

Untersuchung der immunstimulatorischen Effekte von Neuromelanin (NM) auf dendritische Zellen und deren Bedeutung in der Pathogenese von Morbus Parkinson

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
Der Julius-Maximilian-Universität Würzburg

vorgelegt von
Uwe Oberländer
geboren in Treuchtlingen

Würzburg 2012

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Rössler

Gutachter : PD Dr. Carsten Scheller

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Die Doktorarbeit wurde vom November 2007 bis November 2010 im Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertationsschrift „Untersuchung der immunstimulatorischen Effekte von Neuromelanin (NM) auf dendritische Zellen und deren Bedeutung in der Pathogenese von Morbus Parkinson“ selbstständig angefertigt und keine anderen als von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Würzburg, den 15.12.2011

Danksagung

Bedanken möchte ich mich ganz besonders herzlich bei PD Dr. Carsten Scheller für die Betreuung der Arbeit, seiner außergewöhnlich freundlichen Hilfsbereitschaft und die familiäre Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Prof. Dr. Thomas Dandekar danke ich sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Einen ganz, ganz besonders lieben Dank an die gesamte Arbeitsgruppe Scheller. Bianca, Falko, Kathrin, Patrick, Conrad, Nicole, Inge, Rhoda, Johannes, Carsten und Eleni die mir mit Rat und Tat während der gesamten Zeit zur Seite gestanden haben. Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Lutz möchte ich mich ebenfalls sehr für ihre Unterstützung bedanken.

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Zusammenfassung</u>	9
1.1 Die Aktivierung von dendritischen Zellen durch Neuromelanin	9
1.2 Der <i>in vitro</i> Abbau des A β -Peptides durch das humane <i>insulin degrading enzyme</i>	9
<u>2. Summary</u>	
2.1 Neuromelanin activates dendritic cells	11
2.2 <i>In vitro</i> degradation of A β -peptide by human insulin degrading enzyme	11
<u>3. Einleitung</u>	13
3.1 Das Parkinson Syndrom	13
3.2 Neuromelanin	14
3.2.1 Struktur und Verbreitung	14
3.2.2 Bildung und Funktion	15
3.2.3 Neuromelanin in der Pathogenese von Parkinson	17
3.3 Reifung und Funktion dendritischer Zellen	18
3.4 Aβ in der Pathogenese von Alzheimer	19
3.5 Das <i>insulin degrading enzyme</i> (IDE)	20
3.6 Adeno-assoziierte Viren und Foamyviren als virale Vektoren der Gentherapie	22
3.7 Zielsetzung der Arbeit	25
3.7.1 Untersuchung der immunstimulatorischen Effekte von Neuromelanin (NM) auf dendritische Zellen und deren Bedeutung in der Pathogenese von Parkinson	25
3.7.2 Klonierung eines hIDE-exprimierenden AAV-Vektors zur Degradierung von A β	25
<u>4. Material</u>	26
4.1 Bakterien	26
4.2 Primer und Oligonukleotide	26
4.3 Plasmide	27
4.4 Enzyme	28

4.5 Puffer und Lösungen	29
4.6 Western Blot	31
4.7 Antikörper	31
4.8 Zelllinien	32
4.9 Blutproben	32
4.10 Versuchstiere	32
4.11 Reagenzien für Zellkulturen	32
4.12 „Kits“	33
4.13 Chemikalien	33
4.14 Verbrauchsmaterialien	35
4.15 Geräte	36
<u>5. Methoden</u>	38
5.1 Bakterien	38
5.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen	38
5.1.2 Herstellung von Agarplatten	38
5.1.3 Anlegen von Glycerinkulturen	38
5.1.4 Hitzeschock-Transformation von Bakterien	38
5.2 Molekularbiologische Methoden	39
5.2.1 PCR	39
5.2.2 Gelelektrophorese mit Agarosegelen	40
5.2.3 Präparative Aufreinigung von Plasmid DNA aus Bakterien	40
5.2.3.1 Mini-Präparationen mit Diatomeenerde	41
5.2.3.2 Maxi-Präparationen von Plasmid DNA	41
5.2.4 PCR-Reinigung und Gel-Extraktion	42
5.2.5 Phenolreinigung von DNA	42
5.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA	43
5.2.7 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen	43
5.2.8 5`-Dephosphorylierung von Plasmid DNA	44
5.2.9 Ligation	44
5.2.10 Sequenzierungsreaktion	45
5.3 Eukariotische Zellen	46
5.3.1 Einfrieren von Zellen	47
5.3.2 Auftauen von Zellen	47
5.3.3 Passagieren von adhärennten Zellen	47
5.3.4 Zelldichtebestimmung	48

5.3.5	Transfektion mit Polyethylenimin	49
5.3.6	Isolierung von hämatopoetischen Stammzellen aus murinem Knochenmark	51
5.3.7	Präparation von murinen Lymphknoten	51
5.3.8	Isolierung von peripheren, mononukleären Blutzellen mittels einer Ficoll–Dichtegradientenzentrifugation	53
5.3.9	Generierung von dendritischen Zellen (DZ)	
	A) aus murinen HSC	53
	B) aus humanen PBMC	53
5.3.10	Aktivierung dendritischer Zellen mit Neuromelanin und Dopaminmelanin	54
5.3.11	T–Zell Proliferationstest	55
5.4	Mikroskopie	56
5.4.1	Fluoreszenzmikroskopie	56
5.4.2	Konfokalmikroskopie	56
5.5	Durchflusszytometrie	57
5.6	Immunochemische Methoden	57
5.6.1	Immunoassay zum Nachweis von DAM–Antikörpern	57
5.6.2	Agglutinationstest zum Nachweis von DAM–Antikörpern	58
5.6.3	ELISA zur quantitativen Bestimmung von Zytokinkonzentrationen	58
5.7	Proteinchemische Methoden	59
5.7.1	Gewinnung von Proteinlysaten aus Zellkulturen	59
5.7.2	Proteinbestimmung nach Bradford	59
5.7.3	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS–Page)	60
5.7.4	Western Blot	61
5.7.5	Test auf LPS Verunreinigung mit <i>limulus ameobocyte lysate</i> (LAL)	62
5.7.6	Extrazelluläre Antikörperfärbung von Zelloberflächenproteinen	63
5.7.7	Intrazelluläre Antikörperfärbung von Proteinen	63
<u>6. Ergebnisse</u>		64
6.1	Reifungen von dendritischen Zellen durch Stimulation mit NM	64
6.1.1	Keine LPS-Verunreinigung in DAM und NM	64
6.1.2	Murine und humane DZ phagozytieren DAM und NM	65
6.1.3	Nur NM und nicht DAM lässt mDZ spontan reifen	69
6.1.4	DAM zeigt auch bei hDZ keine Wirkung	72
6.1.5	NM stimuliert die Ausschüttung von IL-6 und TNF– α bei mDZ	73
6.1.6	Mit NM behandelte mDZ lassen T-Zellen proliferieren	75

6.2 In DAM-immunisierten Kaninchen konnten keine Anti-DAM-Antikörper nachgewiesen werden	82
6.3 Die Plasmidklonierungen für ein AAV basiertes <i>in vitro</i>-Testsystem zum Abbau von Aβ durch hIDE	84
6.3.1 Klonierung von BF014-hAPP	84
6.3.2 Klonierung von pAAV-hIDE-mRFP	85
<u>7. Diskussion</u>	88
7.1 Die Untersuchung der immunstimulatorischen Effekte von DAM und NM auf dendritische Zellen	88
7.1.1 Endotoxintest von DAM und NM	88
7.1.2 Die Generierung von mDZ und hDZ im Vergleich	89
7.2.2 Die Melanine DAM und NM	90
7.2.3 Die Phagozytose von NM lässt mDZ reifen	90
7.2.4 NM regt bei mDZ die Ausschüttung von Zytokinen an	91
7.2.5 Durch NM aktivierte mDZ regen allogene mTZ zur Proliferation an	92
7.2.6 NM und hDZ	93
7.2.7 Zytotoxische Wirkung von DAM auf hDZ	94
7.2 Immunoassay zum Nachweis von Anti-DAM-IgG	94
7.3 Neuromelanin als möglicher Auslöser einer Autoimmunität bei MP	96
7.4 Der <i>in vitro</i> Abbau von Aβ durch hIDE	98
7.4.1 Die Erzeugung einer Zelllinie mit stabiler Expression von hAPP wt, sw	98
7.4.2 Die Klonierung eines pAAV-hIDE-Plasmids	98
7.4.3 Die Klonierung von hIDE Sequenz in das foamyvirale Plasmid BF014	99
<u>8. Literaturverzeichnis</u>	100
<u>9. Publikationen</u>	107
<u>10. Abkürzungsverzeichnis</u>	108
<u>11. Abbildungsverzeichnis</u>	110

1. Zusammenfassung

1.1 Die Aktivierung von dendritischen Zellen durch Neuromelanin

Hintergrund: Das Absterben Neuromelanin (NM)-haltiger Zellen in der *substantia nigra* (SN), und die daraus resultierende Erniedrigung des Dopaminspiegels im *striatum*, ist ein pathologisches Hauptmerkmal der Parkinsonschen Krankheit. Ein neuerlicher Nachweis von Anti-Melanin-Antikörpern gibt Anlass zur Vermutung, dass NM ein Autoantigen sein könnte. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass NM tatsächlich von dendritischen Zellen (DZ), die *in vivo* hauptverantwortlich für die Auslösung von T- und B-Zellantworten sind, erkannt wird. Die Erkennung von NM durch DZ ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Einleitung einer adaptiven Immunantwort.

Methoden: Murine dendritische Zellen (mDZ) wurden aus Knochenmarkszellen generiert und mit NM aus humaner SN oder synthetischem Dopaminmelanin (DAM) behandelt, nachdem beide Melanine endotoxinfrei getestet wurden. Die Phagozytose von NM wurde mittels konfokaler Mikroskopie dokumentiert. Die Expression von MHC II und CD86 wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert. Zytokinkonzentrationen von TNF- α und dem Interleukin IL-6 wurden mit ELISA-Assays bestimmt. Abschließend wurde die Funktion der durch NM aktivierten DZ mit einer allogenen *mixed lymphocyte reaction* (MLR) überprüft.

