terminalen Zeitpunkt der Erkrankung bestimmt. Es konnte die für GFAP typische 50 kDa große Bande detektiert werden, deren Intensität im Hirnhomogenat zum Zeitpunkt 125 dpi von Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)-Mäusen im Vergleich zu Scrapie-infizierten WT-Mäusen nur gering stärker war (siehe Abbildung 36A,B,C). Zum terminalen Zeitpunkt der Erkrankung war zwischen den beiden Mäusestämmen kein Unterschied festzustellen (siehe Abbildung 36C).

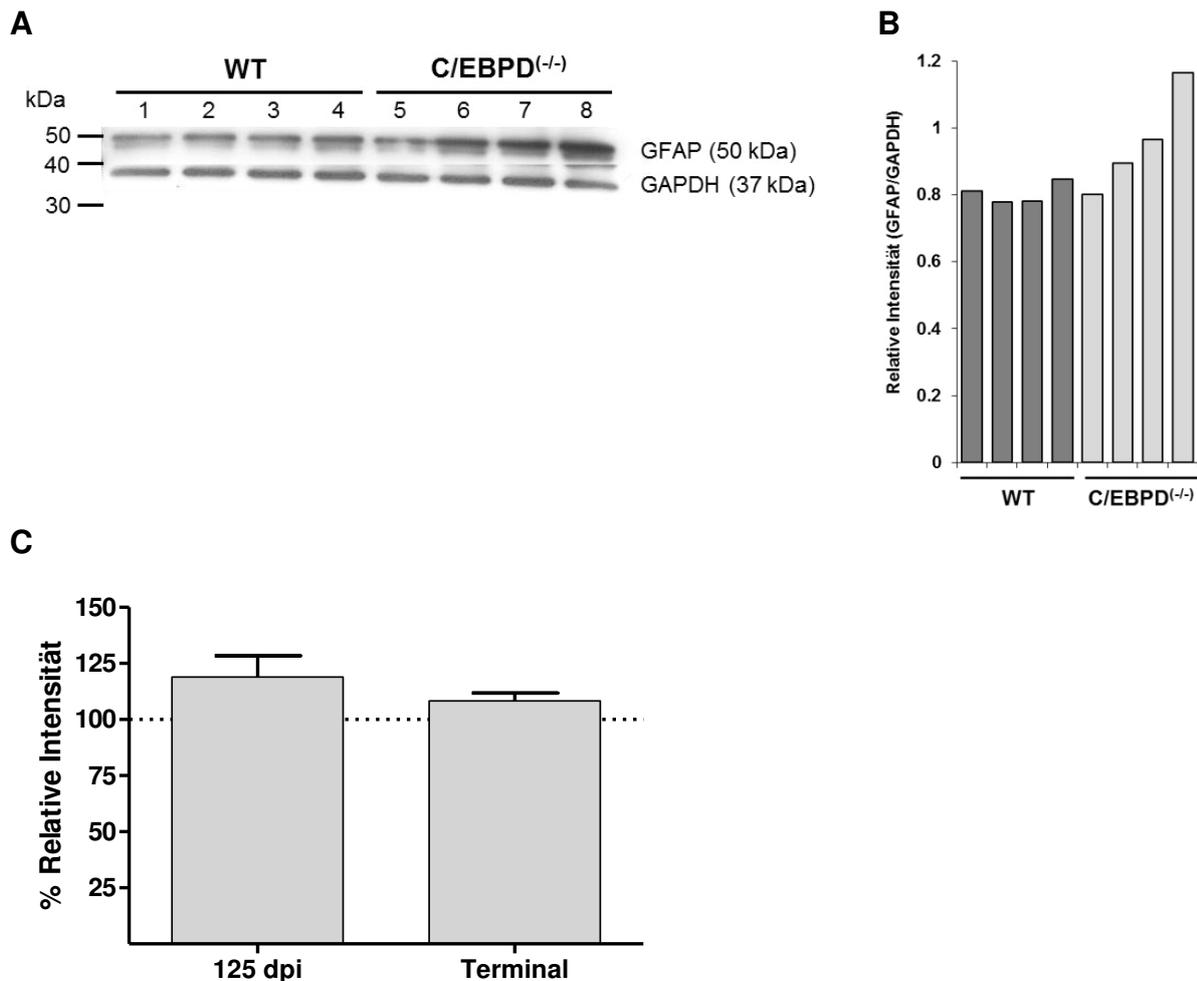


Abbildung 36 (A) GFAP-Nachweis im Western Blot, 125 dpi. Spur 1-4 Scrapie-infiziertes WT-Proteinlysate, Spur 5-8 Scrapie-infiziertes C/EBPD^(-/-)-Proteinlysate. (B) densitometrische Quantifikation der in (A) dargestellten Astrozyten-Aktivierung. (C) Quantitative Auswertung der mittels Western Blot durchgeführten Untersuchungen zum Zeitpunkt 125 dpi und zum terminalen Zeitpunkt der Erkrankung (n=4). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Scrapie-infizierten WT- und C/EBPD^(-/-)-Mäusen festgestellt werden. Die Bandenintensität von Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)-Mäusen wurde relativ zu Scrapie-infizierten WT-Mäusen = 100 % dargestellt.

4.2.4. Mikrogliose

In der Scrapiepathogenese kommt es nach PrP^{Sc}-Ablagerungen im Gehirn als Zeichen der Neuroinflammation neben der Astrozytose auch zur Aktivierung von Mikroglia. Diese Mikrogliose wurde im Gehirn von Scrapie-infizierten WT-Mäusen im Vergleich zu Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)-Mäusen mittels Immunhistochemie (siehe Abschnitte 3.3.4.1 und 3.3.4.2) und quantitativer Real-Time PCR (siehe Abschnitt 3.5.4) untersucht.

4.2.4.1. Immunhistochemie

Mit Hilfe des Iba1-spezifischen AK wurden zum Zeitpunkt 125 dpi aktivierte Mikroglia in Gewebeschnitten von jeweils vier mit Scrapie-infizierten WT- und C/EBPD^(-/-)-Mäusen nachgewiesen. In allen untersuchten Schnitten konnten Iba1-positive Mikroglia nachgewiesen werden. Dabei zeigten beide Mausstämm eine besonders starke Aktivierung der Mikroglia im Bereich des Hippocampus, Cortex, Thalamus, Mittelhirns, Kleinhirns, der Pons, der Medulla oblongata und des Striatums, während im Bulbus olfactorius die geringste Aktivierung von Mikroglia feststellbar war. Zwischen den Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)- und WT-Mäusen konnte, hinsichtlich der Quantität der nachgewiesenen Mikroglia, kein Unterschied festgestellt werden (siehe Abbildung 37).

Die von aktivierten Mikroglia bedeckten Flächen pro mm² wurden im Bereich des Hippocampus und M2-Cortex mittels des Programms ImageJ quantitativ bestimmt. Die Quantifizierung bestätigte, dass Scrapie-infizierte C/EBPD^(-/-)-Mäuse gegenüber Scrapie-infizierten WT-Mäusen keine Unterschiede im Ausmaß der Mikrogliose im Bereich des Hippocampus und Cortex zeigten (siehe Abbildungen 38A+B).

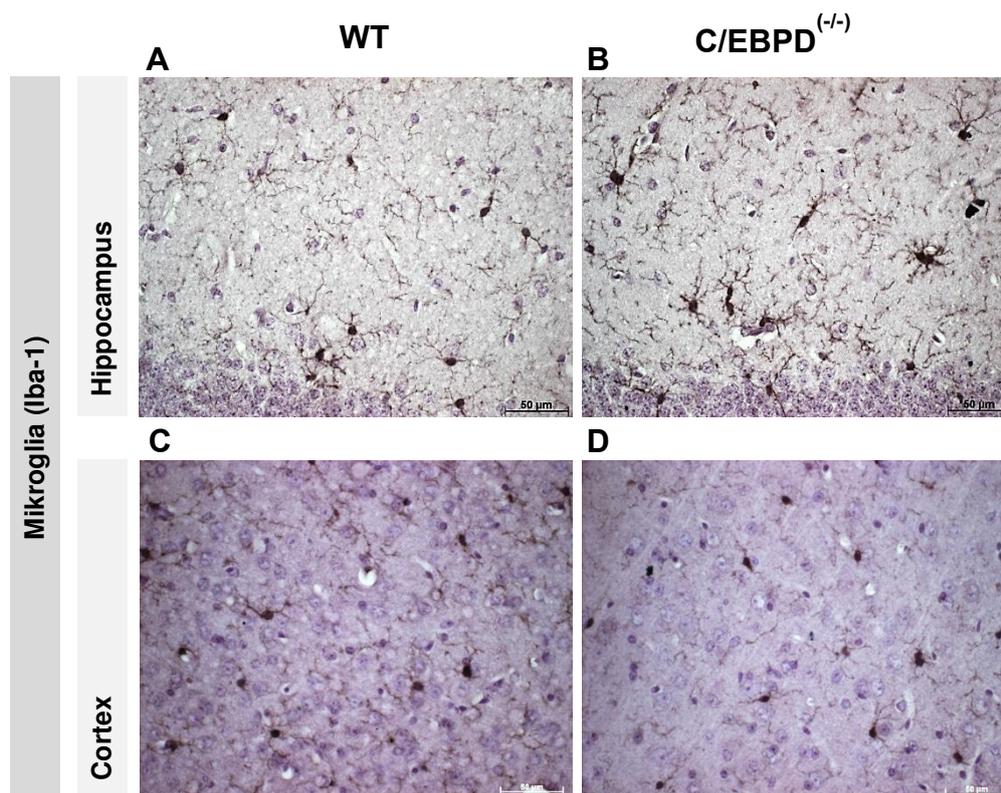


Abbildung 37 Immunhistochemischer Nachweis von aktivierten Mikroglia mittels Iba1-spezifischem AK im Hippocampus und M2-Cortex von Scrapie-infizierten WT- (A+C) und C/EBPD^(-/-)-Mäusen (B+D), (n=4), Zeitpunkt 125dpi, 400-fache Vergrößerung, Maßstab: 50 µm

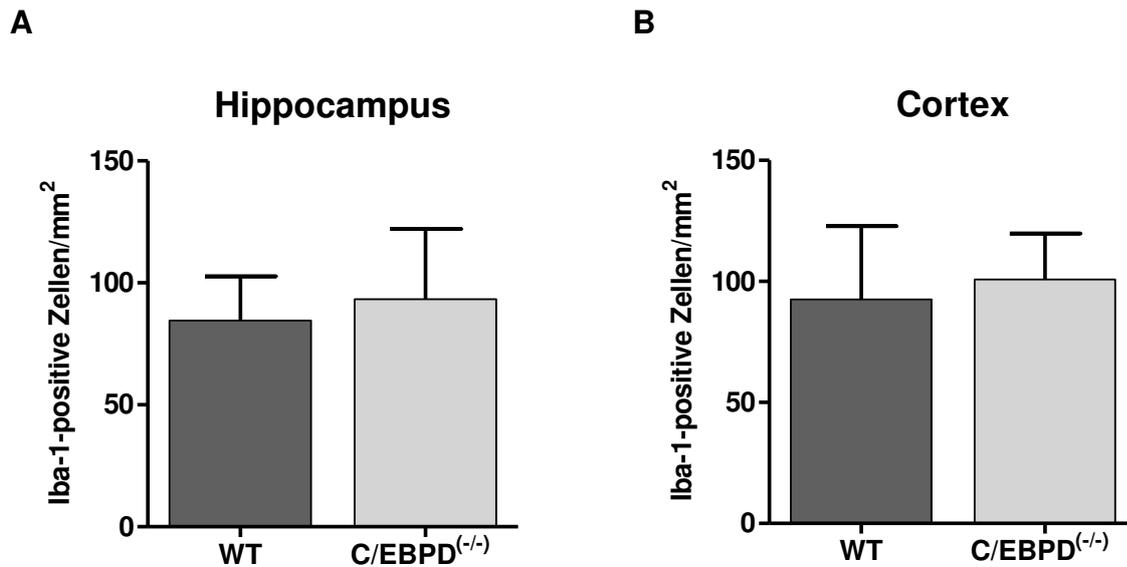


Abbildung 38 Quantitative Auswertung der von aktivierten Mikroglia bedeckten Flächen pro mm² im Bereich des Hippocampus (A) und M2-Cortex (B), (n=4). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und C/EBPD^(-/-)-Mäusen festgestellt werden.

4.2.4.2. Real-Time PCR

Mittels *Iba-1*-spezifischer TaqMan-Sonden wurde die *Iba-1* mRNA-Expression im Gehirn von je drei Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)- und WT-Mäusen zum Zeitpunkt 125 dpi sowie zum terminalen Zeitpunkt der Erkrankung bestimmt. Insgesamt zeigten die untersuchten Tiere dabei einen Anstieg des Mikrogliamarkers *Iba-1* in Abhängigkeit des Alters und des Krankheitsstadiums. Zum terminalen Zeitpunkt war in den Scrapie-infizierten WT-Mäusen im Vergleich zu den Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)-Mäusen eine Zunahme der *Iba-1* mRNA-Expression um 40 % zu verzeichnen (siehe Abbildung 39). Die Auswertung ergab, dass der Unterschied nicht signifikant ist.