Ergebnisse: NM wurde von den mDZ effektiv phagozytiert, woraufhin die mDZ einen reifen Phenotyp (CD86^{high}/MHC II^{high}) zeigten. Zusätzlich sekretierten durch NM aktivierte mDZ die Zytokine IL-6 and TNF- α . Schließlich ließen die mDZ T-Zellen in einer MLR proliferieren, und beweisen so ihre Funktionalität und die Fähigkeit eine primäre T-Zellantwort auszulösen. Im Gegenteil dazu konnte DAM, dem die Protein- und Lipidkomponenten von NM fehlen und nur das Melaninrückrat mit NM gemeinsam hat, nur einen kleinen Effekt bei den mDZ hervorrufen.

Diskussion: NM wird von DZ *in vitro* erkannt und bewirkt deren Reifung. Sollte der Vorgang auch *in vivo* stattfinden, besteht die Möglichkeit, dass SN-Antigene dem adaptiven Immunsystem präsentiert werden, was in einzelnen Fällen zur Einleitung einer adaptiven Immunantwort führen könnte. NM könnte also der Auslöser für einen autoimmunen Pathomechanismus in der parkinsonschen Krankheit sein (135).

1.2 Der *in vitro* Abbau des A β -Peptides durch das humane *insulin degrading enzyme*

Hintergrund: A β -Plaques sind mutmaßlich an der Entstehung der Alzheimer Krankheit (*alzheimer disease* (AD)) beteiligt. Die Bildung der Plaques kann die Folge einer fehlerhaften Prozessierung des *amyloid precursor* Proteins (APP) sein, und/oder auf einer fehlerhaften

Degradierung von A β beruhen. Das Insulin-degradierende Enzym (IDE) wird bevorzugt neuronal exprimiert und ist im Gehirn hauptverantwortlich für den Abbau von monomerem A β . Menschen mit Diabetes Typ 2 haben ein erhöhtes Risiko an AD zu erkranken. Hier geht eine Verminderung der IDE Aktivität mit einer erhöhten Neigung zur A β Akkumulation einher. Die Affinität von IDE zu A β könnte man sich in einem Therapieansatz zu Nutze machen indem man IDE über einen viralen Vektor (z.B AAV) neuronal einbringt, um einer vermehrten A β -Produktion entgegen zu wirken.

Methoden: Die DNA Sequenzen der beiden Proteine hAPP und hIDE wurden mit einer PCR amplifiziert, mit Restriktionsenzymen verdaut, aufgereinigt und in ihre Zielplasmide ligiert. Ligationsansätze wurden in kompetente E.coli Top 10 mittels Hitzeschock transformiert und aus positiven Kolonien die DNA präpariert. Die DNA wurde kontrollverdaut und sequenziert. Von richtigen Plasmiden wurden Maxikulturen und Kryokulturen angelegt. Fertige virale Plasmide wurden transfiziert und die Expression der Transgene hAPP und hIDE im WesternBlot überprüft. Mit den Plasmiden BF014 hAPPwt und sw wurden durch Transfektion von 293T Zellen Foamyviren erzeugt Die Viren wurden geerntet und HT1080 Zellen damit transduziert. Mit einer FACS Sortierung der EGFP positiven HT1080 wurden infizierte transgene hAPP Zellen isoliert, weiter kultiviert, die hAPP Expression nochmals überprüft und bei -80°C eingefroren.

Ergebnisse: Es konnte eine transgene Zelllinie erzeugt werden die stabil die beiden Variationen des hAPP exprimiert. Es wurde ein pAAV-hIDE Plasmid kloniert, das sowohl in einer Transfektion wie auch bei einer Transduktion das Protein hIDE exprimiert. Allerdings gelang es nicht einen FLAG-Tag oder mRFP hinter die hIDE cds zu klonieren. Es konnte kein Test dieses viralen AAV Vektors mit der stabilen Zelllinie mehr erfolgen und der Abbau von A β nicht mehr studiert werden.

Diskussion: Der erhaltene rAAV hIDE Vektor konnte trotz fehlender Kozak Sequenz hIDE auch nach einer Transduktion gut exprimieren. Da Membrangebundenes hIDE vermutlich für den Abbau von A β unmittelbar nach der Prozessierung vermutet wird, ist die IDE cds auch ohne Signalsequenz für den Transport aus der Zelle im rAAV ausreichend. Ein Marker (HisTag, FLAG-Tag) wäre für *in vitro* Versuche in Zellkulturen oder in Tierversuchen wünschenswert, um den Virustiter bestimmen zu können. Ein A β WesternBlot fehlt als letzter Baustein des Testsystems und müsste etabliert werden. Für eine therapeutische Anwendung könnte man danach auf den rAAV hIDE Vektor zurückgreifen. Zur Behandlung von early onset AD, bei der vermehrt A β exprimiert wird, wäre der Vektor denkbar In anderen Fällen von AD würde zusätzlich eingebrachtes IDE den gleichen krankhaften Veränderungen unterworfen werden wie z.B. bei Diabetes Typ 2 wo IDE über Insulin und IGF-I reguliert wird und keinen therapeutischen Effekt haben.

2. Summary

2.1 Neuromelanin activates dendritic cells

Background: The degeneration of neuromelanin (NM)-containing dopaminergic cells in the *substantia nigra* (SN) and a resulting reduction in striatal dopamine is a key feature in Parkinson's Disease (PD). Increased anti-melanin antibodies in sera of Parkinson patients had been shown recently, suggesting that NM may act as an autoantigen in PD. In this work it was asserted that NM is being recognized by dendritic cells (DCs), the major cell type for inducing T- and B-cell responses *in vivo*. This recognition of NM by DCs is a prerequisite to trigger an autoimmune response directed against NM-associated structures.

Methods: Murine dendritic cells (mDC), generated from bone marrow, were treated with NM of SN from human subjects or with synthetic dopamine melanin (DAM) after both melanins were tested free of endotoxin contamination. Phagocytosis was documented with confocal microscopy. The expression of MHC II and CD86 was analyzed by flow cytometry. Concentrations of inflammatory cytokines TNF- α and interleukin IL-6 were determined by ELISA. Finally the function of activated mDCs was tested by allogeneic mixed lymphocyte reaction (MLR).

Results: NM was phagocytized effectively by mDCs, which subsequently developed a mature phenotype (CD86^{high}/MHC II^{high}). In addition, NM-activated mDCs secreted the proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α . Finally, they potently triggered T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction, showing that mDC activation was functional to induce a primary T cell response. On the contrary, DAM, which lacks the protein and lipid components of NM but mimics the dopamine-melanin backbone of NM, had only very little effect on mDC phenotype and function.

Discussion: NM is recognized by DCs *in vitro* and triggers their maturation. If this process occurs *in vivo*, it would allow DCs to transport and present SN antigens to the adaptive immune system, thus leading to autoimmunity in susceptible individuals. This finding offers a rationale for an autoimmune-based pathomechanism of PD with NM as the initial trigger (135).

2.2 In vitro degradation of A β peptide by human insulin degrading enzyme

Background: A β -plaques are considered to improve cell death in Alzheimer disease (AD) etiology. The reasons of plaque formation can either be due to wrong procession of amyloid precursor protein (APP) caused by mutations in APP itself or the γ -secretase, or result from the hampered degradation of A β . The human insulin degrading enzyme (hIDE) is mainly

expressed in neurons and is the main enzyme for monomeric A β degradation in the brain. In type-2 diabetes, which is known to increase the risk of AD, IDE is downregulated by insulin and IGF-1. As a consequence the excess of A β may lead to plaque formation. Here lies the opportunity for a novel therapeutic treatment with IDE provided by viral vectors helping to clear the increased A β amounts in early onset AD.

Methods: DNA sequences of hAPP and hIDE were amplified by PCR, cleaved, purified and ligated into their target plasmids. Plasmids were transformed into *E. coli top 10* by heat shock method. Grown colonies were analysed by DNA isolation, and DNA sequencing. Maxi DNA preparation was done with correct clones and aliquots were frozen with glycerol. Expression of hAPP and hIDE was examined by western blot. BF014 hAPPwt and sw were transfected into 293T cells to get foamy virus particles. These were harvested and taken to infect HT1080 cells. After sorting them for EGFP by FACS, stable expressing hAPP cells were frozen at -80°C.

Results: A hAPPsw expressing cellline was established. An efficient rAAV-hIDE-vector was build although it has no fluorescent marker or FLAG-Tag. No A β -degradation assay was performed.

Discussion: This work delivers a functional viral vector rAAV hIDE. Good hIDE expression was detected after transduction even without a kozak sequence cloned in front of the hIDE cds. Because membrane bound IDE is thought to degrade A β *in vivo*, no additional export signaling sequence for IDE is needed. But for quantification of the virus titer an additional marker (FLAG-Tag, HisTag) would be beneficial to further *in vitro* or animal studies. Finally an A β western blot has to be established as the missing part of the whole testing system. For therapeutical applications rAAV hIDE could be provided in some early onset AD with enhanced A β production. In other cases of AD, e.g. those associated with diabetes typ 2 additional IDE would only be constricted to the same pathogenous conditions and have no therapeutic effect.

3. Einleitung

3.1 Das Parkinson Syndrom

Die Erkrankung Morbus Parkinson (MP) wurde nach dem englischen Arzt James Parkinson benannt, der die Krankheit 1817 erstmals in seinem *Essay on the shaking palsy* als Schüttellähmung beschrieb. MP ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, die weltweit etwa 2% aller Menschen über 65 Jahren betrifft. Mit einem hohen Lebensalter erhöht sich das Risiko einer Erkrankung deutlich. Jedoch können die typischen Symptome in seltenen Fällen vor dem 40. Lebensjahr in Erscheinung treten (1). Zu diesen so genannten Kardinalsymptomen zählt man Muskelstarre (*Rigor*), Muskelzittern (*Tremor*), Haltunginstabilität, Sprach- und Verhaltensstörungen und eine verlangsamte Bewegung (*Bradykinese*) bis hin zur völligen Bewegungslosigkeit (*Akinese*). Die Ausprägung dieser Symptome kann sehr verschieden sein und eine Diagnose erschweren (2). Neben genetischen Defekten (Park 1-11) (3), viralen Erregern (u.a. HIV, Herpes simplex, Influenza B) (4) und Vergiftungen (u.a. MPTP) (5) wurden auch andere Krankheiten (Kreutzfeld Jakob, *wilsons disease*) (6) (7) als mögliche Auslöser für MP beschrieben. Tatsächlich bezeichnet man mit MP inzwischen eine Vielzahl von Krankheitsbildern mit unterschiedlichsten Ursachen und Ethnologien, die aber als einzige pathologische Gemeinsamkeit das Absterben der dopaminergen Neuronen in der *substantia nigra pars compacta* (SNpc) (8) sowie im *locus ceruleus* (9) (10) aufweisen. Die SNpc ist für die Dopaminproduktion im Gehirn verantwortlich. Dopamin ist als Neurotransmitter im *caudate nucleus* und dem *putamen* für die Koordination von Bewegungsabläufen unerlässlich.

Ein zweites aber nicht immer vorhandenes Merkmal ist die Bildung von Lewy-Körperchen. Das sind intrazelluläre Einschlüsse aus ubiquitinierten Ablagerungen des Proteins α -Synuclein (11). Die Verteilung der Lewy-Körperchen im SNpc und im *locus coeruleus* ist bei MP ausschlaggebend, um von einer „Demenz mit Lewy-Körperchen“ (12) unterscheiden zu können. Ausnahmen von MP, bei denen keine Lewy-Körperchen gebildet werden, sind z.B. die *encephalitis lethargica*, juveniles MP (13) (14) und wenige genetisch bedingte Formen von MP (15). Die Entstehung der Lewy-Körperchen wird als Schutzmechanismus von Neuronen interpretiert, wobei fibrilläres, toxisches α -Synuclein mit β -Faltblattstruktur aggregiert (16). Dabei ist intrazelluläres Dopamin ein wesentlicher Regulator der α -Synuclein Aggregation (17). Lewy-Körperchen und der Schwund der SNpc sind mikroskopisch in Schnitten von post-mortem MP Patienten gut diagnostizierbar.

Neben seltenen vererbaren Varianten von MP (Park 1-11) (18) ist das idiopathische (v. griech. „eigen“ und „Leiden“) Parkinson Syndrom (IPS) die häufigste Form des Leidens. Während man bei einer vererbten MP die Ursache beispielsweise in einer Fehlfunktion des

Ubiquitin–Proteasom–Systems (19) oder der Akkumulation fehlerhafter Proteine (α -Synuclein) aufgrund von Genmutationen sieht, sind die Ursachen für IPS unklar. In Frage kommen Verletzungen (z.B. Boxerenzephalitis), Entzündungen (z.B. HIV–Enzephalopathie) (20) oder Vergiftungen durch Pestizide und andere toxische Substanzen (z.B. MPTP, Rotenon). Intrazellulär können bei allen MP Formen oxidativer bzw. nitrosativer Stress (21), ein Ungleichgewicht im Eisenhaushalt (22), eine Störung der Ca^{2+} Homöostase (23) oder eine mitochondriale Dysfunktion (24) auftreten. Inflammatorische Prozesse wie die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten (25), die Bildung von Antikörpern (26), die Ausschüttung von Zytokinen in der SN und dem ZNS (27) (28), oder die Aktivierung von Komplement wurden für alle Formen von MP beschrieben (29).

Braak et al. (30) versuchten 2002 dem anatomischen Pfad der Erkrankung zu folgen, um ein Modell für den Krankheitsverlauf zu erstellen. Sie analysierten die Verbreitung von Lewy–Körperchen anhand von Präparaten verstorbener Parkinson Patienten. Das daraus erhaltene Modell stellt den Verlauf der Krankheit in 6 Stufen dar. Eine interessante Erkenntnis daraus ist, dass MP früh im Riechzentrum (*bulbus olfactorius*) beginnt, und die Zerstörung dann ihren Weg den Hirnstamm aufwärts fortsetzt. Die SNpc wird erst im dritten Stadium geschädigt und die motorischen, klinisch bedeutsamen Symptome erst diagnostizierbar, wenn die Hälfte der dopaminergen Neuronen verloren ist. In diesem Stadium ist der Dopaminspiegel bereits um ~80% reduziert (31). Eine frühe Diagnose von MP ist bis heute nicht möglich. Die gängigste Behandlung, um das Leben der Patienten mit ihren Symptomen zu erleichtern, ist die Verabreichung von L-Dopa. L-Dopa ist ein Vorläufermolekül von Dopamin, das die Blut–Hirn–Schranke durchdringt und weiter zu Dopamin umgewandelt werden kann um das Dopamindefizit in der SN auszugleichen.

3.2 Neuromelanin

3.2.1 Struktur und Verbreitung

Neuromelanin (NM) ist ein etwa 30 nm großes unlösliches Pigment, das vorwiegend in den dopaminergen Neuronen der *substantia nigra* (SN) vorkommt. Seine schwarzbraune Farbe ist für diese Region des Gehirns bezeichnend (32). NM kommt außerdem in noradrenergen Neuronen des *locus ceruleus* (33) und anderen chatecolaminergen Zellen des Hirnstamms vor (32). Genannte Hirnregionen sind unter anderem für Wahrnehmung, Bewegung, Gefühl und Merkfähigkeit verantwortlich.

NM ist in älteren Primaten, Pferden, Fröschen und Hunden entdeckt worden. Es wird beim Menschen ab einem Alter von 3 Jahren mikroskopisch sichtbar, nimmt bis zum Alter von etwa 60 Jahren zu und scheint dann zu verschwinden (34). NM wird in die Stoffklasse der Melanine eingeordnet. Melanine, abgeleitet von dem griechischen Wort *melanos* für dunkel,

werden je nach Vorläufermolekülen eingeteilt in Eumelanin, Pheomelanin, Neuromelanin und Allomelanin (35). Dabei ähnelt NM in seiner Zusammensetzung Pheomelaninen (innen) und Eumelaninen (außen) im Verhältnis 1:3.

Während periphere Melanine in Melanosomen von Melanozyten, einer spezialisierten dendritischen Zelle, synthetisiert und von dort aus an ihren Bestimmungsort transportiert werden, scheinen die NM-Granula in den Neuronen der SN zu entstehen (35).

NM ist ein Polymer aus Indolbenzothiazinen (36), die das Melanin-Rückgrat bilden. Darüber hinaus besteht NM zu zirka 15% (w/w) aus kovalent gebundenen Proteinen und zu etwa 20% (w/w) aus assoziierten Lipiden.

Eine Proteomanalyse von NM ergab ein Proteinprofil das 72 Proteine umfasst. Darunter befinden sich lysosomale Membranproteine (z.B. LAMP-1), Proteine des Glykolipidstoffwechsels (z.B. Säurezeramidase), Proteine des Glykoproteinstoffwechsels (z.B. Arylsulfatase B), mitochondriale Proteine (z.B. diverse ATP-Synthase-Ketten) und zahlreiche Tubuline und Chaperone, die die Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum regulieren (37). Auch das Eisen-speichernde L-Ferritin wurde kürzlich in NM-Granula identifiziert (38).

Dolichol und Cholesterol werden als die größten Lipidanteile genannt (35) (39). Die hohe Zahl von gebundenen Proteinen und assoziierten Lipiden läßt eine gesteuerte Synthese und vielfältige Funktionen von NM vermuten. Weil NM von einer Lipidschicht lysosomalen Ursprungs umgeben ist (40), wird NM auch als *lysosome related organelle* (LRO) bezeichnet, womit das Pigment den Status eines Zellorganelles besitzt.

Die strukturelle Analyse von NM ist keineswegs abgeschlossen, sodass hierzu noch keine endgültigen Aussagen gemacht werden können. Das Problem besteht darin eine ubiquitäre Aufreinigungsmethode zu finden, die NM in einem möglichst nativen Zustand belässt.

3.2.2 Bildung und Funktion

Die Bildung von NM wurde anfangs als eine einfache Autooxidation von Dopamin beschrieben (35). Mittlerweile sprechen jedoch zahlreiche Untersuchungen dafür, das NM das Ergebnis einer regulierten Synthese ist. Das für die Melaninsynthese übliche Enzym Tyrosinhydroxylase kommt allerdings dafür nicht in Betracht, da es in der SNpc gar nicht oder nur geringer Konzentration vorkommt (41) (35) (42). Möglich wäre ein noch unbekannter Mechanismus, der von anderen mit NM verbundenen Proteinen reguliert wird (38). Schließlich ist der Einschluss regulatorischer Proteine bei anderen Melaninen nicht ungewöhnlich (43). Andere für die Melanin-Synthese übliche Regulatoren wie das *melanocyte stimulating hormone* (MSH), das *aggouti signaling protein* (ASP) und UV-Licht scheiden bei der Bildung von NM ebenfalls aus (35). Sulzer et al. vertreten die Theorie, dass

toxische Dopaminquinone und Semiquinone (DAQs) von Lysosomen endozytiert und als NM gespeichert werden. Eisen scheint dabei eine katalytische Funktion zu erfüllen und lässt die Beteiligung eines Enzyms vermuten (44).

Jedoch ist alleine das Vorhandensein von Dopamin und des aus dem Dopaminstoffwechsel hervorgehenden DAQs keine zwingende Voraussetzung für die Bildung von NM. Schließlich besitzen Nager kein NM und auch beim Menschen korrelieren die Dopaminvorkommen nicht mit denen von NM. Während sich die vermehrte Bildung von NM bei Ratten durch einen L-DOPA-verursachten Überschuss von DAQs induzieren ließ, wurde eine vermehrte Bildung von NM durch die Verabreichung von L-DOPA beim Menschen noch nicht festgestellt.