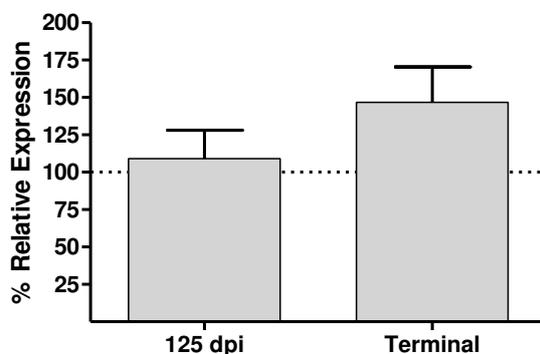


Abbildung 39 Quantitative Real-Time PCR zur Untersuchung der *Iba-1* mRNA-Expression zum Zeitpunkt 125 dpi und zum terminalen Zeitpunkt der Erkrankung (n=3). Die mRNA-Expression von Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)-Mäusen wurde relativ zu Scrapie-infizierten WT-Mäusen = 100 % dargestellt.

4.2.5. Expressionsanalysen C/EBPD-regulierter Gene im Prion-Modell

Aus vorangegangenen, immunologischen Studien aus dem Bereich der angeborenen Immun- und Akut-Phase-Antwort konnte gezeigt werden, dass C/EBPD Gene reguliert, die an der angeborenen Immunantwort beteiligt sind. Diese waren *C3*, *Saa3*, *Cxcl9*, *Cp*, *Ccl3*, *Cxcl2*, *Tnfaip6* und *Il-6* (Cardinaux et al., 2000; Bruder et al., 2004; Li et al., 2004; Sun et al., 2008; Litvak et al., 2009; Chang et al., 2012; Ko et al., 2012; Moore et al., 2012; Yan et al., 2012). Die mRNA-Expression dieser Gene wurde mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (siehe Abschnitt 3.5.4) in Scrapie infizierten WT- und C/EBPD^(-/-)-Mäusen zum terminalen Zeitpunkt der Erkrankung bestimmt.

Die Ergebnisse quantitativer Real-Time PCR (siehe Abbildung 40) bestätigen, dass die mRNA-Expression von *C3*, *Saa3*, *Cp* und *Tnfaip6* in Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)-Mäusen signifikant reduziert war. *C3* zeigte hierbei mit einer nur 32 %-igen Expression gegenüber Scrapie-infizierten WT-Mäusen die am stärksten reduzierte Expression. *Saa3*, *Cp* und *Tnfaip6* zeigten jeweils mit einer ca. 53 %-igen, 57 %-igen und 59 %-igen Expression gegenüber Scrapie-infizierten WT-Mäusen die zweit-, dritt- und viertstärkste reduzierte Expression. *Cxcl9*, *Ccl3*, *Cxcl2*, und *Il-6* zeigten eine nicht signifikant veränderte mRNA-Expression (siehe Abbildung 40).

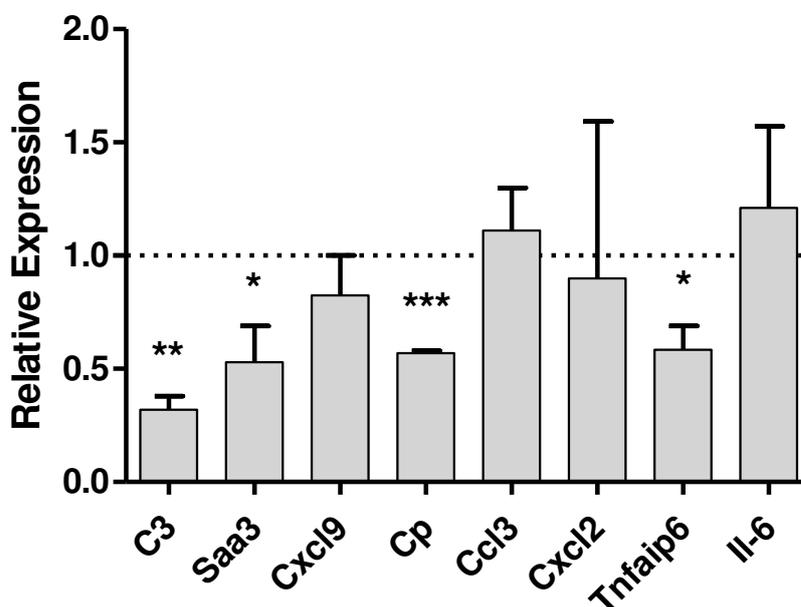


Abbildung 40 mRNA-Expression von *C3*, *Saa3*, *Cxcl9*, *Cp*, *Ccl3*, *Cxcl2*, *Tnfaip6* und *Il-6* wurde im Prion-Modell zum terminalen Zeitpunkt der Erkrankung mittels Real-Time PCR bestimmt (n=3). Die mRNA-Expression von Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)-Mäusen wurde dabei relativ zu den Scrapie-infizierten WT-Mäusen = 100 % dargestellt. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; t-Test).

4.3. Untersuchungen der Rolle von C/EBPD in Zellkulturmodellen

4.3.1. Expressionsanalysen C/EBPD-regulierter Gene im murinen Mixed-Glia-Zellkulturmodell

Die Ursache der veränderten Genexpression der von C/EBPD-regulierten Gene im Hirnhomogenat von APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen ist möglicherweise auf eine veränderte Genexpression in den bei der Neuroinflammation wichtigen Gliazellen zu suchen.

Um die Genexpression dieser Zellen separat untersuchen zu können, wurde eine primäre Mixed-Glia-Zellkultur (siehe Abschnitt 3.6.1) aus Astrozyten und Mikroglia neonataler C/EBPD^(-/-)- und WT-Mäusen angelegt. Die mRNA-Expression von *C3*, *Saa3*, *Cxcl9*, *Cp*, *Ccl3*, *Cxcl2*, *Tnfaip6* und *Il-6* dieser Zellen wurde mittels quantitativer Real-Time PCR (siehe Abschnitte 3.5.2 und 3.5.4) bestimmt. Gene, die besonders starke Veränderungen in ihrer Genexpression zeigten, wurden mittels Western Blot (siehe Abschnitte 3.4.2.3, 3.4.3 und 3.4.3.1) eingehender untersucht.

4.3.1.1. Real-Time PCR

Die mRNA-Expression von *C3*, *Saa3*, *Cxcl9*, *Cp*, *Tnfaip6* und *Il-6* war in C/EBPD^(-/-)-Zellen signifikant reduziert. *C3* zeigte hierbei mit einer nur 5 %-igen Expression gegenüber WT-Zellen die am stärksten reduzierte Expression, gefolgt von *Saa3*, *Cxcl9*, *Cp*, *Il-6* und *Tnfaip6* mit einer 8 %-igen, 14 %-igen, 18 %-igen, 47 %-igen und 82 %-igen Expression gegenüber WT-Zellen. *Ccl3* zeigte eine nahezu unveränderte und *Cxcl2* eine statistisch nicht signifikant reduzierte mRNA-Expression (siehe Abbildung 41).

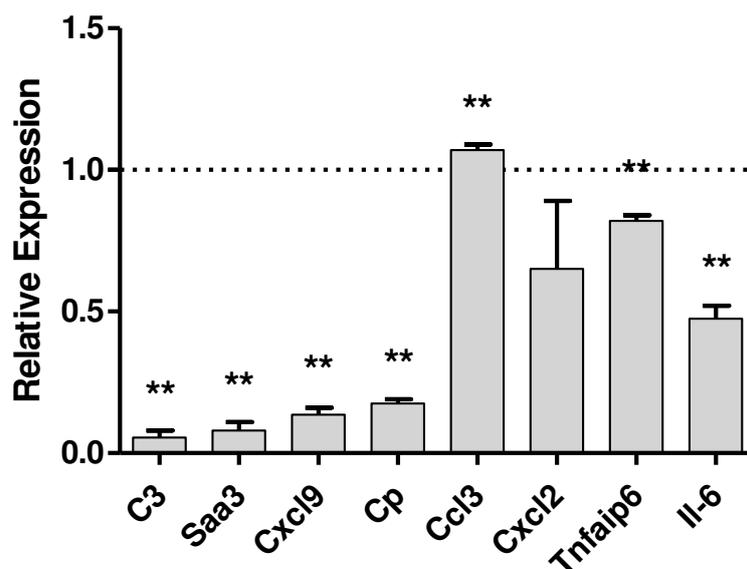


Abbildung 41 mRNA-Expression von *C3*, *Saa3*, *Cxcl9*, *Cp*, *Ccl3*, *Cxcl2*, *Tnfaip6* und *Il-6* wurde in primären Mixed-Gliazellen mittels Real-Time PCR bestimmt. Die mRNA-Expression von den C/EBPD^(-/-)-Mixed-Gliazellen wurde dabei relativ zu den WT-Mixed-Gliazellen = 100 % dargestellt. (*p<0.05; **p<0.01; t-Test).

4.3.1.2. Western Blot

Die signifikante Reduzierung der C3-Genexpression war deutlich von der Präsenz von C/EBPD abhängig. Folglich wurde zusätzlich die C3-Proteinexpression eingehender in C/EBPD^(-/-)-Gliazellen untersucht. Hierzu wurden Mixed-Glia-Zellkulturen erzeugt (siehe Abschnitte 3.6.1 und 3.6.2) und anschließend im Proteinlysate der C3- und C3b-Proteingehalt mittels Western Blot bestimmt. In Übereinstimmung mit quantitativen Real-Time PCR Ergebnissen waren nur im Proteinlysate der WT-Gliazellen die typischen C3- und C3b-Banden bei 186,5 kDa bzw. 102 kDa detektierbar. Im Gegensatz dazu waren im Proteinlysate der C/EBPD^(-/-)-Zellen die C3- und C3b-Banden kaum detektierbar (siehe Abbildung 42).

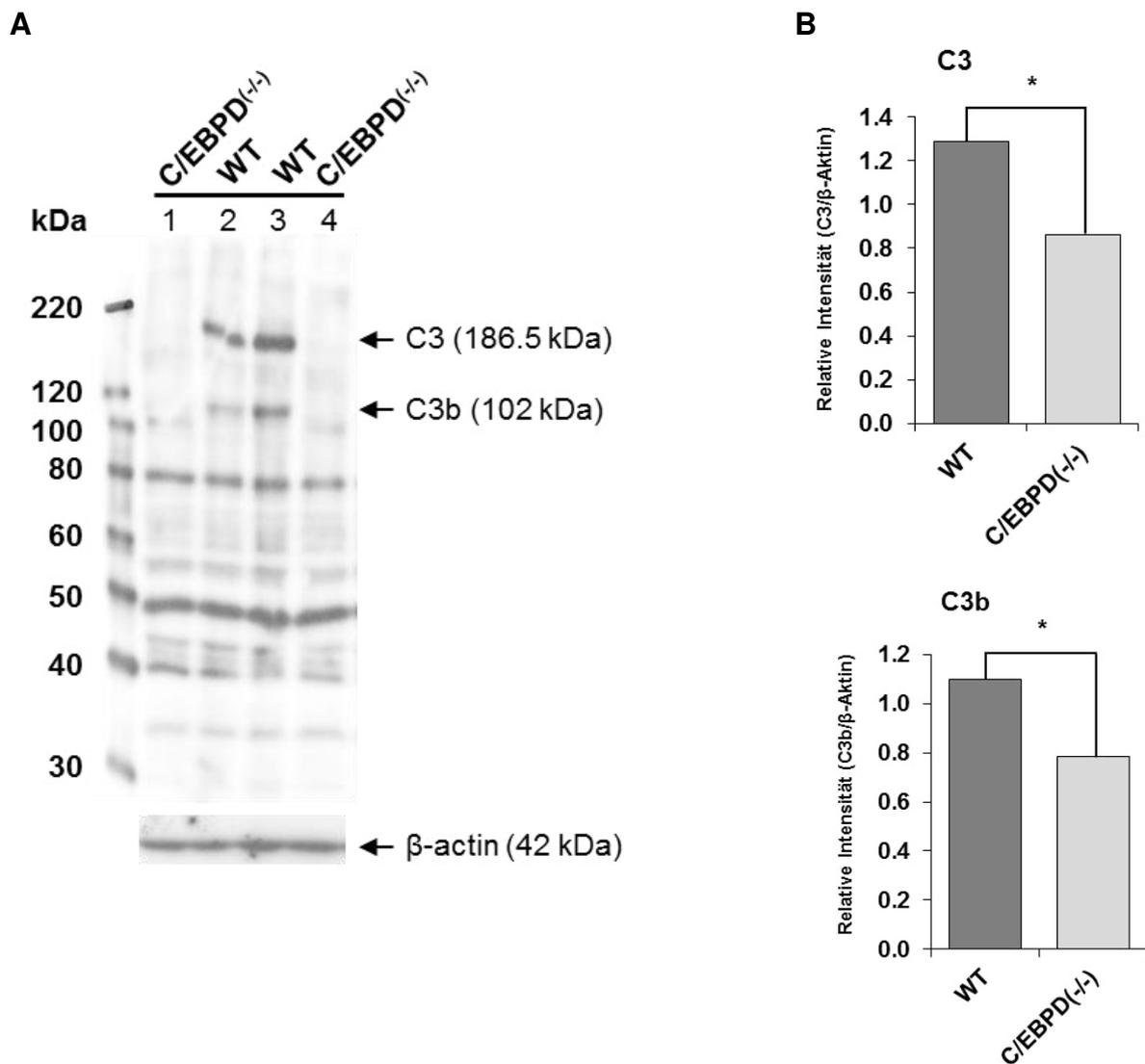


Abbildung 42 (A) C3- und C3b-Nachweis im Western Blot von primären WT- (Spur 2+3) und C/EBPD^(-/-)-Gliazellen (Spur 1+4). (B + C) Densitometrische Quantifikationen der in (A) dargestellten Proteinmenge der C3- und C3b-Komplementfaktoren. (* $p < 0.05$; t-Test).