Sulzer et al. sehen in der Bildung von NM gleichzeitig seine Funktion in der Zelle erfüllt, indem es potentiell toxische DAQs bindet. Diese wären sonst in der Lage die Funktion von α -Synuclein, Thyrosin-Hydroxylase und dem humanen Dopamin Transporter (hDAT) zu kompromittieren (45) (46) (47).

Andere *in vitro*-Experimente zeigten, dass NM eine hohe Affinität zu Eisen besitzt (48). NM könnte demnach eine Bedeutung als Eisenspeicher bzw. bei der Regulierung der Eisen-Homöostase in den Neuronen der SN haben (39). Der höhere Eisengehalt stimmt auch mit einer stärkeren Pigmentation der SN im Vergleich zum *locus ceruleus* überein (49). Aus Strukturanalysen weiß man, das NM zwei Bindungsstellen (*sites*) für Eisen besitzt (50). Das weniger reaktive dreiwertige Eisen (Fe^{3+}) ist dabei an die *high affinity site* gebunden und das reaktivere zweiwertige Eisen (Fe^{2+}) an die *low affinity site* (51). In seiner intrazellulären, physiologisch intakten Form ist NM in der Lage Eisen einzufangen und die Bildung von OH^- -Radikalen über die Fenton Reaktion zu unterbinden, indem es reaktive Eisenionen (Fe^{2+}) speichert (Abb.: 3.2.2.1) (52).

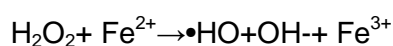


Abb. 3.2.2.1: Fentonreaktion

Zusätzlich zu den beiden Bindungsstellen wurde das Protein L-Ferritin, das hauptsächlich wegen seiner Eigenschaft als Langzeitspeicher für Eisen bekannt ist, bei einer Proteosomanalyse identifiziert (38).

Von NM ist neben seiner gut untersuchten Wechselwirkung mit Übergangsmetallen auch bekannt, dass es die Oxidation von Ascorbat reduziert (53). Ascorbat ist eines der wichtigsten Antioxidanten in den Neuronen (54). Zudem kann NM toxische Moleküle wie MPP^+ Ionen, die im MPTP induzierten Parkinson Modell entstehen, binden und unschädlich machen (55). *In vitro* wurde durch Zugabe von NM die Expression von neuroprotektiven Chemokinen CXCL10 und CCL2 in Astrozyten angeregt und die NF- κ B-Aktivierung unterdrückt (56). Ob NM in den Neuronen überhaupt eine Funktion erfüllt oder eine

altersbedingte Ablagerung von DAQs ist, kann noch nicht mit Sicherheit gesagt werden. Fest steht, dass NM mit vielen endogenen Molekülen reagieren kann. Die Mehrzahl der Erkenntnisse deutet für intrazelluläres NM eine Schutzfunktion an, während extrazelluläres NM eine Gefahr darstellen könnte.

3.2.3 Neuromelanin in der Pathogenese von Parkinson

Obwohl der selektive Verlust pigmentierter Neuronen der SN ein pathologisches Hauptmerkmal von MP ist, gibt es auch andere Krankheiten, die mit einem reduzierten NM-Gehalt einhergehen. Beispiele dafür sind die *dopa responsive dystonia* (57), die *beilytico-boding disease of Guam* und die Alzheimer-Erkrankung (58).

Durch den Tod der Neuronen wird NM extrazellulär akkumuliert (59). Inwieweit die Konzentration von NM in den betroffenen Hirnregionen mit dem Tod der Neuronen korreliert, ist strittig. Einerseits scheinen die im *ventral tier* befindlichen Neuronen, trotz ihres geringeren NM Gehalts, besonders bedroht. Anderen Untersuchungen zufolge sind stärker pigmentierte Neuronen gefährdeter (8). Extrazelluläres NM könnte nun auf zwei Wegen für den progressiven Tod weiterer NM-enthaltender Neuronen verantwortlich sein. Ersterer ergibt sich aus der hohen Affinität von NM zu Eisen. Die Eisenkonzentration in der SN nimmt mit dem Alter zu (60) und ist bei MP zusätzlich erhöht (61). Der Grund dafür könnte ein Leck in der Blut-Hirn-Schranke sein (62). Im Falle eines Eisenüberschusses werden die *high affinity* Seiten von NM gesättigt und überschüssiges Eisen wird in seiner reaktiveren Form (Fe^{2+}) an der *low Affinity* Seite verfügbar (60). Das Redoxpotential von NM ist um 69% erhöht und kann die Bildung von *radical oxygen species* (ROS) über die Fenton Reaktion begünstigen (63). Der von extrazellulärem NM verursachte oxidative Stress kann schließlich zu Lipid-Peroxidation bei MP führen (64). Durch ein Absterben weiterer Zellen könnte mehr Eisen frei werden und die progressive Degeneration der Neuronen dadurch verstärkt werden (65).

Zum anderen kann NM inflammatorisch wirksam sein. Es kann umliegende Mikroglia aktivieren und dadurch für die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen ins ZNS verantwortlich sein (66). Die Injektion von NM ins Gehirn zeigte bei Ratten eine Inflammation und Neurodegeneration (53). In Ergänzung zu den Untersuchungen, die extrazelluläres NM als Verursacher degenerativer Prozesse sehen, stellte man in *in vitro*-Versuchen fest, dass NM das Ubiquitin-Proteasome-System kompromittieren und so den geregelten Abtransport schadhafter Proteine hemmen kann (67). Außerdem wurde NM eine mögliche Rolle bei einer mitochondrialen Dysfunktion zugeschrieben (68).

3.3 Reifung und Funktion dendritischer Zellen

Dendritische Zellen (DZ) sind potente antigenpräsentierende Zellen (APZ), die eine vermittelnde Schlüsselrolle in der Entstehung einer adaptiven Immunantwort spielen (69). DZ sind darauf spezialisiert T-Zellen (TZ) zu aktivieren. DZ können myeloiden oder lymphoiden Ursprungs sein und sind in allen Geweben des Körpers zu finden. Eine Ausnahme stellt hier das zentrale Nervensystem (ZNS) dar, welches durch die Blut-Hirn-Schranke einen besonderen immunprivilegierten Status genießt. Allerdings kann es aufgrund einer Infektion oder eines Traumas auch hier zur Einwanderung von DZ kommen und wie im Fall von *encephalomyelitis disseminata* (multiple Sklerose) zu einer Autoimmunität führen (70). Je nach ihrer Wirkungsstätte haben DZ unterschiedliche Phenotypen, die sich in ihrem Aussehen und ihrer Funktion unterscheiden. Während den lymphoiden DZ vorwiegend regulatorische Aufgaben, wie das Eliminieren von selbstreaktiven TZ obliegen, sind myeloide DZ für stimulatorische Effekte, wie die Einleitung einer adaptiven Immunantwort über den Th1-Weg verantwortlich. Die verschiedenen Untergruppen von DZ sind durch die differenzierte Expression ihrer *cluster of differentiation* (CD) gekennzeichnet.

Während ihrer Entwicklung werden Vorläuferzellen der DZ mit dem Blut in verschiedene Gewebe transportiert und differenzieren dort entsprechend ihrer Umgebung zu so genannten unreifen DZ aus, wo sie dann in Wartestellung verharren. Diese ruhenden DZ werden durch die Aufnahme eines Fremdkörpers wie Parasiten, Bakterien oder viralen Erregern aktiviert und dann über eine Chemokin-vermittelte Migration in die Lage versetzt über die Lymphgefäße in die Lymphknoten zu wandern (71) (72) (73). Dort reifen sie und präsentieren ihre prozessierten Antigene (Ag) den naiven TZ.

Die Aufnahme eines Fremdkörpers kann je nach Größe über Phagozytose, Pinozytose und Rezeptor-vermittelter Endozytose erfolgen. Hier stehen den DZ eine Reihe unterschiedlichster Rezeptoren zur Verfügung (69). Diese *pattern recognition receptors* (PRR) können z.B. *toll-like receptors* (TLRs), *nucleotide oligomerization domain* (NOD)-*like receptors*, *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I)-*like receptors* (RLRs) sowie einige Vertreter der C-Typ Lectin Familie sein. Die PRR sind evolutionär auf einige wenige molekulare Signaturen von Bakterien und Viren festgelegt, die als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet werden. Zu PAMPs gehören Lipopolysaccharide (LPS), Cytosin- und Guanin-reiche DNA Sequenzen und wahrscheinlich auch oxidativ veränderte Lipide wie Lysophosphatidylcholin (LPC) (74).

Damit eine DZ eine naive TZ aktivieren kann sind drei Signale nötig, die alle von der DZ gegeben werden müssen. Zuerst muss das Ag über den MHC II-Rezeptor präsentiert werden. MHC II befinden sich bereits in großen Mengen in endosomalen Phagosomen, worin Fremdproteine in Peptide von 10-20 Aminosäuren Länge zerlegt werden und

anschließend die MHC II damit beladen werden. Das Ag von MHC II wird von CD4+ Tz-Helferzellen erkannt, die ihrerseits B-Zellen zur Bildung von Antikörpern stimulieren. Zweitens müssen kostimulatorische Proteinkomplexe wie CD80, CD86 und CD40 exprimiert werden, die mit dem Gegenüber auf der TZ (z.B. CD28) agieren können. Als drittes und letztes Signal werden von den DZ ausgeschüttete Zytokine benötigt (z.B. IL-12) (75).

DZ können für die Untersuchung immunbiologischer Fragestellungen im Labor in großer Zahl kultiviert werden. Dabei werden humane DZ meist aus Vorläuferzellen des peripheren Blutes durch Stimulation mit den Wachstumsfaktoren GM-CSF und IL-4 generiert (76) und murine DZ können aus Knochenmarkszellen der hinteren Extremitäten nur durch Zugaben von GM-CSF gewonnen werden (77).