4.3.2. Untersuchungen der Rolle von C/EBPD im humanen Glioblastoma-Zellkulturmodell

Zum weiteren Nachweis dafür, dass die *C3*-Transkription im ZNS durch C/EBPD angetrieben wird, wurde in einem humanen Glioblastoma-Zellkulturmodell (U-373 MG Zelllinie), welche den Astrozyten-Marker *GFAP* exprimiert (Sedo et al., 2001), mittels Transfektion (siehe Abschnitt 3.6.5) eines C/EBPD-Expressionsvektors und quantitativer Real-Time PCR (siehe Abschnitte 3.5.2 und 3.5.4) überprüft. Die mutmaßlichen Zielgene *C3*, *CXCL9*, *CCL3* und *TNFAIP6* zeigten 48 Stunden nach Transfektion mit dem C/EBPD-Expressionsvektor einen robusten, weit über 5-fachen Anstieg ihrer mRNA-Expression gegenüber den kontroll-transfizierten Zellen. Währenddessen war *CP* und *IL-6* weniger stark induzierbar (<5-fach) oder nicht reagierend (*CXCL2*) (siehe Abbildung 43).

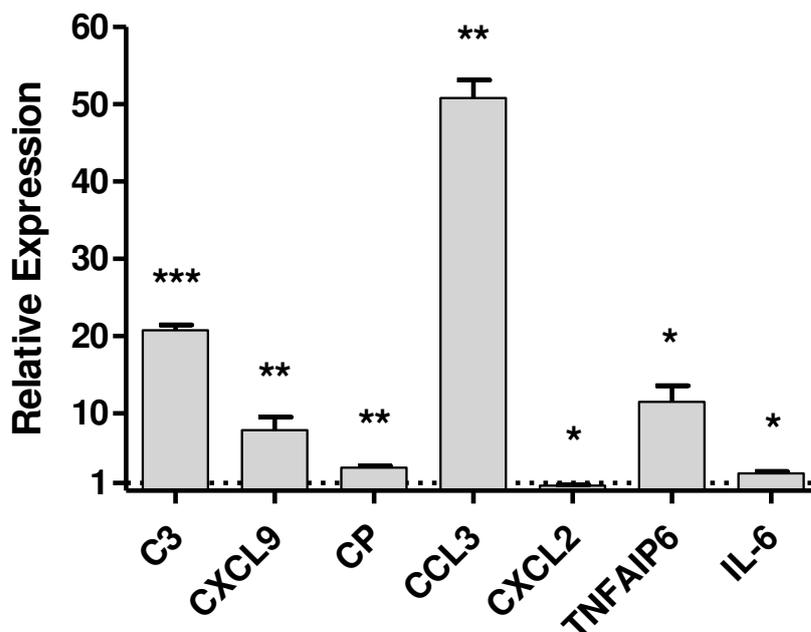


Abbildung 43 mRNA-Expression von *C3*, *CXCL9*, *CP*, *CCL3*, *CXCL2*, *TNFAIP6* und *IL-6* wurde in U-373 MG Zellen 48 Stunden nach Transfektion mit einem C/EBPD-Expressionsvektor mittels Real-Time PCR bestimmt. Die mRNA-Expression der kontroll-transfizierten Zellen wurde auf 1 gesetzt. Gezeigt sind die mRNA-Expression der Gene relativ zu den kontroll-transfizierten Zellen. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; t-Test). Zu beachten ist, dass die Expression des humanen *SAA3*-Gens in diesem Experiment nicht enthalten ist, da es als ein nicht-funktionelles, nicht transkribiertes Pseudogen betrachtet wird (Kluve-Beckerman et al., 1991).

5 Diskussion

In der Peripherie ist der Transkriptionsfaktor C/EBPD an der Regulation der angeborenen Immunantwort, die z.B. durch bakterielle Infektionen induziert wird, beteiligt (Liu et al., 2007; Litvak et al., 2009; Balamurugan et al., 2013). Da C/EBPD seine eigene Transkription antreibt, könnte es, ohne ausreichende Gegenregulation, zu einer unerwünschten Chronifizierung entzündlicher Reaktionen beitragen, die unter Umständen selbst nach Beseitigung des ursprünglichen Stimulus weiter ablaufen würden. Um dem entgegenzuwirken, stehen diese entzündlichen Reaktionen in einem regulierten Gleichgewicht. In Makrophagen konnten Litvak und Kollegen (2009) ein genregulatorisches Netzwerk identifizieren, das bei einem Stimulus (z.B. bakterieller Infektion) neben C/EBPD auch den Activating Transcription Factor-3 (ATF3) hochreguliert, der als Repressor von C/EBPD fungiert (Litvak et al., 2009). Unterstützung dafür, dass C/EBPD auch im ZNS durch ATF3 reprimiert wird, lieferten mRNA-Expressionsanalysen von LPS-stimulierten ATF3^(-/-)-Mixed-Glia-Kulturen, in denen C/EBPD deutlich stärker (>4-fach) exprimiert wurde (Dr. Baier, persönliche Mitteilung).

Bei chronisch neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. AD oder Prionerkrankungen spielt die Aktivierung von Elementen der angeborenen Immunantwort eine Rolle (Wyss-Coray, 2006; Gomez-Nicola et al., 2013; Heneka et al., 2013; Prokop et al., 2013; Heppner et al., 2015). Die Rolle von C/EBPD in diesen neuroinflammatorischen Prozessen bzw. generell im Krankheitsgeschehen ist jedoch bisher kaum untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit wurden C/EBPD-defiziente Mäuse charakterisiert und ergänzende Untersuchungen zur Rolle C/EBPD-regulierter Gene in murinen Mixed-Glia- und humanen Glioblastom-Zellkulturen (U-373 MG) durchgeführt, um eine mögliche Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors in AD bzw. in Prionerkrankungen besser verstehen zu können.

Sowohl bezüglich der Plaquebelastung als auch bezüglich der A β -Konzentrationen in Hirnextrakten zeigte sich in APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren zu allen untersuchten Zeitpunkten eine deutliche Erhöhung. Die verstärkte Plaqueablagerung wurde sowohl mittels Western Blot und immunhistochemischer Färbungen als auch im Kongorot-Nachweis von „echten“ Amyloid-Plaques bestätigt. Die verstärkte Ablagerung von A β war nicht durch eine veränderte Expression von APP im ZNS zu erklären. Auch Gene, deren Produkte am Transport bzw. Metabolisierung von A β beteiligt sind (*Mme*, *ApoE*, *Lrp1*, *CtsB*, *Ece1*, *Ace1*, *Ide*, *Ager*), wurden im Vergleich zu APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)- und APP/PS1-Mäusen gleich stark exprimiert. Im Gegensatz zum AD-Modell war die Ablagerung von fehlgefaltetem und Proteinase K-resistentem Prionprotein in Scrapie-

infizierten C/EBPD^(-/-)-Mäusen im Vergleich zu infizierten Wildtyptieren unverändert. C/EBPD beeinflusst folglich nicht generell das Proteinefehlfaltungsgeschehen, sondern scheint spezifisch die Akkumulation von A β zu begünstigen. Interessanterweise wurden in einer ähnlichen Studie offenbar keine Unterschiede hinsichtlich der kortikalen Plaquelastung zwischen APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)- und APP/PS1-Tieren gesehen (Ko et al., 2015). Dieses Ergebnis wurde in der entsprechenden Veröffentlichung jedoch nur erwähnt, ohne dass die zugrundeliegenden Daten dazu gezeigt worden wären („data not shown“). Eventuelle Erklärungen für diese möglicherweise divergierenden Befunde sind daher unklar und können gegenwärtig nicht diskutiert werden.

In zwei früheren Arbeiten wurde die C/EBPD-Expression in Astrozyten nach Inkubation mit A β -Peptiden (A β ₂₅₋₃₅ sowie A β ₁₋₄₂) untersucht. Demzufolge würde fibrilläres, jedoch nicht oligomeres A β die Induktion von C/EBPD durch Stimulation von Astrozyten mit IL-1 β oder LPS *in vitro* unterdrücken. In Maushirnen wurde eine altersabhängige Abnahme der C/EBPD-Expression beschrieben, die in Vorderhirnen von 16 Monate alten APP-transgenen Tieren (APP^{ArcSwe}) nochmals ausgeprägter war (Samuelsson et al., 2008; Ramberg et al., 2011). Diese Befunde sind in jeder Hinsicht überraschend und stehen in Widerspruch zu einer Reihe von Arbeiten anderer Forschungsgruppen. C/EBPD wird im Gehirn von AD-Patienten und Mausmodellen für AD astrozytär überexprimiert. Zudem wurde in Cortices älterer Mäuse (22-24 Monate) eine erhöhte C/EBPD-Expression gemessen. Es ist bekannt, dass nach einem Hirntrauma in älteren Mäusen die Induzierbarkeit von C/EBPD im Vergleich zu adulten Tieren (5-6 Monate) drastisch erhöht ist (Sandhir and Berman, 2010). Zusammengefasst ergibt sich ein Bild, in dem C/EBPD verstärkt von aktivierten Astrozyten exprimiert wird, wobei die Aktivierung sowohl Teil eines pathologischen Geschehens (z.B. AD, Hirntrauma, virale, bakterielle und Prion-Infektionen) als auch im Zuge des natürlichen Alterungsprozesses erfolgen kann.

Weder im hier untersuchten AD- noch im Scrapie-Modell zeigten sich Auswirkungen der C/EBPD-Defizienz auf den Phänotyp der Tiere bzw. auf den Krankheitsverlauf. Die klinische Symptomatik und insbesondere die Überlebenszeiten bei den Scrapie-Infektionen waren in An- oder Abwesenheit von C/EBPD identisch. In Anbetracht der höheren Plaquelastung der APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Tiere wären hier Auffälligkeiten zu erwarten gewesen. Diese zeigten sich jedoch weder bei der Gewichtszunahme noch im Nestbau-Assay. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass aufwendigere Verhaltensuntersuchungen zur Erfassung von Lern- und/oder Gedächtnisbeeinträchtigungen (z.B. „Morris water maze“-Test, „Y-maze“-Test) hier andere Ergebnisse gezeigt hätten, denn typischerweise korreliert in

Mausmodellen für AD das Ausmaß der Plaquebelastung mit der Schwere der Verhaltensdefizite.

Als Reaktion auf die verstärkte Plaqueablagerung im AD-Modell wäre bei den C/EBPD-defizienten Tieren eigentlich auch eine ausgeprägtere Gliose zu erwarten gewesen. Wenn jedoch C/EBPD selbst für die inflammatorische Gliaaktivierung von Bedeutung wäre, würde die Gliose in Abwesenheit von C/EBPD entsprechend schwächer ausfallen. Im Vergleich zwischen C/EBPD^(-/-)- und Wildtyp-Tieren zeigten sich in der hier vorliegenden Arbeit bezüglich der Astrozytose und Mikrogliaose weder im AD- noch im Prion-Modell Unterschiede. Dies galt sowohl hinsichtlich der Zellzahlen und Morphologie als auch für mRNA- und Proteinexpression der Astro- bzw. Mikroglia-Marker GFAP und Iba-1. Diese Befunde schließen jedoch eine geringfügige lokale Reduktion der Gliazahlen in der unmittelbaren Umgebung von Plaques nicht aus, die auf eine Beeinträchtigung der glialen Migration zurückzuführen sein könnte (Ko et al., 2014; Wang et al., 2015). Tatsächlich konnte hier gezeigt werden, dass C/EBPD unter anderem die (astro-) gliale Expression der Chemokine *CCL3* und *CXCL9* reguliert (siehe unten), was in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein könnte (Ko et al., 2014; Wang et al., 2015).