3.4 Aβ in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung

Die Alzheimer-Erkrankung (Alzheimer Disease, AD) stellt in den Industrieländern ein ernsthaftes gesundheitliches Problem dar und ist die häufigste Ursache von Demenz bei Menschen über 65 Jahren. Das kennzeichnende neuropathologische Merkmal der Erkrankung ist die Degeneration von Neuronen, vor allem im Kortex und im Hippocampus. Die Degeneration der Nervenzellen wird mit *amyloiden Plaques* im parenchymalen Hirngewebe und intrazellulären *tangles* assoziiert. Neurofibrilläre *tangles*, verursacht durch eine Hyperphosphorylierung des Proteins Tau, bleiben auch nach dem Absterben der Zelle erhalten und sind dann als sogenannte *ghost tangles* im Extrazellularraum zu finden. Hauptbestandteil der *amyloiden Plaques* ist das Aβ-Peptid, ein Spaltprodukt des *Amyloid Precursor Proteins* APP (78). APP ist ein Typ 1 integrales Membranprotein, das eine große N-terminale extrazelluläre Domäne (Ektodomäne), eine singuläre Transmembranregion und einen kurzen intrazellulären Bereich besitzt (Abb. 3.4.1). Es wird durch ein aus 19 Exons bestehendes Gen kodiert, welches sich beim Menschen auf Chromosom 21 befindet und über einen Bereich von 400 kb erstreckt (79). Durch das Spleißen werden drei verschiedenen Isoformen gebildet, die eine Größe von 695, 751 und 770 Aminosäuren aufweisen. In Neuronen wird überwiegend die kurze Form gebildet, welche in nichtneuronalen Zellen kaum vorkommt (80). Durch die Prozessierung von APP (Abb. 3.4.1) werden Spaltprodukte erzeugt, die verschiedene physiologische und pathophysiologische Eigenschaften haben.

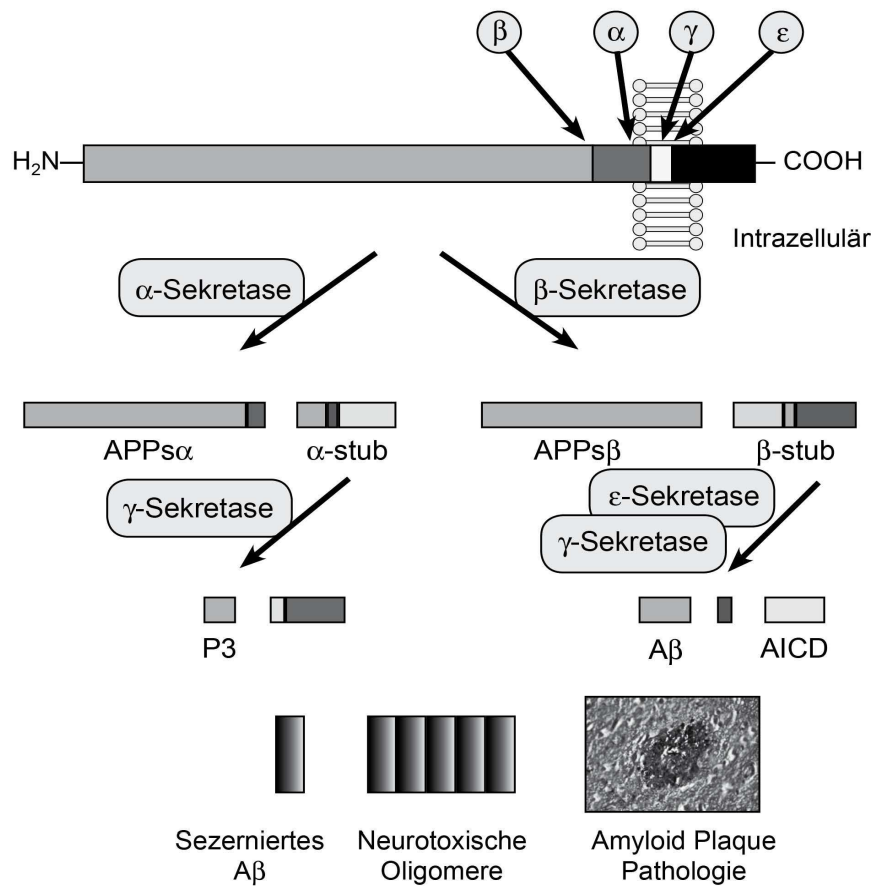


Abb. 3.4.1: Prozessierung von APP

Die nicht amyloide Prozessierung durch die Sekretase α (links) und die amyloide („pathogene“) Prozessierung durch die Sekretase β . Letztere führt zur Bildung von $A\beta$, welches zu neurotoxischen Oligomeren und schließlich zu amyloiden Plaques aggregiert

Für die beiden löslichen Ektodomänen (APPs α und APPs β) wurden neuroprotektive und neuritotrophische Eigenschaften in-vitro beschrieben (81) (82). $A\beta$ soll neben seiner pathophysiologischen Wirkung Aufgaben bei der Synapsenformation und synaptischen Übertragung übernehmen, indem es das Neuriten- bzw. Dendritenwachstum und die Anzahl funktioneller Synapsen moduliert. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unbekannt (83). Für $A\beta_{40}$ -Peptide konnte ebenfalls eine neuroprotektive Wirkung gezeigt werden (84).

$A\beta_{40}$ steht aber auch im Verdacht sich in der perivaskulären extrazellulären Matrix anzuhäufen und eine amyloide Angiopathie zu verursachen. Diese wiederum tritt in 90% aller AD Fälle auf (85). $A\beta$ -Peptide entstehen durch die „amyloide“ Prozessierung von APP mit den beiden Sekretasen β und γ (Abb. 3.4.1). In einem ersten Schritt schneidet die β -Sekretase, auch *Beta-site APP-cleaving enzyme* (BACE) genannt, N-terminal den größten extrazellulären Teil ab und es entsteht lösliches sAPP β . Die γ -Sekretase spaltet anschließend das β -Fragment in $A\beta$ -Peptide unterschiedlicher Länge (39-43 Aminosäuren) (86). $A\beta$ und AICD werden neben anderen Enzymen (Nepilysin, PreP) hauptsächlich durch das *insulin degrading enzyme* (IDE) abgebaut. In manchen Fällen von AD, besonders im

Zusammenhang mit einer Diabetes Typ 2 Erkrankung, kann ein gestörter Abbau von A β der Grund für eine Plaquebildung sein (87).

Zur zytotoxischen Wirkung von A β -Plaques gibt es zwei Hypothesen. Die „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ betrachtet die Plaques als eigentliche Ursache für den Tod der Neuronen (88). Im Rahmen dieser Hypothese wird die Entstehung der Plaques durch die erhöhte Konzentration von fibrillärem A β 42 im Vergleich zu löslichem A β 40 begünstigt. Untersuchungen ergaben, dass ein Übergang der löslichen in die unlösliche Form mit einer Konformationsänderung von der α -Helix- zur β -Faltblattstruktur assoziiert ist. Dieser Übergang wird vom carboxyterminalen Ende aus induziert. Folglich aggregieren A β -Peptide, die ein verkürztes C-terminales Ende besitzen, deutlich langsamer als z.B. das lange A β 42 (89). Die Geschwindigkeit der Aggregation ist sowohl abhängig von der Konzentration des Peptids als auch von der Salzkonzentration und dem pH-Wert der Lösung (90) (91). Bei der Plaquebildung wirkt A β 42 als Keim, der die Anlagerung von A β 40 beschleunigt. A β -Plaques können zu einem erhöhten Calciumeinstrom in die Neuronen führen und so durch die Überaktivierung der NMDA-Rezeptoren eine Glutamat-Neurotoxizität auslösen (92).

Die Oligomer-Hypothese (93) macht ein früheres Stadium intrazellulärer A β 42-Aggregation für die toxische Wirkung verantwortlich. Neueste Untersuchungen konnten das Versagen von Mitochondrien aufgrund vermehrter A β -Oligomer Bildung nachweisen (94). Dabei kommt es zu einer Permeabilisierung der Mitochondrienmembran, woraufhin durch austretendes Cytochrom c eine Caspasen Kaskade aktiviert wird, die schließlich zur Apoptose führt (95). Die molekulare Ursache für die Toxizität von A β 42 liegt in seiner Fähigkeit begründet Metallionen zu reduzieren, wobei H₂O₂ entsteht (96). Durch biochemische Strukturanalysen wurde der Grund dafür gefunden. Das etwas längere C-Terminale Ende von A β 42 ist im Gegensatz zu A β 40 in der Lage, den reduzierenden Komplex zu stabilisieren (97).

3.5 Das insulin degrading enzyme (IDE)

Das Enzym IDE ist eine 110 kD schwere Metalloprotease und kommt in Bakterien, Pflanzen und Menschen vor. Wegen ihres umgekehrten Zinkbindungsmotivs (HxxEH) wird es zur Familie der M16 Metallopeptidasen gezählt (98). IDE wird in großen Mengen in der Leber, im Muskelgewebe oder im Hoden exprimiert (99). Im Gehirn wird es vor allem in Neuronen produziert. (100). IDE spaltet Substrate unterschiedlichster Größe und Aminosäuresequenz. Die einzige Gemeinsamkeit aller Substrate ist ihre Amyloidogenität (101), d.h. die Neigung spontan α -Helix Konformationen in β -Faltblattstrukturen umzuwandeln, was eine Akkumulation begünstigt. Die β -Faltblattstruktur ist tatsächlich auch entscheidend für die Erkennung des Substrates durch IDE und dessen Anlagerung im katalytischen Zentrum. Das katalytische Zentrum wurde nach Kristallstrukturanalysen als katalytischer Raum

bezeichnet, der von zwei Schalen, den N- und C-terminalen Enden von IDE, umschlossen wird. Peptide bis zu einer Größe von ca. 70 Aminosäureresten finden darin Platz (102). Ein weiterer Faktor für die Substratspezifität ist dessen Ladungsverteilung auf der Oberfläche. Die N-terminale Hälfte von IDE ist neutral bis schwach negativ und die C-terminale Hälfte stark positiv geladen (103).