Bereits frühere Genexpressionsstudien belegten eine Rolle von C/EBPD in der Regulation bestimmter Glia-Funktionen *in vitro* und *in vivo*. Die Überexpression von C/EBPD in der humanen Glioblastom-Zelllinie U-373 MG führte zur Induktion der Expression des Akut-Phase-Gens Pentraxin-3 (*PTX-3*) und dessen Interaktionspartner *TNFAIP6* (Ko et al., 2012). *In vitro* hemmt *PTX-3* die Phagozytose geschädigter Neurone durch Makrophagen (Ko et al., 2012). Dementsprechend könnte C/EBPD über *PTX-3* entzündliche Reaktionen beeinflussen, die durch degenerierendes Nervengewebe ausgelöst werden (Balamurugan et al., 2013; Ko et al., 2014). *Tnfaip6* werden anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben (Degos et al., 2015). Folglich könnte von Astrozyten sezerniertes *Tnfaip6* unter anderem die Aktivierung von Mikroglia modulieren.

Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Expression von *C3*, *Saa3*, *Cxcl9*, *Cp* und *Il-6* in C/EBPD-defizienten Mixed-Glia-Zellkulturen signifikant vermindert war. Umgekehrt führte die Transfektion von U-373 MG Zellen mit einem C/EBPD-Expressionsvektor zu einer deutlichen Hochregulation der mRNA von *C3*, *CCL3*, *CP*, *CXCL9*, *IL-6* und *TNFAIP6*. Diese Ergebnisse legen nahe, dass C/EBPD die Expression dieser Gene im ZNS regulieren kann.

Die Funktion von C/EBPD kann je nach Zelltyp stark variieren. Deutlich wird dies beispielsweise anhand der neuen Ergebnisse zur Expression von *Tnfaip6*: die *Tnfaip6*-Expression war einerseits in primären Mixed-Glia-Kulturen unabhängig von C/EBPD, aber

erwies sich andererseits in U-373 MG Zellen als durch C/EBPD induzierbar. Zudem ist die Aktivierung durch C/EBPD offenbar abhängig von der gewählten Art der Zellstimulation. Dass die Funktion von C/EBPD von weiteren Faktoren beeinflusst wird, konnte auch in anderen Studien gezeigt werden. Valente und Kollegen haben LPS-stimulierte Mixed-Glia-Kulturen untersucht und konnten zeigen, dass die Expression von *IL-6* nicht von C/EBPD abhängig ist (Valente et al., 2013). Möglicherweise wird in diesem Fall C/EBPD durch CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPB) ersetzt, ein Transkriptionsfaktor, der mit C/EBPD Heterodimere bilden kann (Maranto et al., 2011). Es wäre denkbar, dass dieser oder ein ähnlicher Mechanismus ursächlich für die in dieser Arbeit beobachteten funktionellen Unterschiede von C/EBPD ist.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen von C/EBPD-defizientem Maushirngewebe zeigten übereinstimmend, dass die Gene *C3* und *Saa3* sowohl im AD- als auch im Scrapie-Modell vermindert exprimiert wurden. Von beiden Genen ist bekannt, dass sie typischerweise in aktivierten Astrozyten exprimiert werden (Cardinaux et al., 2000; Villalba et al., 2012), was gut zur beschriebenen astrozytären Überexpression von C/EBPD in AD bzw. in murinen AD-Modellen passt (Li et al., 2004; Ko et al., 2012). Deshalb ist davon auszugehen, dass C/EBPD sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein relevanter Transkriptionsfaktor für die Expression der beiden Gene *C3* und *Saa3* ist. Die beobachtete Induktion der Expression von *C3* durch die pro-inflammatorischen Zytokine *IL-1* und *TNF- α* wäre dementsprechend letztlich auf C/EBPD zurückzuführen (Veerhuis et al., 1999). Da in den C/EBPD^(-/-)-Mäusen eine Expression von *C3* und *Saa3* immer noch nachweisbar war, besteht der Verdacht, dass andere Transkriptionsfaktoren, wie z. B. C/EBPB (Maranto et al., 2011), einen Ausfall von C/EBPD zumindest teilweise kompensieren können. Insbesondere hinsichtlich der *C3* Expression wurde teilweise eine Abhängigkeit von C/EBPB beschrieben (Hernandez-Encinas et al., 2015). Es ist bekannt, dass sowohl C/EBPD als auch C/EBPB eine große Zahl gemeinsamer Zielgene haben, deren Transkription sie regulieren. Dabei können C/EBPD und C/EBPB unabhängig voneinander als Homodimere oder auch zusammen in Form von Heterodimeren agieren (Balamurugan and Sterneck, 2013). Unter Berücksichtigung dieser Fakten wäre es denkbar, dass in Abhängigkeit von Zelltyp und Zellstimulus der jeweilige Beitrag von C/EBPD oder C/EBPB ein größeres Gewicht hat. Die häufig untersuchte Stimulation von Gliakulturen mit LPS induziert die C/EBPD und C/EBPB Expression praktisch gleichzeitig und in gleicher Stärke, was für eine Beteiligung von Heterodimeren an der Transkription des *C3* Gens sprechen würde. Interessanterweise führt die Exposition von primären Astrozyten mit IFN-gamma zu einer nahezu selektiven Induktion von C/EBPB, die jedoch allein nicht für eine verstärkte Expression von *C3* ausreichend ist (Cardinaux et al., 2000). Zusammengefasst erscheint es als wahrscheinlich, dass für eine

maximale Induktion von C3 beide Transkriptionsfaktoren, C/EBPD und C/EBPB, benötigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten haben gezeigt, dass in APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen im Vergleich zu APP/PS1-Mäusen erhöhte Plaqueablagerungen sichtbar werden. Lässt sich diese Beobachtung durch die reduzierte Expression der Komplementkomponente C3 erklären? Einige experimentelle Befunde haben bereits eine mögliche Beteiligung der Komplementkomponente C3 in der AD Pathogenese nahegelegt (Wyss-Coray et al., 2002; Maier et al., 2008). C3 ist in von AD betroffenem Hirngewebe überexprimiert (Eikelenboom and Veerhuis, 1996; Yasojima et al., 1999) und wird benötigt für die effiziente Phagozytose bzw. Beseitigung von fibrillärem A β (Stoltzner et al., 2000; Fu et al., 2012). Dementsprechend ist in Abwesenheit von C3 die zelluläre Aufnahme von A β in Gliakulturen deutlich reduziert (Stoltzner et al., 2000; Fu et al., 2012). In murinen AD-Modellen führt sowohl eine C3-Defizienz als auch die Hemmung der Aktivierung von C3 zu einer verstärkten Plaqueablagerung (Wyss-Coray et al., 2002; Maier et al., 2008). Neben der Bedeutung für die Phagozytose von A β könnte C3 auch direkt dessen Aggregation verhindern, was in Abwesenheit von C3 ebenfalls die Plaquebelastung erhöhen würde. (Maier et al., 2008). Aufgrund dieser Befunde erscheint es als wahrscheinlich, dass die erhöhte Plaquebelastung in den APP/PS1 x C/EBPD^(-/-)-Mäusen auf die, in Abwesenheit von C/EBPD, geringere C3-Expression zurückzuführen ist. Theoretisch könnte die Erhöhung der C3-Expression in Hirngewebe von AD-Patienten eine Möglichkeit zur therapeutischen Intervention darstellen. Eine neuere Arbeit zeigte jedoch auf, dass sich die Interaktion von C3 mit neuronal exprimiertem C3 Rezeptor C3aR negativ auf die Morphologie und Funktion von Dendriten auswirkt (Lian et al., 2015). Dementsprechend würde eine Überexpression von C3 bei AD zwar die Plaquebelastung mindern, dies wäre jedoch mit einer Beeinträchtigung dendritischer Netzwerke verbunden, was insgesamt einen möglichen klinischen Nutzen von C3 als zweifelhaft erscheinen lässt. Wenn jedoch bei einer Blockade der Interaktion von C3 (bzw. dessen Spaltprodukt C3a) mit seinem Rezeptor C3aR die C3-vermittelte Reduktion der Plaqueablagerung erhalten bliebe, könnte dies ein Weg sein, um nützliche und schädliche Funktionen von C3 voneinander zu trennen.

Im Vergleich zu den Wildtypkontrollen zeigte sich eine verminderte C3 mRNA-Expression auch in Hirngewebe von Scrapie-infizierten C/EBPD^(-/-)-Mäusen. Bei intraperitonealen Prion-Infektionen verzögert eine C3-Defizienz die Akkumulation von fehlgefaltetem PrP^{Sc} in der Milz und führt letztlich zu verlängerten Überlebenszeiten (Klein et al., 2001; Mabbott et al., 2001; Michel et al., 2013). Während C3 offenbar die Ausbreitung der Prion-Infektion in der Peripherie begünstigt und damit zur Neuroinvasion der Prionen beiträgt (Hasebe et al.,

2012), ist die Funktion von C3 nach intrazerebral erfolgter Infektion, was Gegenstand dieser Arbeit war, weniger klar. Da C3 in Prion-infiziertem Hirngewebe signifikant überexprimiert ist (Riemer et al., 2004; Lv et al., 2014), wären in diesem Zusammenhang z. B. Untersuchungen zur intrazerebralen Infektion von C3-defizienten Mäusen von Interesse. Zumindest im hier untersuchten Scrapie-Modell traten keine Veränderungen bezüglich der PrP^{Sc}-Ablagerungen und der Überlebenszeiten auf.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eindrucksvoll, dass der Transkriptionsfaktor C/EBPD in chronisch neurodegenerativen Erkrankungen eine komplexe Rolle einnimmt. In Teilen erklärt sich diese Komplexität aus den sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Funktionen dieses Transkriptionsfaktors. Diese scheinbar gegensätzlichen Aktivitäten können z.B. auf Heterodimerisierung mit verschiedenen Bindungspartnern (z.B. C/EBPA, C/EBPB, C/EBPE, C/EBPZ (CHOP), CREB, ATF4) zurückzuführen sein. Die Heterodimerisierung kann sowohl die Erkennung der DNA-Bindungsstellen modulieren als auch, wie im Fall einer Heterodimerisierung mit CHOP, eine DNA-Bindung gänzlich verhindern (Ron and Habener, 1992). Weiterhin können posttranskriptionale Modifikationen von C/EBPD dessen Funktion beeinflussen. Die Sumoylierung von C/EBPD an Aminosäurerest K120 wurde beispielsweise als Mechanismus diskutiert, der C/EBPD von einem Aktivator der Transkription in einen Repressor umwandelt. Dementsprechend kann C/EBPD, das selbst durch IL-1 β induzierbar ist, sowohl die Expression dieses pro-inflammatorischen Zytokins antreiben als auch als Gegenspieler der Induktion anderer Gene durch IL-1 β fungieren, was einer anti-inflammatorischen Wirkung gleichkäme (Balamurugan and Sterneck, 2013).

Die unterschiedlichen bzw. gegensätzlichen Funktionen von C/EBPD erklären auch den relativ wenig ausgeprägten Phänotyp der C/EBPD^(-/-)-Mäuse in den hier untersuchten Modellen, da die verschiedenen pro- und anti-inflammatorischen Funktionen dieses Transkriptionsfaktors in der Summe *in vivo* ein uneindeutiges Bild ergeben. Zudem liegt bezüglich C/EBPD und C/EBPB, wie bereits erwähnt, zumindest teilweise eine Redundanz vor. D.h. der Ausfall des einen Faktors kann partiell durch den anderen kompensiert werden, was ebenfalls eine differenzierte Betrachtung der Funktion von C/EBPD erschwert. Insbesondere im Modell der Prion-Infektion zeigten sich keine Auswirkungen einer C/EBPD-Defizienz bei den Überlebenszeiten, der Glia-Aktivierung und bei der Akkumulation von fehlgefaltetem PrP^{Sc}. Dennoch konnte sowohl im Prion- als auch im AD-Modell erstmals *in vivo* gezeigt werden, dass C/EBPD für die Transkription, insbesondere des Akut-Phase-Gens C3, von Bedeutung ist. Die verminderte Expression von C3 in Abwesenheit von

C/EBPD in den APP/PS1 x C/EBPD^(-/)-Mäusen dürfte auch die verstärkte Belastung mit A β in diesen Tieren erklären.

Einen Schwerpunkt weiterführender Arbeiten könnten Untersuchungen zur Redundanz von C/EBPD und C/EBPB darstellen, die sich mit geeigneten Doppel-Knockout-Modellen adressieren ließe. Damit wäre es möglich, die Rolle dieser beiden sich ergänzenden Transkriptionsfaktoren z.B. in der entzündlichen Glia-Aktivierung nochmals gezielt zu untersuchen. Da C/EBPD seine eigene Transkription antreiben kann, sind auch die Mechanismen, die einer möglichen dauerhaften und ausgeprägten (astrozytären) C/EBPD-Überexpression entgegenwirken, von besonderem Interesse. Neben ATF3, dem bereits erwähnten Repressor des C/EBPD-Promoters, kommt hier auch der Transkriptionsfaktor Miz1 (Do-Umehara et al., 2013) in Betracht, dessen diesbezügliche Rolle näher untersucht werden müsste.