Insulin ist das Substrat mit der höchsten Affinität zu IDE. Danach folgen die *insulin growth factors* (IGF) I und II. Zwar hat IDE nur eine 4-mal geringere Affinität zu A β , ist aber dennoch das wichtigste Enzym beim Abbau von A β im Gehirn (104). IDE kann nur monomeres A β spalten (105), und tut dies vermutlich gleich nach der Prozessierung von APP durch die β -Secretase in Endosomen (98). IDE ist auch in Mitochondrien und Peroxisomen, sowie an der Zelloberfläche lokalisiert (106) (104). Etwa 3-10 % werden über einen unkonventionellen Transportmechanismus von der Zelle sezerniert (107). Andere Enzyme die A β degradieren sind Nephylisin und die Presequenz Peptidase, die A β in Mitochondrien abbaut (102). Eine verminderte Aktivität von IDE könnte die Erklärung dafür sein, dass Diabetes Typ 2 ein Risikofaktor für eine AD Erkrankung darstellt (108).

IDE wird von den Hormonen Insulin und IGF-I reguliert (87) (109). Bei einem relativen Insulinmangel durch Diabetes würde IDE herabreguliert und so der Abbau von A β gehemmt. Unabhängig von einer Diabetes Erkrankung sind in AD Fällen die Abnahme der IDE Konzentration und ein Aktivitätsverlust von membrangebundenem IDE im Hippocampus bekannt (110) (111). Die Ursache hierfür können auch oxidative Veränderungen von IDE oder eine Inhibierung in Folge einer gestörten Kupfer-Homöostase sein (112). Auch Genmutationen oder Genvariationen von IDE haben einen ungünstigen Einfluss auf die Akkumulation von A β (113). Hinsichtlich einer Therapie von AD wurde dem Enzym IDE eine wichtige Bedeutung beigemessen, insofern man anerkannt hat, dass die Behebung einer gestörten Degeneration von A β wichtiger ist als die Verhinderung einer fehlerhaften A β -Prozessierung. Das könnte durch eine virale Gentherapie oder eine Überexpression von IDE geschehen. Versuche mit Nephylisin sind dafür wegweisend (114). Besonders für *early onset* AD, die durch Mutationen im APP Gen oder der γ -Sekretase zur vermehrten Bildung von A β führen, könnte darin eine Behandlungsmöglichkeit liegen. Bei hAPP^{sw} beispielsweise kommt es wegen eines (K670N; M671L) Aminosäure-Ausstausches zu einer Überproduktion von A β , weil gerade durch die Mutation eine optimale Schnittstelle für die β -Secretase *Beta-site APP-cleaving enzyme* (BACE) entsteht (115). Ähnlich kommt es durch eine Mutation im Presinilin Gen, einer Untereinheit der γ -Sekretase, zur vermehrten Bildung von A β .

3.6 Adeno-assoziierte Viren und Foamyviren als virale Vektoren der Gentherapie

In der Gentherapie wird genetisches Material in Patientenzellen eingebracht, um vererbte oder erworbene Krankheiten über einen langen Zeitraum zu behandeln (116). Als Vektoren eignen sich virale Vektorsysteme die in der Lage sind Fremd-DNA in den Zellkern der Wirtszelle zu bringen. Natürlich darf der virale Vektor der Wirtszelle nicht schaden. Deswegen muss er replikationsdefizient und nicht immunogen sein (117).

Das Adeno-assoziierte Virus (AAV-2) ist ein replikationsdefizientes, nicht pathogenes Parvovirus, das für eine produktive Infektion die Koinfektion eines Helfervirus (Adenovirus) benötigt (118). Im lytischen Zyklus liegt die nicht verpackte, doppelsträngige Virus-DNA endosomal vor, oder spezifisch integriert in Chromosom 19 (119). Die Infektion mit einem Wildtyp Adenovirus (wt Ad) führt zur Aufhebung der Latenz und zur Replikation von AAV-2 (120). Die Fähigkeit spezifisch zu integrieren und seine geringe immunogene Aktivität haben AAV-2 für die Gentherapie interessant gemacht. Frühe Versuche AAV-2 für eine Gentherapie zu nutzen scheiterten daran, dass AAV-2 Präparate mit wt Ad, der zur Replikation koinfiziert wurde, verunreinigt waren. Durch eine Überreaktion des Immunsystems kam es schließlich zum Tod des in einer klinischen Testphase befindlichen Patienten (2000). Die Entwicklung eines *helper-free* Systems, die seit ca. 1999 in verschiedenen Varianten betrieben wird (121) (122), machte den Umgang mit AAV-2 in immunologischer Hinsicht wesentlich sicherer und unkomplizierter, da eine Koinfektion mit wt Ad für die Vektorpräparation entfällt. Wichtige Gene der Replikation (*rep*) und der Produktion von Kapsidproteinen (*cap*), sowie E1A, E1B, E2A, E4, und VA RNA, die für eine effiziente Genexpression und Verpackung erforderlich sind, wurden auf einem oder zwei Helfer-Plasmiden untergebracht. Die E1 Gene wurden z.T sogar in Zelllinien wie AAV 293, 293 oder HeLa (123) integriert. Die Entwicklung solcher Systeme, die darauf abzielt, so einfach und effektiv wie möglich hohe rAAV-Titer herzustellen, ermöglichte es, eine rAAV DNA mit dem gewünschten Gen durch Infektion unter gleichzeitigem Verlust ihrer Replikationsfähigkeit in Zellen zu schleusen und eine stabile Genexpression über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten (Abb. 3.6.1).

Das AAV *helper-free* System der Firma Stratagene enthält verschiedene Plasmide, um rekombinante AAV-2 Vektoren für gentherapeutische Zwecke herzustellen. Das geschieht durch Kotransfektion eines Vektor-Plasmids (pAAV-IHRES-hrGFP bzw. pAAV-hrGFP) mit zwei Helferplasmiden (pAAV-RC mit *rep* und *cap* und pHelper mit E2A, E4 und VA). Das Vektor-Plasmid enthält eine Transgen-Expressionskassette und verfügt über die ITR-Regionen von AAV-2, so dass die dazwischen liegende DNA in AAV-Viruspartikel verpackt werden kann. Allerdings hat ein rAAV nur eine Verpackungskapazität von ca. 5 kb.

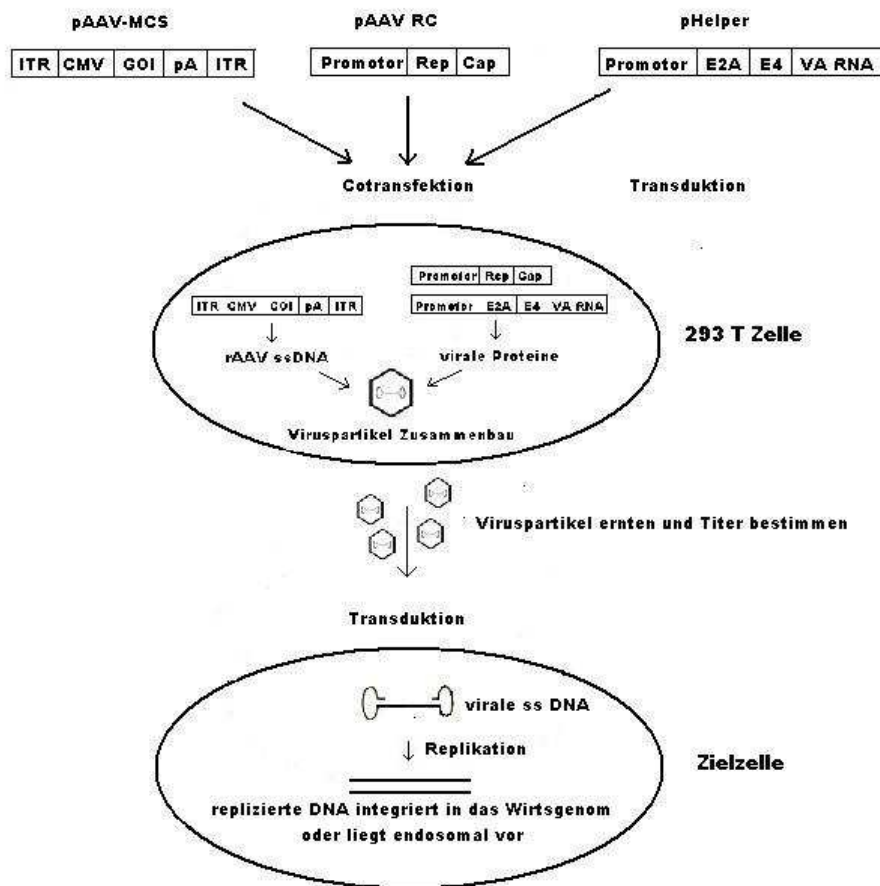


Abb. 3.6.1: Herstellungsschema eines rAAV mit Hilfe des AAV helper-free Systems

Nach Cotransfektion wird das rekombinante Plasmid (z.B. pAAV-hrGFP) inklusive der shRNA-Kassette (>hier *gene of interest*) mit Hilfe der Helper-Plasmide zu einem Viruspartikel verpackt und ist genau einmal in der Lage eine Zielzelle zu infizieren. Die virale DNA wird durch Rezeptor-vermittelte Endozytose ins Zellinnere geschleust. Dort wird das einzelsträngige Virusgenom repliziert und gegebenenfalls ins Wirtsgenom integriert oder verbleibt als endosomaler DNA-Strang in der Zelle.

Foamyvirale Vektoren haben mit ca. 10 kB eine größere Aufnahmekapazität (124). Sie gehören zur Familie der *Retroviridae*. Unter diesen haben sie mit 11 kb das größte Genom (125), und gleichzeitig das genetisch stabilste (126). Sie teilen mit den klassischen Retroviren die Aufteilung des Genoms in die Gene *gag*, *pol* und *env* und eine weitere Untergruppe kleiner Gene (*bel 1-3*) (127). Ihre Replikationsstrategien ähneln denen der Hepadnaviren, zu denen u.a. das humane Hepatitis-B Virus (HBV) gehört (128). Foamyviren sind nicht humanpathogen und kommen beim Menschen nur als Zoonose vor (129). Für die Gentherapie lassen sich Foamyviren vor allem deshalb gut einsetzen. Außerdem integrieren sie die einzubringende DNA stabil in das Wirtsgenom (130) und infizieren verschiedenste Zelltypen (131) wie beispielsweise auch hämatopoetische Stammzellen (132). Obwohl die

Integration ins Genom sequenzunabhängig ist, werden CpG-Inseln in der Nähe des Transkriptionsstarts bevorzugt (133). Foamyvirale Vektoren transduzieren bevorzugt sich teilende Zellen, können aber auch stationäre Zellen mit einer niedrigeren Effizienz transduzieren (134), wodurch zum Beispiel eine Kurzzeitbehandlung des zentralen Nervensystems möglich wird (130). Die Vektoren tragen die *cis*-agierenden Sequenzen für die RNA-Dimerisierung, die Verpackung, die reverse Transkription, die Provirusintegration und die transgene Expression sowie Expressionskassetten mit internen Promotoren und sind ansonsten frei von den übrigen viralen Genen. Die zur Verpackung notwendigen Gene befinden sich auf sogenannten Verpackungsplasmiden (*gag*, *pol*, *env* in *trans*).

3.7 Zielsetzung der Arbeit

3.7.1 Untersuchung der immunstimulatorischen Effekte von Neuromelanin (NM) auf dendritische Zellen und deren Bedeutung in der Pathogenese von Parkinson

Um eine immunogene Verwicklung von Neuromelanin in die Pathogenese von *morbus parkinson* und die Möglichkeit einer von NM verursachten Autoimmunität zu untersuchen, sollte geklärt werden, ob extrazelluläres Neuromelanin dendritische Zellen aktiviert und dadurch der Auslöser für eine adaptive Immunantwort sein könnte. Das synthetische Dopaminmelanin DAM wurde, wegen seiner strukturellen Ähnlichkeit zu NM, dazu benutzt die Rolle des Melaningerüsts zu untersuchen.

3.7.2 Klonierung eines hIDE-exprimierenden AAV-Vektors zur Degradierung von A β

Mit dem *AAV helper-free* System sollte ein rAAV-hIDE-Vektor, der für gentherapeutische Ansätze verwendbar ist, hergestellt und auf seine Funktion sowie Spezifität hin untersucht werden.

4. Material

4.1 Bakterien

<u>Stamm</u>	<u>Eigenschaft</u>	<u>Bezugsquelle</u>
E.coli Top 10	chemisch kompetent	AG Scheller
E.coli DH5α	chemisch kompetent	AG Scheller

4.2 Primer und Oligonukleotide

Bezeichnung	Basensequenz in 5`-3`Reihenfolge	Firma
hIDE SacII-Kozak-fwd	CATCCGCGGACCATGCGGTACCGGCTAGCGTG	Sigma
hIDE XbaI rev	CATTCTAGATCAGAGTTTGCAGCCATGAAC	Sigma
mRFP Cpol fwd	CATCGGACCGGGATCCGCCCTCTCCCTCC	Sigma
mRFP Cpol rev	CATCGGACCGTTAGGCGCCGGTGGAGTGGC	Sigma
hAPP Kozak SacII fwd	CATCCGCGGACCATGCTGCCCGTTTGGGCACTG	Sigma
hAPP-XbaI-stop-Flag-ruc	CATTCTAGACTACTTATCGTCGCATCCTTGTAAATCGTTCTGCATCTGCTCAAAG	Sigma
pAAV_fw_1014	CAGCTCCTGGAGCAGGGAG	Sigma
pAAV_fw_967	TCTCAGAAAGCTCCTGGCTCC	Sigma
pAAV_rv_XbaI	GCTCTAGATGCTTTAGCAGGCTCTTTTCG	Sigma
pAAV_rv_AccIII	GTGTCCGGAGATCCAGACATGATAAG	Sigma
pAAV_MCS_fw	CTAGACTCGAGAGCGCTAAGCTAGCGTTTAAACGAATTCAAGGATCCGCAAGCTTT	Sigma
pAAV_MCS_rv	CTAGAAAGCTTGC GGATCCTTGAATTCGTTTAAACGCTAGCTTAGCGCTCTCGAGT	Sigma
Sequenzierung AAV-Hin2	ACCTTGGCCTCCCAAATTGC	Sigma
Sequenzierung AAV-Ruc2	GCAGAGAGGGAGTGGCCAAC	Sigma
hAPP ruc XbaI histag	CATTCTAGACTAGTGGTGATGGTGATGATGTTCTGCATCTGCTC	Sigma
hIDE hin 381-400	CAGCCAGTTTCTCAGTGAGC	Sigma
hIDE hin 855-874	GCCAGAATTTCTGAACACC	Sigma
hIDE hin 1335-1354	CCTAGAAGAGGTGCTCACAG	Sigma
hIDE hin 1775-1795	TGGCCTATTTGTACCTTGAGC	Sigma
hIDE hin 2256-2275	TGCTCATACCAAACCTCTCC	Sigma
hIDE hin 2702-2723	CTGCTGAGTGTGCTAAACTG	Sigma

Bezeichnung	Basensequenz in 5´-3´Reihenfolge	Firma
hIDE rev 497-478	GCAAACCTGTCTAGGGCACC	Sigma
hIDE rev 1028-1009	GGACCTTCATGCCCAATGAG	Sigma
hIDE rev 1497-1477	CTGGGTTCCATACCACTCTTC	Sigma
hIDE rev 2026-2006	CAGCCCGGAAATTGTTAAGAG	Sigma
hIDE rev 2498-2479	ACGATATAGCCCAACTGCTC	Sigma
Seq hAPP fw1	ATTAAGTTGGGTAACGCCAGG	Sigma
Seq hAPP fw2	CATGAATGTCCAGAATGGGAAG	Sigma
Seq hAPP fw4	AAGAAGAAGCCGATGATGACG	Sigma
Seq hAPP fw5	CAACCGGAACAACCTTTGACAC	Sigma
Seq hAPP fw6	GAAGCAGCCAACGAGAGACAG	
Seq hAPP fw7	CGCATGAATCAGTCTCTCTCC	Sigma
Seq hAPP fw8	CGAAGTTGAGCCTGTTGATGC	Sigma
Seq hAPP fw9	CATCATGGTGTGGTGGAGGTTG	Sigma
Seq hAPP rev1	ATGACCATGATTACGCCAAGC	Sigma
Seq hAPP rev2	CCCACATCTTCTGCAAAGAAC	Sigma
Seq hAPP rev3	ACTTCATCCTGAATCTCCTCG	Sigma
Seq hAPP rev4	ACGTTCTGCCTCTTCCCATTCC	Sigma
Seq hAPP rev5	GGCTTCTTCGTAGGGTTCCTC	Sigma
Seq hAPP rev6	CAAACACCAACTAAGCAGC	Sigma
hAPP ruc XbaI histag	CATTCTAGACTAGTGGTGATGGTGATGATGGTTCTGCATCTGCTC	Sigma
pAAV_fw_XbaI	GCTCTAGAGCCATGTCTGCCCGTATTTTC	Sigma

4.3 Plasmide

<u>Name</u>	<u>Eigenschaft</u>	<u>Bezugsquelle</u>
BF014	Foamyvirales Plasmid	<u>Bianca Fries</u>
BF014-hAPPsw-FLAG	humanes APP mit schwedischer Mutation	
BF014-hAPPwt-FLAG	(sw) oder Wildtyp (wt) und FLAG-Tag	
BF014-hAPPsw-HisTag	oder HisTag über Sac II und Xba I	
BF014-hAPPwt-HisTag	einkloniert	selbst hergestellt
Gag	Foamyviraler Vektor	Bianca Fries
Pol		Bianca Fries
Env		Bianca Fries
pAAV -hrGFP	verfügt über ITR-Sequenzen von AAV 2 und exprimiert GFP unter Kontrolle eines CMV-Promotors	Stratagene
pAAV-Helper	exprimiert AAV 2 E2A, E4 und VA Proteine	Stratagene
pAAV-hIDE	hIDE wurde über XhoI in MCS von	Patrick Neuenhöfer

pAAV-mRFP-hIDE	pAAV-MCS ligiert entspricht pAAV-hIDE mit mRFP über BlnI und PmeI vor R-ITR ligiert	selbst hergestellt
pAAV-RC	exprimiert AAV 2 rep und cap Proteine	Stratagene
pAAV-LacZ	entspricht pAAV-hrGFP mit shAPP sw und U6 Promotor	Stratagene
pmaxGFP	Kontrollvektor, exprimiert GFP	Amaxa
SJ03	foamyviraler Vektor mit mRFP	<u>Stefanie Jaitner</u>
WOF-02	aus pAAV-LacZ wurde LacZ entfernt und eine MCS eingefügt	<u>Konrad Weber</u> <u>Uwe Oberländer</u> <u>Bianca Fries</u>

4.4 Enzyme

<u>Enzym</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Bam HI	Fermentas
Bpu 1102 I	Fermentas
Cpo I	Fermentas
Dpn I	Fermentas
Ear I	NEB
Eco 57I	Fermentas
Eco 91I	Fermentas
Eco RI	Fermentas
FastAP	Fermentas
GolgiStop™	BDsciences
Hind III	Fermentas
Not I	Fermentas
Pme I	Fermentas
Pfu-DNA-Polymerase	Peqlab
Pwo-DNA-Polymerase	Peqlab
Pvu II	NEB
Rnase	Fermentas
RsrII (CpoI)	NEB
SacII	Fermentas
Xba I	NEB
Xho I	Fermentas
Taq-Polymerase Mix	NEB

4.5 Puffer und LösungenMinipreparationslösungen

L6:	100 ml	0,1 M Tris-HCl, pH 6,4
	8,8 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	13,2 ml	H ₂ O
	2,6 ml	Triton X100
	120 mg	Guanidin

Lösung kühl und dunkel lagern! Guanidin ist lichtempfindlich!

Wasch:	10 ml	5 M NaCl
	5 ml	1 M Tris-HCl, pH 7,5
	2,5 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	250 ml	H ₂ O
	250 ml	Ethanol

Puffer I:	5 ml	1 M Tris-HCl, pH 7,5
	2 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	1 ml	RNase 10 mg/ml
	100 ml	H ₂ O

Lagerung im Kühlschrank! Haltbarkeit der RNase!