6 Verzeichnisse

6.1. Abkürzungsverzeichnis

Ace1	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1
ACT	Alpha 1-antichymotrypsin
AD	Alzheimer's disease (Alzheimer-Erkrankung)
Aif1	Allograft inflammatory factor 1
AP	Alkalische Phosphatase
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APP/PS1	APP _{Swe} /PS1dE9
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATF3	Aktivierungs-Transkriptionsfaktor 3
A β	Beta-Amyloid
AU	willkürliche Einheit (engl. arbitrary unit)
BACE1	beta-site APP cleaving enzyme 1
BCA	bicinchoninic acid assay
BCIP	Brom-Chlor-Indolyl-phosphat
β -Aktin	Beta-Aktin
BPB	Bromphenolblau
C3	Komplementkomponente C3
C/EBPB	CCAAT/enhancer-binding protein beta
C/EBPD	CCAAT/enhancer-binding protein delta
Ccl	Chemokine (C-C motif) ligand
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CNS	Central Nervous System
Cp	Ceruloplasmin
CR3	Komplement-Rezeptor 3
CtsB	Cathepsin B
Cxcl	chemokine (C-X-C motif) ligand
CWD	Chronic Wasting Disease
DAB	3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
dd.	double distilled
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dpi	days postinfection, Tage nach Infektion
DTT	Dithiothreitol
Ece1	Endothelin converting enzyme 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatischen Retikulum
EtOH	Ethanol
FAD	familiäre Alzheimer-Erkrankung
FKS	Fötale Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Glial Fibrillary Acidic
h	Hour/ Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HE	Hämalaun- Eosin
HRP	Horseradish peroxidase
Iba1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
i.c.	intracerebral
Ide	Insulin degrading enzyme
IL	Interleukin
L	Liter
LPP	Probenpuffer
LPS	Lipopolysaccharid
Lrp1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
mAK	monoklonaler Antikörper
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
mg	Milligramm
min	Minute
MIP-1	chemokine macrophage inflammatory protein-1
n	Anzahl
µg	Mikrogramm
mm ²	Quadratmillimeter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mme	Membrane metallo endopeptidase,Neprilysin
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
p	Signifikanzwert (engl."p-value")

PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Paraffin-embedded tissue
PFA	Paraformaldehyd
PrP ^c	Zelluläre Prionprotein
PrP ^{Sc}	Fehlgefaltete Prionprotein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAGE	Advanced glycosylation end product-specific receptor (Ager), transcript variant 1 --> RAGE
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion
Saa3	Serum amyloid A 3
SAD	sporadische Alzheimer-Erkrankung
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec	Sekunde
TBI	Schädelhirntrauma (engl. „traumatic brain injury“)
TBS	Tris-buffered Saline
TBST	Tris-buffered Saline + Tween
TF	Transkriptionsfaktor
TMS	Transmissible Mink Encephalopathy
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TGF- β 1	Transforming growth factor- β 1
Tnfaip6	Tumor necrosis factor alpha induced protein 6
TSE	Transmissible spongiforme Enzephalopathie
U	Units
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
usw.	und so weiter
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Darstellung der Prozessierung und posttranslationalen Modifikation des humanen Prionoproteins PrP ^C im endoplasmatischen Retikulum (ER)	11
Abbildung 2 Dargestellung der proteolytische Prozessierung des Amyloid Precursor Protein (APP)	14
Abbildung 3 Darstellung der Struktur des CEBP-DNA Komplexes	21
Abbildung 4 Modifizierter Regelkreis der LPS-Antwort.....	22
Abbildung 5 Bewertungsskala für den Nestbau.....	36
Abbildung 6 Beispiel für eine HE-Übersichtsfärbung.....	38
Abbildung 7 Darstellung der Durchführung der einzelnen Extraktionsschritte bei der Extraktion des A β -Proteins	43
Abbildung 8 Darstellung der durchgeführten Transfektion	53
Abbildung 9 Experimenteller Versuchsaufbau des untersuchten AD-Modells	55
Abbildung 10 Untersuchungen bezüglich der Gewichtsunterschiede im AD-Modell.....	56
Abbildung 11 Untersuchungen bezüglich der Nestbauaktivität im AD-Modell.....	57
Abbildung 12 (I)HC-Färbungen von A β - und Amyloid-Plaques im Cortex des AD-Modells..	59
Abbildung 13 (I)HC-Färbungen von A β - und Amyloid-Plaques im Hippocampus des AD-Modells.....	59
Abbildung 14 Auszählung der Plaques im Bereich des sekundären motorischen Cortex (M2-Cortex) und Hippocampus	60
Abbildung 15 Messungen der A β -bzw. Amyloid-Plaques bedeckten Flächen im Bereich des M2-Cortex und Hippocampus.	61
Abbildung 16 Western Blot zur Bestimmung der Menge an A β in der PBS- und der Ameisensäure-Fraktion.	62
Abbildung 17 Densitometrische Auswertung der im Western Blot ermittelten Gesamtmenge an A β in PBS- und Ameisensäure-Fraktion.	63
Abbildung 18 Western Blot zur Ermittlung des APP-Gehaltes im Hirnhomogenat von APP/PS1- bzw. APP/PS1 x C/EBPD ^(-/-) -Tieren..	64
Abbildung 19 Real-Time PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression von <i>Mme</i> , <i>ApoE</i> , <i>Lrp1</i> , <i>CtsB</i> , <i>Ece1</i> , <i>Ace1</i> , <i>Ide</i> und <i>Ager</i> im AD-Modell.....	64
Abbildung 20 IHC Nachweis von aktivierten Astrozyten im AD-Modell.....	66
Abbildung 21 Quantitative Auswertung der von aktivierten Astrozyten bedeckten Flächen im AD-Modell.	66
Abbildung 22 Quantitative Real-Time PCR zur Untersuchung der <i>Gfap</i> -Expression im AD-Modell.	67
Abbildung 23 GFAP-Nachweis im Western Blot und densitometrische Quantifikation der im WB dargestellten Astrozyten-Aktivierung im AD-Modell.....	68

Abbildung 24 IHC Nachweis von aktivierten Mikroglia im AD-Modell	69
Abbildung 25 Quantitative Auswertung der von aktivierten Mikroglia bedeckten Flächen im AD-Modell.	70
Abbildung 26 Quantitative Real-Time PCR zur Untersuchung der <i>Iba-1</i> -Expression im AD-Modell.	70
Abbildung 27 <i>Iba-1</i> -Nachweis im Western Blot und densitometrische Quantifikation der im WB dargestellten Mikroglia-Aktivierung im AD-Modell	71
Abbildung 28 Real-Time PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression von <i>C3</i> , <i>Saa3</i> , <i>Cxcl9</i> , <i>Cp</i> , <i>Ccl3</i> , <i>Cxcl2</i> , <i>Tnfaip6</i> und <i>Il-6</i> im AD-Modell	72
Abbildung 29 Experimenteller Versuchsaufbau des untersuchten Prion-Modells	73
Abbildung 30 Bestimmung der Überlebenszeit von C/EBPD ^(-/-) -Mäusen verglichen mit WT-Kontrollen nach Scrapieinfektion.	74
Abbildung 31 Western Blot zur Bestimmung der PrP ^{Sc} -Ablagerungen im Gehirn von Scrapie-infizierten WT und C/EBPD ^(-/-) -Mäusen.	75
Abbildung 32 Paraffin-embedded tissue (PET) Blot zur Bestimmung des PrP ^{Sc} von Scrapie-infizierten WT- und C/EBPD ^(-/-) -Mäusen.....	76
Abbildung 33 IHC Nachweis von aktivierten Astrozyten im Prion-Modell.	78
Abbildung 34 Quantitative Auswertung der von aktivierten Astrozyten bedeckten Flächen im Prion-Modell	78
Abbildung 35 Quantitative Real-Time PCR zur Untersuchung der <i>Gfap</i> -Expression im Prion-Modell	79
Abbildung 36 GFAP-Nachweis im Western Blot und densitometrische Quantifikation der im WB dargestellten Astrozyten-Aktivierung im Prion-Modell	80
Abbildung 37 IHC Nachweis von aktivierten Mikroglia im Prion-Modell.....	81
Abbildung 38 Quantitative Auswertung der von aktivierten Mikroglia bedeckten Flächen im Prion-Modell.....	82
Abbildung 39 Quantitative Real-Time PCR zur Untersuchung der <i>Iba-1</i> -Expression im Prion-Modell	82
Abbildung 40 Real-Time PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression von <i>C3</i> , <i>Saa3</i> , <i>Cxcl9</i> , <i>Cp</i> , <i>Ccl3</i> , <i>Cxcl2</i> , <i>Tnfaip6</i> und <i>Il-6</i> im Prion-Modell.....	83
Abbildung 41 Real-Time PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression von <i>C3</i> , <i>Saa3</i> , <i>Cxcl9</i> , <i>Cp</i> , <i>Ccl3</i> , <i>Cxcl2</i> , <i>Tnfaip6</i> und <i>Il-6</i> in primären Mixed-Gliazellen.	84
Abbildung 42 Western Blot zum Nachweis der C3- und C3b Proteinmenge und densitometrische Quantifikationen der im WB dargestellten Proteinmenge	85
Abbildung 43 Real-Time PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression von <i>C3</i> , <i>CXCL9</i> , <i>CP</i> , <i>CCL3</i> , <i>CXCL2</i> , <i>TNFAIP6</i> und <i>IL-6</i> in U-373 MG Zellen 48 Stunden nach Transfektion mit einem C/EBPD-Expressionsvektor..	86

6.3. Literaturverzeichnis

- Abramov AY, Canevari L, Duchen MR. 2003. Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity. *J Neurosci* 23:5088-5095.
- Agrawal S, Hofmann WK, Tidow N, Ehrich M, van den Boom D, Koschmieder S, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C. 2007. The C/EBPdelta tumor suppressor is silenced by hypermethylation in acute myeloid leukemia. *Blood* 109:3895-3905.
- Aguzzi A. 2006. Prion diseases of humans and farm animals: epidemiology, genetics, and pathogenesis. *J Neurochem* 97:1726-1739.
- Aguzzi A, Nuvolone M, Zhu C. 2013. The immunobiology of prion diseases. *Nat Rev Immunol* 13:888-902.
- Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T. 1990. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J* 9:1897-1906.
- Akiyama H, Arai T, Kondo H, Tanno E, Haga C, Ikeda K. 2000. Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 14 Suppl 1:S47-53.(a)
- 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. 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21:383-421.(b)
- Allaman I, Belanger M, Magistretti PJ. 2011. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci* 34:76-87.
- Arguello AA, Ye X, Bozdagi O, Pollonini G, Tronel S, Bambah-Mukku D, Huntley GW, Platano D, Alberini CM. 2013. CCAAT enhancer binding protein delta plays an essential role in memory consolidation and reconsolidation. *J Neurosci* 33:3646-3658.
- Baier M, Norley S, Schultz J, Burwinkel M, Schwarz A, Riemer C. 2003. Prion diseases: infectious and lethal doses following oral challenge. *J Gen Virol* 84:1927-1929.
- Balamurugan K, Sharan S, Klarmann KD, Zhang Y, Coppola V, Summers GH, Roger T, Morrison DK, Keller JR, Sterneck E. 2013. FBXW7alpha attenuates inflammatory signalling by downregulating C/EBPdelta and its target gene Tlr4. *Nat Commun* 4:1662.
- Balamurugan K, Sterneck E. 2013. The many faces of C/EBPdelta and their relevance for inflammation and cancer. *Int J Biol Sci* 9:917-933.
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C. 1986. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46:417-428.
- Bayer TA. 2013. Proteinopathies, a core concept for understanding and ultimately treating degenerative disorders? *Eur Neuropsychopharmacol*.
- Beckett C, Nalivaeva NN, Belyaev ND, Turner AJ. 2012. Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma. *Cell Signal* 24:402-409.
- Beekes M, McBride PA. 2007. The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS J* 274:588-605.

- Bellinger-Kawahara C, Cleaver JE, Diener TO, Prusiner SB. 1987. Purified scrapie prions resist inactivation by UV irradiation. *J Virol* 61:159-166.(a)
- Bellinger-Kawahara C, Diener TO, McKinley MP, Groth DF, Smith DR, Prusiner SB. 1987. Purified scrapie prions resist inactivation by procedures that hydrolyze, modify, or shear nucleic acids. *Virology* 160:271-274.(b)
- Bolmont T, Haiss F, Eicke D, Radde R, Mathis CA, Klunk WE, Kohsaka S, Jucker M, Calhoun ME. 2008. Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J Neurosci* 28:4283-4292.
- Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG, Sisodia SS. 1996. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17:1005-1013.
- Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-259.
- Bruder C, Hagleitner M, Darlington G, Mohsenipour I, Wurzner R, Hollmuller I, Stoiber H, Lass-Flörl C, Dierich MP, Speth C. 2004. HIV-1 induces complement factor C3 synthesis in astrocytes and neurons by modulation of promoter activity. *Mol Immunol* 40:949-961.
- Burwinkel M, Schwarz A, Riemer C, Schultz J, van Landeghem F, Baier M. 2004. Rapid disease development in scrapie-infected mice deficient for CD40 ligand. *EMBO Rep* 5:527-531.
- Bush AI, Martins RN, Rumble B, Moir R, Fuller S, Milward E, Currie J, Ames D, Weidemann A, Fischer P, et al. 1990. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is released by human platelets. *J Biol Chem* 265:15977-15983.
- Cameron B, Landreth GE. 2010. Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 37:503-509.
- Cao Z, Umek RM, McKnight SL. 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5:1538-1552.
- Cardinaux JR, Allaman I, Magistretti PJ. 2000. Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBP β and C/EBP δ in astrocytes. *Glia* 29:91-97.
- Cardinaux JR, Magistretti PJ. 1996. Vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, and noradrenaline induce the transcription factors CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)- β and C/EBP δ in mouse cortical astrocytes: involvement in cAMP-regulated glycogen metabolism. *J Neurosci* 16:919-929.
- Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascsak RJ, Bolton DC, Bendheim PE. 1990. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* 61:185-192.
- Cesena TI, Cardinaux JR, Kwok R, Schwartz J. 2007. CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) β is acetylated at multiple lysines: acetylation of C/EBP β at lysine 39 modulates its ability to activate transcription. *J Biol Chem* 282:956-967.
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. 2007. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev* 53:344-354.
- Chang LH, Huang HS, Wu PT, Jou IM, Pan MH, Chang WC, Wang DD, Wang JM. 2012. Role of macrophage CCAAT/enhancer binding protein δ in the pathogenesis of rheumatoid arthritis in collagen-induced arthritic mice. *PLoS One* 7:e45378.

- Chao CC, Hu S, Sheng WS, Bu D, Bukrinsky MI, Peterson PK. 1996. Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. *Glia* 16:276-284.
- Chauhan NB, Siegel GJ, Lichtor T. 2004. Effect of age on the duration and extent of amyloid plaque reduction and microglial activation after injection of anti-Abeta antibody into the third ventricle of TgCRND8 mice. *J Neurosci Res* 78:732-741.
- Chen X, Quinn EM, Ni H, Wang J, Blankson S, Redmond HP, Wang JH, Feng X. 2012. B7-H3 participates in the development of experimental pneumococcal meningitis by augmentation of the inflammatory response via a TLR2-dependent mechanism. *J Immunol* 189:347-355.
- Christen Y. 2002. [Proteins and mutations: a new vision (molecular) of neurodegenerative diseases]. *J Soc Biol* 196:85-94.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ. 1992. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672-674.
- de Haas AH, Boddeke HW, Biber K. 2008. Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia* 56:888-894.
- de Heredia LL, Magoulas C. 2013. Lack of the transcription factor C/EBPdelta impairs the intrinsic capacity of peripheral neurons for regeneration. *Exp Neurol* 239:148-157.
- Deacon RM. 2006. Assessing nest building in mice. *Nat Protoc* 1:1117-1119.
- Deacon RM, Cholerton LL, Talbot K, Nair-Roberts RG, Sanderson DJ, Romberg C, Koros E, Bornemann KD, Rawlins JN. 2008. Age-dependent and -independent behavioral deficits in Tg2576 mice. *Behav Brain Res* 189:126-138.
- Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic BV. 2009. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8:16-30.
- Deane R, Du Yan S, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B. 2003. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* 9:907-913.
- Deane R, Singh I, Sagare AP, Bell RD, Ross NT, LaRue B, Love R, Perry S, Paquette N, Deane RJ, Thiyagarajan M, Zarcone T, Fritz G, Friedman AE, Miller BL, Zlokovic BV. 2012. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid beta-mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 122:1377-1392.
- DeArmond SJ, Sanchez H, Yehiely F, Qiu Y, Ninchak-Casey A, Daggett V, Camerino AP, Cayetano J, Rogers M, Groth D, Torchia M, Tremblay P, Scott MR, Cohen FE, Prusiner SB. 1997. Selective neuronal targeting in prion disease. *Neuron* 19:1337-1348.
- Degos C, Gagnaire A, Banchereau R, Moriyon I, Gorvel JP. 2015. Brucella CbetaG induces a dual pro- and anti-inflammatory response leading to a transient neutrophil recruitment. *Virulence* 6:19-28.
- Dickinson AG. 1976. Scrapie in sheep and goats. *Front Biol* 44:209-241.
- Dickson DW. 1997. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:321-339.
- Do-Umehara HC, Chen C, Urich D, Zhou L, Qiu J, Jang S, Zander A, Baker MA, Eilers M, Sporn PH, Ridge KM, Sznajder JI, Budinger GR, Mutlu GM, Lin A,

- Liu J. 2013. Suppression of inflammation and acute lung injury by Miz1 via repression of C/EBP-delta. *Nat Immunol* 14:461-469.
- Dulin F, Leveille F, Ortega JB, Mornon JP, Buisson A, Callebaut I, Colloc'h N. 2008. P3 peptide, a truncated form of A beta devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. *FEBS Lett* 582:1865-1870.
- Eikelenboom P, Bate C, Van Gool WA, Hoozemans JJ, Rozemuller JM, Veerhuis R, Williams A. 2002. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. *Glia* 40:232-239.
- Eikelenboom P, Veerhuis R. 1996. The role of complement and activated microglia in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 17:673-680.
- Eisele YS, Bolmont T, Heikenwalder M, Langer F, Jacobson LH, Yan ZX, Roth K, Aguzzi A, Staufenbiel M, Walker LC, Jucker M. 2009. Induction of cerebral beta-amyloidosis: intracerebral versus systemic Abeta inoculation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12926-12931.
- Ejarque-Ortiz A, Medina MG, Tusell JM, Perez-Gonzalez AP, Serratos J, Saura J. 2007. Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia. *Glia* 55:178-188.
- Endo T, Groth D, Prusiner SB, Kobata A. 1989. Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 28:8380-8388.
- Evin G, Weidemann A. 2002. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides* 23:1285-1297.
- Filali M, Lalonde R. 2009. Age-related cognitive decline and nesting behavior in an APPsw/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1292:93-99.
- Floden AM, Combs CK. 2007. Microglia repetitively isolated from in vitro mixed glial cultures retain their initial phenotype. *J Neurosci Methods* 164:218-224.
- Fratiglioni L, Launer LJ, Andersen K, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, Lobo A, Martinez-Lage J, Soininen H, Hofman A. 2000. Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54:S10-15.
- Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saido TC, Hsiao K, Cole GM. 1998. Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol* 152:307-317.
- Fu H, Liu B, Frost JL, Hong S, Jin M, Ostaszewski B, Shankar GM, Costantino IM, Carroll MC, Mayadas TN, Lemere CA. 2012. Complement component C3 and complement receptor type 3 contribute to the phagocytosis and clearance of fibrillar Abeta by microglia. *Glia* 60:993-1003.
- Garwood CJ, Pooler AM, Atherton J, Hanger DP, Noble W. 2011. Astrocytes are important mediators of Abeta-induced neurotoxicity and tau phosphorylation in primary culture. *Cell Death Dis* 2:e167.
- Golde TE, Borchelt DR, Giasson BI, Lewis J. 2013. Thinking laterally about neurodegenerative proteinopathies. *J Clin Invest* 123:1847-1855.
- Golde TE, Cai XD, Shoji M, Younkin SG. 1993. Production of amyloid beta protein from normal amyloid beta-protein precursor (beta APP) and the mutated beta APPS linked to familial Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 695:103-108.
- Golde TE, Estus S, Usiak M, Younkin LH, Younkin SG. 1990. Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron* 4:253-267.
- Gomez-Nicola D, Franssen NL, Suzzi S, Perry VH. 2013. Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration. *J Neurosci* 33:2481-2493.

- Gralle M, Botelho MG, Wouters FS. 2009. Neuroprotective secreted amyloid precursor protein acts by disrupting amyloid precursor protein dimers. *J Biol Chem* 284:15016-15025.
- Gralle M, Ferreira ST. 2007. Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog Neurobiol* 82:11-32.
- Groschup MHG, Anja / Kuczius, Thomas. 2006. Prions in Humans and Animals/ Prion Strains.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. 1986. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261:6084-6089.
- Hampel H, Frank R, Broich K, Teipel SJ, Katz RG, Hardy J, Herholz K, Bokde AL, Jessen F, Hoessler YC, Sanhai WR, Zetterberg H, Woodcock J, Blennow K. 2010. Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 9:560-574.
- Hanisch UK, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-1394.
- Hardy J, Selkoe DJ. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Hardy JA, Higgins GA. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-185.
- Harris DA, Huber MT, van Dijken P, Shyng SL, Chait BT, Wang R. 1993. Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry* 32:1009-1016.
- Hartlage-Rubsamen M, Zeitschel U, Apelt J, Gartner U, Franke H, Stahl T, Gunther A, Schliebs R, Penkowa M, Bigl V, Rossner S. 2003. Astrocytic expression of the Alzheimer's disease beta-secretase (BACE1) is stimulus-dependent. *Glia* 41:169-179.
- Hasebe R, Raymond GJ, Horiuchi M, Caughey B. 2012. Reaction of complement factors varies with prion strains in vitro and in vivo. *Virology* 423:205-213.
- Hay B, Barry RA, Lieberburg I, Prusiner SB, Lingappa VR. 1987. Biogenesis and transmembrane orientation of the cellular isoform of the scrapie prion protein [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1987 May;7(5):2035]. *Mol Cell Biol* 7:914-920.
- Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, Griep A, Axt D, Remus A, Tzeng TC, Gelpi E, Halle A, Korte M, Latz E, Golenbock DT. 2013. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 493:674-678.
- Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 16:358-372.
- Hernandez-Encinas E, Aguilar-Morante D, Cortes-Canteli M, Morales-Garcia JA, Gine E, Santos A, Perez-Castillo A. 2015. CCAAT/enhancer binding protein beta directly regulates the expression of the complement component 3 gene in neural cells: implications for the pro-inflammatory effects of this transcription factor. *J Neuroinflammation* 12:14.
- Hickman SE, Allison EK, El Khoury J. 2008. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 28:8354-8360.
- Hope J, Morton LJ, Farquhar CF, Multhaup G, Beyreuther K, Kimberlin RH. 1986. The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). *EMBO J* 5:2591-2597.

- Hörnlimann BR, Detlev / Kretschmar, Hans A. 2006. Prions in Humans and Animals.714.
- Huang WC, Yen FC, Shie FS, Pan CM, Shiao YJ, Yang CN, Huang FL, Sung YJ, Tsay HJ. 2010. TGF-beta1 blockade of microglial chemotaxis toward Abeta aggregates involves SMAD signaling and down-regulation of CCL5. *J Neuroinflammation* 7:28.
- Hunter S, Arendt T, Brayne C. 2013. The Senescence Hypothesis of Disease Progression in Alzheimer Disease: an Integrated Matrix of Disease Pathways for FAD and SAD. *Mol Neurobiol* 48:556-570.
- Huzarewich RL, Siemens CG, Booth SA. 2010. Application of "omics" to prion biomarker discovery. *J Biomed Biotechnol* 2010:613504.
- Jaeger LB, Dohgu S, Hwang MC, Farr SA, Murphy MP, Fleegal-DeMotta MA, Lynch JL, Robinson SM, Niehoff ML, Johnson SN, Kumar VB, Banks WA. 2009. Testing the neurovascular hypothesis of Alzheimer's disease: LRP-1 antisense reduces blood-brain barrier clearance, increases brain levels of amyloid-beta protein, and impairs cognition. *J Alzheimers Dis* 17:553-570.
- Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, Younkin SG, Borchelt DR. 2004. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet* 13:159-170.
- Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, Jenkins NA, Copeland NG, Borchelt DR. 2001. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng* 17:157-165.
- Jellinger KAJ. 2005. Neurodegenerative Erkrankungen (ZNS) – Eine aktuelle Übersicht. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie*
- Jin JK, Na YJ, Song JH, Joo HG, Kim S, Kim JI, Choi EK, Carp RI, Kim YS, Shin T. 2007. Galectin-3 expression is correlated with abnormal prion protein accumulation in murine scrapie. *Neurosci Lett* 420:138-143.
- Johnstone M, Gearing AJ, Miller KM. 1999. A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol* 93:182-193.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733-736.
- Kim J, Cantwell CA, Johnson PF, Pfarr CM, Williams SC. 2002. Transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding proteins is controlled by a conserved inhibitory domain that is a target for sumoylation. *J Biol Chem* 277:38037-38044.
- Kim SJ, Ahn JW, Kim H, Ha HJ, Lee SW, Kim HK, Lee S, Hong HS, Kim YH, Choi CY. 2013. Two beta-strands of RAGE participate in the recognition and transport of amyloid-beta peptide across the blood brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 439:252-257.
- Klein MA, Kaeser PS, Schwarz P, Weyd H, Xenarios I, Zinkernagel RM, Carroll MC, Verbeek JS, Botto M, Walport MJ, Molina H, Kalinke U, Acha-Orbea H, Aguzzi A. 2001. Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat Med* 7:488-492.
- Kluve-Beckerman B, Drumm ML, Benson MD. 1991. Nonexpression of the human serum amyloid A three (SAA3) gene. *DNA Cell Biol* 10:651-661.
- Ko CY, Chang LH, Lee YC, Sterneck E, Cheng CP, Chen SH, Huang AM, Tseng JT, Wang JM. 2012. CCAAT/enhancer binding protein delta (CEBPD) elevating

- PTX3 expression inhibits macrophage-mediated phagocytosis of dying neuron cells. *Neurobiol Aging* 33:422 e411-425.
- Ko CY, Chu YY, Narumiya S, Chi JY, Furuyashiki T, Aoki T, Wang SM, Chang WC, Wang JM. 2015. The CCAAT/enhancer-binding protein delta/miR135a/thrombospondin 1 axis mediates PGE2-induced angiogenesis in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 36:1356-1368.
- Ko CY, Hsu HC, Shen MR, Chang WC, Wang JM. 2008. Epigenetic silencing of CCAAT/enhancer-binding protein delta activity by YY1/polycomb group/DNA methyltransferase complex. *J Biol Chem* 283:30919-30932.
- Ko CY, Wang WL, Wang SM, Chu YY, Chang WC, Wang JM. 2014. Glycogen synthase kinase-3beta-mediated CCAAT/enhancer-binding protein delta phosphorylation in astrocytes promotes migration and activation of microglia/macrophages. *Neurobiol Aging* 35:24-34.
- Koenigsknecht-Talboo J, Landreth GE. 2005. Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 25:8240-8249.
- Koistinaho M, Lin S, Wu X, Esterman M, Koger D, Hanson J, Higgs R, Liu F, Malkani S, Bales KR, Paul SM. 2004. Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med* 10:719-726.
- Kopec KK, Carroll RT. 1998. Alzheimer's beta-amyloid peptide 1-42 induces a phagocytic response in murine microglia. *J Neurochem* 71:2123-2131.
- Kretschmar HA, Tings T, Madlung A, Giese A, Herms J. 2000. Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse. *Arch Virol Suppl*:239-249.
- Kuchibhotla KV, Lattarulo CR, Hyman BT, Bacskai BJ. 2009. Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science* 323:1211-1215.
- Kurt MA, Davies DC, Kidd M. 1999. beta-Amyloid immunoreactivity in astrocytes in Alzheimer's disease brain biopsies: an electron microscope study. *Exp Neurol* 158:221-228.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Langer F, Eisele YS, Fritschi SK, Staufenbiel M, Walker LC, Jucker M. 2011. Soluble Abeta seeds are potent inducers of cerebral beta-amyloid deposition. *J Neurosci* 31:14488-14495.
- Larson ME, Lesne SE. 2012. Soluble Abeta oligomer production and toxicity. *J Neurochem* 120 Suppl 1:125-139.
- Lee CY, Landreth GE. 2010. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm* 117:949-960.
- Lee YJ, Han SB, Nam SY, Oh KW, Hong JT. 2010. Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res* 33:1539-1556.
- Li QX, Berndt MC, Bush AI, Rumble B, Mackenzie I, Friedhuber A, Beyreuther K, Masters CL. 1994. Membrane-associated forms of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease in human platelet and brain: surface expression on the activated human platelet. *Blood* 84:133-142.
- Li QX, Fuller SJ, Beyreuther K, Masters CL. 1999. The amyloid precursor protein of Alzheimer disease in human brain and blood. *J Leukoc Biol* 66:567-574.
- Li R, Strohmeyer R, Liang Z, Lue LF, Rogers J. 2004. CCAAT/enhancer binding protein delta (C/EBPdelta) expression and elevation in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25:991-999.

- Lian H, Yang L, Cole A, Sun L, Chiang AC, Fowler SW, Shim DJ, Rodriguez-Rivera J, Tagliavola G, Jankowsky JL, Lu HC, Zheng H. 2015. NF κ B-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. *Neuron* 85:101-115.
- Litvak V, Ramsey SA, Rust AG, Zak DE, Kennedy KA, Lampano AE, Nykter M, Shmulevich I, Aderem A. 2009. Function of C/EBP δ in a regulatory circuit that discriminates between transient and persistent TLR4-induced signals. *Nat Immunol* 10:437-443.
- Liu W, Tang Y, Feng J. 2011. Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci* 89:141-146.
- Liu YW, Chen CC, Wang JM, Chang WC, Huang YC, Chung SY, Chen BK, Hung JJ. 2007. Role of transcriptional factors Sp1, c-Rel, and c-Jun in LPS-induced C/EBP δ gene expression of mouse macrophages. *Cell Mol Life Sci* 64:3282-3294.
- Löwer JK, Thomas R. 2006. Prions in Humans and Animals/ Risk Assessment of Transmitting Prion Diseases through Blood, Cornea, and Dura Mater.
- Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J. 1999. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155:853-862.
- Lv Y, Chen C, Zhang BY, Xiao K, Wang J, Chen LN, Sun J, Gao C, Shi Q, Dong XP. 2014. Remarkable Activation of the Complement System and Aberrant Neuronal Localization of the Membrane Attack Complex in the Brain Tissues of Scrapie-Infected Rodents. *Mol Neurobiol*.
- Mabbott NA, Bruce ME, Botto M, Walport MJ, Pepys MB. 2001. Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nat Med* 7:485-487.
- Maier M, Peng Y, Jiang L, Seabrook TJ, Carroll MC, Lemere CA. 2008. Complement C3 deficiency leads to accelerated amyloid beta plaque deposition and neurodegeneration and modulation of the microglia/macrophage phenotype in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 28:6333-6341.
- Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J. 1992. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* 115:117-122.
- Maranto J, Rappaport J, Datta PK. 2011. Role of C/EBP β , p38 MAPK, and MKK6 in IL-1 β -mediated C3 gene regulation in astrocytes. *J Cell Biochem* 112:1168-1175.
- Marella M, Chabry J. 2004. Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. *J Neurosci* 24:620-627.
- McGeer PL, McGeer EG. 1995. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 21:195-218.
- McHattie SJ, Brown DR, Bird MM. 1999. Cellular uptake of the prion protein fragment PrP106-126 in vitro. *J Neurocytol* 28:149-159.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL. 1999. Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46:860-866.
- Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, Kaeser S, Schaefer C, Kilger E, Neuenschwander A, Abramowski D, Frey P, Jaton AL, Vigouret JM, Paganetti P, Walsh DM, Mathews PM, Ghiso J, Staufenbiel M, Walker LC, Jucker M. 2006. Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* 313:1781-1784.

- Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, Rozkalne A, Koenigsknecht-Talboo J, Holtzman DM, Bacskai BJ, Hyman BT. 2008. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451:720-724.
- Michel B, Ferguson A, Johnson T, Bender H, Meyerett-Reid C, Wyckoff AC, Pulford B, Telling GC, Zabel MD. 2013. Complement protein C3 exacerbates prion disease in a mouse model of chronic wasting disease. *Int Immunol* 25:697-702.
- Mobley WC, Neve RL, Prusiner SB, McKinley MP. 1988. Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9811-9815.
- Moore F, Santin I, Nogueira TC, Gurzov EN, Marselli L, Marchetti P, Eizirik DL. 2012. The transcription factor C/EBP delta has anti-apoptotic and anti-inflammatory roles in pancreatic beta cells. *PLoS One* 7:e31062.
- Morrison JP, Ton TV, Collins JB, Switzer RC, Little PB, Morgan DL, Sills RC. 2009. Gene expression studies reveal that DNA damage, vascular perturbation, and inflammation contribute to the pathogenesis of carbonyl sulfide neurotoxicity. *Toxicol Pathol* 37:502-511.
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. 1992. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1:345-347.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318.
- Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, et al. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40:735-746.
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al. 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10962-10966.
- Pan XD, Zhu YG, Lin N, Zhang J, Ye QY, Huang HP, Chen XC. 2011. Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid is attenuated by oligomeric beta-amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 6:45.
- Pan YC, Li CF, Ko CY, Pan MH, Chen PJ, Tseng JT, Wu WC, Chang WC, Huang AM, Sterneck E, Wang JM. 2010. CEBPD reverses RB/E2F1-mediated gene repression and participates in HMDB-induced apoptosis of cancer cells. *Clin Cancer Res* 16:5770-5780.
- Pardossi-Piquard R, Checler F. 2012. The physiology of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J Neurochem* 120 Suppl 1:109-124.
- Pawar SA, Sarkar TR, Balamurugan K, Sharan S, Wang J, Zhang Y, Dowdy SF, Huang AM, Sterneck E. 2010. C/EBP{delta} targets cyclin D1 for proteasome-mediated degradation via induction of CDC27/APC3 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:9210-9215.
- Paxinos G. and Franklin K.B.J. 2002. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*.
- Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. 2010. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6:193-201.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Pike CJ, Overman MJ, Cotman CW. 1995. Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro. *J Biol Chem* 270:23895-23898.

- Prokop S, Miller KR, Heppner FL. 2013. Microglia actions in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 126:461-477.
- Prusiner SB. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144.
- Prusiner SB. 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science* 252:1515-1522.
- Prusiner SB. 1998. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13363-13383.
- Raeber AJ, Borchelt DR, Scott M, Prusiner SB. 1992. Attempts to convert the cellular prion protein into the scrapie isoform in cell-free systems. *J Virol* 66:6155-6163.
- Ramberg V, Tracy LM, Samuelsson M, Nilsson LN, Iverfeldt K. 2011. The CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) delta is differently regulated by fibrillar and oligomeric forms of the Alzheimer amyloid-beta peptide. *J Neuroinflammation* 8:34.
- Ramji DP, Foka P. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365:561-575.
- Ransohoff RM, Perry VH. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119-145.
- Ray A, Ray BK. 1994. Serum amyloid A gene expression under acute-phase conditions involves participation of inducible C/EBP-beta and C/EBP-delta and their activation by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 14:4324-4332.
- Rezaie P, Trillo-Pazos G, Greenwood J, Everall IP, Male DK. 2002. Motility and ramification of human fetal microglia in culture: an investigation using time-lapse video microscopy and image analysis. *Exp Cell Res* 274:68-82.
- Riemer C, Gultner S, Heise I, Holtkamp N, Baier M. 2009. Neuroinflammation in prion diseases: concepts and targets for therapeutic intervention. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8:329-341.
- Riemer C, Neidhold S, Burwinkel M, Schwarz A, Schultz J, Kratzschmar J, Monning U, Baier M. 2004. Gene expression profiling of scrapie-infected brain tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 323:556-564.
- Riemer C, Schultz J, Burwinkel M, Schwarz A, Mok SW, Gultner S, Bamme T, Norley S, van Landeghem F, Lu B, Gerard C, Baier M. 2008. Accelerated prion replication in, but prolonged survival times of, prion-infected CXCR3^{-/-} mice. *J Virol* 82:12464-12471.
- Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Wolkow C, Wang R, Cotter RJ, Reardon IM, Zurcher-Neely HA, Heinrichson RL, Ball MJ, et al. 1993. Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 268:3072-3083.
- Roman C, Platero JS, Shuman J, Calame K. 1990. Ig/EBP-1: a ubiquitously expressed immunoglobulin enhancer binding protein that is similar to C/EBP and heterodimerizes with C/EBP. *Genes Dev* 4:1404-1415.
- Ron D, Habener JF. 1992. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev* 6:439-453.
- Ronald F, Pfeiffer ZKW, Manuchair Ebadi. 2004. Parkinson's Disease. CRC Press:1080.
- Rosenstiel P, Lucius R, Deuschl G, Sievers J, Wilms H. 2001. From theory to therapy: implications from an in vitro model of ramified microglia. *Microsc Res Tech* 54:18-25.
- Rossner S, Apelt J, Schliebs R, Perez-Polo JR, Bigl V. 2001. Neuronal and glial beta-secretase (BACE) protein expression in transgenic Tg2576 mice with amyloid plaque pathology. *J Neurosci Res* 64:437-446.

- Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. 2012. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal* 2012:756357.
- Samuelsson M, Ramberg V, Iverfeldt K. 2008. Alzheimer amyloid-beta peptides block the activation of C/EBPbeta and C/EBPdelta in glial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 370:619-622.
- Sandhir R, Berman NE. 2010. Age-dependent response of CCAAT/enhancer binding proteins following traumatic brain injury in mice. *Neurochem Int* 56:188-193.
- Sarkar TR, Sharan S, Wang J, Pawar SA, Cantwell CA, Johnson PF, Morrison DK, Wang JM, Sterneck E. 2012. Identification of a Src tyrosine kinase/SIAH2 E3 ubiquitin ligase pathway that regulates C/EBPdelta expression and contributes to transformation of breast tumor cells. *Mol Cell Biol* 32:320-332.
- Saverioni D, Notari S, Capellari S, Poggiolini I, Giese A, Kretzschmar HA, Parchi P. 2013. Analyses of protease resistance and aggregation state of abnormal prion protein across the spectrum of human prions. *J Biol Chem* 288:27972-27985.
- Schagger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379.
- Schliebs R. 2005. Basal forebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease--interrelationship with beta-amyloid, inflammation and neurotrophin signaling. *Neurochem Res* 30:895-908.
- Schultz J, Schwarz A, Neidhold S, Burwinkel M, Riemer C, Simon D, Kopf M, Otto M, Baier M. 2004. Role of interleukin-1 in prion disease-associated astrocyte activation. *Am J Pathol* 165:671-678.
- Schulz-Schaeffer WJ, Tschoke S, Kranefuss N, Drose W, Hause-Reitner D, Giese A, Groschup MH, Kretzschmar HA. 2000. The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases. *Am J Pathol* 156:51-56.
- Sedo A, Malik R, Drbal K, Lisa V, Vlasicova K, Mares V. 2001. Dipeptidyl peptidase IV in two human glioma cell lines. *Eur J Histochem* 45:57-63.
- Selkoe DJ. 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6:487-498.
- Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee G, Fritz LC, Oltersdorf T. 1988. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7341-7345.
- Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S. 2006. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 49:489-502.
- Sivko GS, Sanford DC, Dearth LD, Tang D, DeWille JW. 2004. CCAAT/Enhancer binding protein delta (c/EBPdelta) regulation and expression in human mammary epithelial cells: II. Analysis of activating signal transduction pathways, transcriptional, post-transcriptional, and post-translational control. *J Cell Biochem* 93:844-856.
- Smits HA, Rijmsmus A, van Loon JH, Wat JW, Verhoef J, Boven LA, Nottet HS. 2002. Amyloid-beta-induced chemokine production in primary human macrophages and astrocytes. *J Neuroimmunol* 127:160-168.
- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7-35.

- Sorensen G, Medina S, Parchaliuk D, Phillipson C, Robertson C, Booth SA. 2008. Comprehensive transcriptional profiling of prion infection in mouse models reveals networks of responsive genes. *BMC Genomics* 9:114.
- Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner SB. 1993. Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 32:1991-2002.
- Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. 1987. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51:229-240.
- Stein B, Cogswell PC, Baldwin AS, Jr. 1993. Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Mol Cell Biol* 13:3964-3974.
- Sterneck E, Paylor R, Jackson-Lewis V, Libbey M, Przedborski S, Tessarollo L, Crawley JN, Johnson PF. 1998. Selectively enhanced contextual fear conditioning in mice lacking the transcriptional regulator CCAAT/enhancer binding protein delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10908-10913.
- Stoltzner SE, Grenfell TJ, Mori C, Wisniewski KE, Wisniewski TM, Selkoe DJ, Lemere CA. 2000. Temporal accrual of complement proteins in amyloid plaques in Down's syndrome with Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 156:489-499.
- Streit WJ, Miller KR, Lopes KO, Njie E. 2008. Microglial degeneration in the aging brain--bad news for neurons? *Front Biosci* 13:3423-3438.
- Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, Sparks DL. 2004. Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia* 45:208-212.
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. 1999. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57:563-581.
- Sun Y, Jia L, Williams MT, Zamzow M, Ran H, Quinn B, Aronow BJ, Vorhees CV, Witte DP, Grabowski GA. 2008. Temporal gene expression profiling reveals CEBPD as a candidate regulator of brain disease in prosaposin deficient mice. *BMC Neurosci* 9:76.
- Svotelis A, Doyon G, Bernatchez G, Desilets A, Rivard N, Asselin C. 2005. IL-1 beta-dependent regulation of C/EBP delta transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 328:461-470.
- Tan J, Town T, Crawford F, Mori T, DelleDonne A, Crescentini R, Obregon D, Flavell RA, Mullan MJ. 2002. Role of CD40 ligand in amyloidosis in transgenic Alzheimer's mice. *Nat Neurosci* 5:1288-1293.
- Tan J, Town T, Paris D, Mori T, Suo Z, Crawford F, Mattson MP, Flavell RA, Mullan M. 1999. Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta-amyloid stimulation. *Science* 286:2352-2355.
- Thal DR. 2012. The role of astrocytes in amyloid beta-protein toxicity and clearance. *Exp Neurol* 236:1-5.
- Thangaraju M, Rudelius M, Bieri B, Raffeld M, Sharan S, Hennighausen L, Huang AM, Sterneck E. 2005. C/EBPdelta is a crucial regulator of pro-apoptotic gene expression during mammary gland involution. *Development* 132:4675-4685.
- Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC. 1996. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380:639-642.
- Town T, Nikolic V, Tan J. 2005. The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *J Neuroinflammation* 2:24.
- Tremblay ME, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A. 2011. The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 31:16064-16069.

- Tsukada J, Yoshida Y, Kominato Y, Auron PE. 2011. The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine* 54:6-19.
- Valente T, Straccia M, Gresa-Arribas N, Dentesano G, Tusell JM, Serratosa J, Mancera P, Sola C, Saura J. 2013. CCAAT/enhancer binding protein delta regulates glial proinflammatory gene expression. *Neurobiol Aging* 34:2110-2124.
- van Keulen LJ, Schreuder BE, Meloen RH, Poelen-van den Berg M, Mooij-Harkes G, Vromans ME, Langeveld JP. 1995. Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Vet Pathol* 32:299-308.
- Veerhuis R, Janssen I, De Groot CJ, Van Muiswinkel FL, Hack CE, Eikelenboom P. 1999. Cytokines associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain stimulate human glial and neuronal cell cultures to secrete early complement proteins, but not C1-inhibitor. *Exp Neurol* 160:289-299.
- Villalba M, Hott M, Martin C, Aguila B, Valdivia S, Quezada C, Zambrano A, Concha MI, Otth C. 2012. Herpes simplex virus type 1 induces simultaneous activation of Toll-like receptors 2 and 4 and expression of the endogenous ligand serum amyloid A in astrocytes. *Med Microbiol Immunol* 201:371-379.
- Vom Berg J, Prokop S, Miller KR, Obst J, Kalin RE, Lopategui-Cabezas I, Wegner A, Mair F, Schipke CG, Peters O, Winter Y, Becher B, Heppner FL. 2012. Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Nat Med* 18:1812-1819.
- Wang H, Larris B, Peiris TH, Zhang L, Le Lay J, Gao Y, Greenbaum LE. 2007. C/EBPbeta activates E2F-regulated genes in vivo via recruitment of the coactivator CREB-binding protein/P300. *J Biol Chem* 282:24679-24688.
- Wang J, Sarkar TR, Zhou M, Sharan S, Ritt DA, Veenstra TD, Morrison DK, Huang AM, Sterneck E. 2010. CCAAT/enhancer binding protein delta (C/EBPdelta, CEBPD)-mediated nuclear import of FANCD2 by IPO4 augments cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16131-16136.
- Wang SM, Lee YC, Ko CY, Lai MD, Lin DY, Pao PC, Chi JY, Hsiao YW, Liu TL, Wang JM. 2015. Increase of zinc finger protein 179 in response to CCAAT/enhancer binding protein delta conferring an antiapoptotic effect in astrocytes of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 51:370-382.
- Wedel A, Ziegler-Heitbrock HW. 1995. The C/EBP family of transcription factors. *Immunobiology* 193:171-185.
- Weidemann A, Konig G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K. 1989. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57:115-126.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:1858-1862.
- Weissmann C. 1994. Molecular biology of prion diseases. *Trends Cell Biol* 4:10-14.
- Wilcock DM, Gordon MN, Morgan D. 2006. Quantification of cerebral amyloid angiopathy and parenchymal amyloid plaques with Congo red histochemical stain. *Nat Protoc* 1:1591-1595.
- Williams SC, Angerer ND, Johnson PF. 1997. C/EBP proteins contain nuclear localization signals imbedded in their basic regions. *Gene Expr* 6:371-385.
- Wyss-Coray T. 2006. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med* 12:1005-1015.

- Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J. 2003. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 9:453-457.
- Wyss-Coray T, Rogers J. 2012. Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006346.
- Wyss-Coray T, Yan F, Lin AH, Lambris JD, Alexander JJ, Quigg RJ, Masliah E. 2002. Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10837-10842.
- Yamaguchi H, Sugihara S, Ogawa A, Saido TC, Ihara Y. 1998. Diffuse plaques associated with astroglial amyloid beta protein, possibly showing a disappearing stage of senile plaques. *Acta Neuropathol* 95:217-222.
- Yan C, Zhu M, Staiger J, Johnson PF, Gao H. 2012. C5a-regulated CCAAT/enhancer-binding proteins beta and delta are essential in Fc gamma receptor-mediated inflammatory cytokine and chemokine production in macrophages. *J Biol Chem* 287:3217-3230.
- Yankner BA, Mesulam MM. 1991. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. beta-Amyloid and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 325:1849-1857.
- Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. 1999. Up-regulated production and activation of the complement system in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* 154:927-936.
- Zhang C. 2012. Natural compounds that modulate BACE1-processing of amyloid-beta precursor protein in Alzheimer's disease. *Discov Med* 14:189-197.
- Zlokovic BV, Deane R, Sagare AP, Bell RD, Winkler EA. 2010. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid beta-peptide elimination from the brain. *J Neurochem* 115:1077-1089.

7 Anhang

7.1. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Manuel Lutzenberger, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle von CCAAT/enhancer-binding protein delta (C/EBPD) in neurodegenerativen Erkrankungen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgter Publikation

Manuel Lutzenberger hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1:

Lutzenberger M, Burwinkel M, Riemer C, Bode V, Baier M (2015):

Ablation of CCAAT/Enhancer-Binding Protein Delta (C/EBPD): Increased Plaque Burden in a Murine Alzheimer's Disease Model.

PLoS ONE 10(7): e0134228. doi:10.1371/journal.pone.0134228

Impact Factor: 3.234

80 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Verhaltensuntersuchungen, Organentnahme und Präparation, Anfertigung von Gewebeschnitten, (Immun)histochemische Untersuchungen, PET-Blot, Western Blot, Plasmid-, DNA-, RNA-Isolierung, Real-time PCR, PCR, Zellkultur, Transfektion sowie die Erhebung, Auswertung und Interpretation der Daten.

Manuel Lutzenberger

Prof. Dr. med. Frank Heppner

7.2. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7.3. Komplette Publikationsliste

Lutzenberger M, Burwinkel M, Riemer C, Bode V, Baier M (2015):

Ablation of CCAAT/Enhancer-Binding Protein Delta (C/EBPD): Increased Plaque Burden in a Murine Alzheimer's Disease Model.

PLoS ONE 10(7): e0134228. doi:10.1371/journal.pone.0134228

Ulbricht U, Sommer A, Beckmann G, **Lutzenberger M**, Seidel H, Kreft B, Toschi L. (2013):

Isogenic human mammary epithelial cell lines: novel tools for target identification and validation. Comprehensive characterization of an isogenic human mammary epithelial cell model provides evidence for epithelial-mesenchymal transition.

Breast Cancer Res Treat. 2013 Apr;138(2):437-56. doi: 10.1007/s10549-013-2472-7. Epub 2013 Mar 13.

7.4. Danksagung

„Der Weg ist das Ziel“ (Konfuzius) und wenn das eine Ziel erreicht ist, wartet bereits das nächste verwirklicht zu werden.

Vielen Dank an Sie, Herr Prof. Heppner, für Ihr Engagement und Ihre Betreuung!

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei Dir, Dr. Michael Baier, für die Überlassung des interessanten Dissertations-Themas, die mir zur Verfügung gestellten Mittel, die Unterstützung und die Möglichkeit meine Arbeit am Robert Koch-Institut durchführen zu können. Und nicht zuletzt auch für die gute Betreuung der Arbeit!

Ein großer Dank geht auch an das Rückgrat und die guten Seelen unseres Labors, Karin Krohn, Frau Lichy und Elke Westhäuser. Danke für Eure Hilfe und Unterstützung!

Neben vielen interessanten Diskussionen und der guten Laune, möchte ich mich bei Dir, Dr. Michael Burwinkel, auch für Deine Unterstützung und Hilfe bedanken!

Ebenfalls für die gute Betreuung sowie die Unterstützung mit Rat und Tat danke ich Dir, Dr. Constanze Riemer!

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie, meine Eltern und meine Freundin. Ihr habt mich in schönen, wie auch in schweren Zeiten stets unterstützt und mich in meinem Vorhaben bestärkt.