Puffer II:	0,2 N	NaOH
	1% (w/v)	SDS
	4 ml	5 N NaOH
	5 ml	20 %iges SDS
	100 ml	H ₂ O

Puffer III:	3 M	Kalziumacetat, pH 5,5
-------------	-----	-----------------------

Diatomeen:	10 g	Diatomeenerde
	50 ml	H ₂ O
	500 µl	HCl konzentriert

Phosphate Buffered Saline (PBS):

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	4,3 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM
CaCl ₂	1,5 mM
MgCl ₂	1,0 mM

aq. bidest.

Saponin -Puffer:

Saponin	0,33 % (w/v)
BSA	1 % (w/v)

in PBS

Tris –Acetat Puffer (TAE) 50x:

Tris	2,0 M, pH 8,0
EDTA	0,1 M
CH ₃ COOH	1,0 M

aq. bidest.

Natriumbutyratlsg. 50x:

Natriumbutyrat	500 mM
----------------	--------

in PBS
sterilfiltrieren mit 0,22 µm Filter

TE-Puffer:

Tris	10 mM, pH 8,0
EDTA	0,5 mM

aq. bidest.

SOC-Medium.:

KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

in 1 xLB-Medium

sterilfiltrieren mit 0,22 µm Filter

4.6 Western-Blot

SDS-Probenpuffer:

Tris	50 mM, pH 6,8
SDS	4% (w/v)
Glycerin	12 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	2 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01% (w/v)
aq. bidest.	

Laufpuffer:

Tris	25 mM
Glycin	200 mM
SDS	0,1 % (w/v)
aq. bidest (pH stellt sich auf 8,3 ein)	

Transferpuffer:

Tris	48 mM
Glycin	39 mM
SDS	0,037 % (w/v)
Methanol	20 % (w/v)
aq. bidest.	

Waschpuffer:

Tween 20	0,1% (w/v)
in PBS	

Blockingpuffer:

Tween 20	0,1% (w/v)
Milchpulver	5% (w/v)
in PBS	

4.7 Antikörper

<u>Name</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Anti-GAPDH, Polyclonal	Imgenex
Anti-hIDE	BDbiosciences

Anti-biotin, HRP-linked Antibody	Cell signaling
APC Rat anti-Mouse CD86	BDbiosciences
APC Mouse Anti-Human CD86	BDbiosciences
FITC Hamster Anti-Mouse CD11c	BDbiosciences
FITC Mouse Anti-Human HLA-DR	BDbiosciences
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate	BioRad
PE Rat Anti-Mouse IFN- γ	BDbiosciences
PE Rat Anti-Mouse I-A/I-E	BDbiosciences
PE Mouse Anti-Human CD11c	BDbiosciences

4.8 Zelllinien

<u>Name</u>	<u>Eigenschaft</u>	<u>Bezugsquelle</u>
AAV 293	Zelllinie zur Produktion von rekombinanten AAV Viren (rAAV); abgeleitet von HEK 293; exprimieren E1 in trans	Stratagene
HT1080	humane Fibroblastensarkom Zellen; empfohlen zur Infektion mit AAV	Stratagene
293T		ATCC
<i>human melanoma cell line</i> , MEL-P	transgene Zelllinie, exprimiert GM-CSF	AG Lutz

4.9 Blutproben

Kaninchenserum	immunoGlobe
Blutzapfen von humanen Spendern	Transfusionsmedizin Uni-Klinik Würzburg

4.10 Versuchstiere

C57BL/6Mäuse	Charles River
BALB/c	Charles River

4.11 Reagenzien für die Zellkultur

<u>Substanz</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Fötale Kälberserum (FCS)	Linearis
L(+)-Glutamin	Medienküche
Dopaminmelanin (DAM)	Manfred Gerlach

DMEM	Invitrogen
mit L–Glutamin; 4,5 g/l Glucose; 110 mg/l Sodium Pyruvat	
GM–CSF für mHSC	AG Lutz
Human IL-4	Milteny Biotec
Leukine® sargramostim (GM–CSF für hPBMC)	Bayer
Neuromelanin (NM; aufgereinigt)	Thomas Elpel
Neuromelanin (NM; aufgereinigt und Proteinase K behandelt)	Thomas Elpel
MEM	Medienküche
RPMI-1640	Invitrogen, Germany

4.12 Kits

<u>Kit</u>	<u>Bezugsquelle</u>
AAV <i>helper-free</i> System	Stratagene
BigDye™ Terminator 1.1	Biosystems
E –Toxate	Sigma Aldrich
GenElute™ Gel Extraction	Sigma Aldrich
GenElute™ PCR Clean-Up	Sigma Aldrich
NucleoBond PC 500	Macherey Nagel
Mouse TNF-alpha ELISA Kit, OptEIA™	BDbiosciences
Mouse IL-6 ELISA Kit, OptEIA™	BDbiosciences

4.13 Chemikalien

<u>Substanz</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)	Roth
Agar	Sigma
Agarose	Eurogentec
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	BioRad
Ampicillin	Gibco, BRL
Biotin Standard	Cell signaling
Bradfordkonzentrat	BioRad
Bromphenolblau	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth
Diatomeenerde	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumcarbonat	Merck
Dinatriumhydrogencarbonat	Merck

DNA–Probenpuffer (6x)	Fermentas
dNTPs	Fermentas
ECL (Enhanced chemilumineszenz)	Pierce
EDTA	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Formaldehyd (37 %ige wässrige Lösung)	Sigma
Glucose	Sigma
Glycerin	Roth
Guanidin (Thiocyanatsalz)	Sigma
[³ H]methyl-thymidine	Amersham
Kaliumchlorid	Roth
LB Broth Base	Invitrogen
Lipopolysaccharide	Sigma
Magnesiumchlorid	Roth
Magnesiumsulfat	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Roth
Milchpulver	Töpfer
Natriumbutyrat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumhydroxydplättchen	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
PEI (Polyethylenimin, linear 25 kD)	Polyscience
Penicillin/Streptomycin	Gibco, BRL
Phenol–Chloroform-Isoamylalkohol	Appllichem
Ponceau S	Sigma
Protein Standard (Page Ruler)	Fermentas
2-Propanol	Roth
Salzsäure	Merck
Tetramethyldiamin (TEMED)	BioRad
Tween-20	Sigma
Tris	Roth
Trypanblau	Sigma

4.14 Verbrauchsmaterialien

<u>Material</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Blottingpapier, dünn (0,37 mm, 190 g/cm ²)	Hartenstein
Blottingpapier, dick (1,4 mm, 550 g/cm ²)	Hartenstein
Einmalhandschuhe	Semperit
Einmalpipetten (1 ml, 2 ml)	Falcon
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml)	Greiner
Einmalsieb (cell strainer ; 70 µm)	BDsciences
FACS-Röhrchen	Multimed
Glasfiber Flitermat A für 1450 Microplate Counter	Wallac
Glaspipetten (10 ml)	Brand
Kanülen (27G)	Neoject
Kryoröhrchen (2 ml)	Nalgene
Miniaturreaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Saarstedt
Objektgläschen	Marienfeld
Objektträger	Marienfeld
Petrischalen 10 cm	Nunc
Petrischalen 6 cm	Nunc
Pipettenspitzen (weiß, gelb, blau)	Gilson
Polyacrylamidgele (10%)	Invitrogen
Rührfische	Roth
Sample bags für 1450 Microplate Counter	Wallac
sterile Spritzen	Primo
Sterilfilter	Schleicher & Schüll
Zellkulturflaschen (200 ml)	Greiner
Zellkulturflaschen (600 ml)	Nunc
Zellkulturplatten 96-Loch Flachboden	Greiner
Zellkulturplatten 6-Loch Flachboden	Falcon, Becton & Dickinson
Zellkulturplatten 12-Loch	Corning
Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm)	Nunc
Zellschaber	Falcon, Becton & Dickinson
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner

4.15 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Bezugsquelle</u>
1450 Microplate Counter	PerkinElmer
Arbeitswerkbank (BSB 4A)	Gelaire
Bakterienbrutschrank (Incubat)	Hartenstein
Bio Image Reader (LAS -3000)	Fuji Film
Blottingkammer	Institutswerkstatt
Brutschrank für Zellkultur, CO ₂ -begast	Heraeus
Durchflußzytometer (FACScan)	Becton & Dickinson
Elektrische Wippe	Hoefer
ELISA-Reader	Tecan
Fluoreszenzmikroskop (DMIRES2)	Leitz
Flüssigstickstoffbehälter	Cryosystem
Gefrier- und Kühlschränke	Bosch
Gelkammer für Agarosegele	Institutswerkstatt
Gel Imager	Intas
IH-110 Harvester	Inotech
LSM 510 Meta Confocal Microscope	Zeiss
Magnetrührer	Heidolph
Mikroskop (Fluorovert)	Leitz
Mikroliterpipetten	Gilson
Mikrowelle (Powerwave ER-200)	Brother
MyCycler	BioRad
Netzgerät (3600 XI)	BioRad
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
pH-Meter	Schott
Photometer (Biophotometer 6131)	Eppendorf
Pipettierhilfe, elektrisch	Integra
Plattenphotometer (Spectra)	Tecan
Schüttelinkubator (Certomat -H)	Sartorius
Thermoblock (TDB 120)	Hartenstein
Tischzentrifuge (5417C)	Eppendorf
Vakuumkammer	Werkstatt Institut
Vakuumpumpe (VP100)	Savant
Vortexer	Hartenstein

Waage (SBA 51)

Wasserbad (WTH -500)

Zentrifuge groß (Evolution RC)

Zentrifuge klein (Multifuge 1sr)

Scaltec

Hartenstein

Sorval

Heraeus

5. Methoden

5.1 Bakterien

5.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen

Für Plasmidpräparationen wurden 2 ml (Mini) oder 150 ml (Maxi) Übernachtskulturen (ÜK) angelegt. Für eine Mini-ÜK wurde eine gut sichtbare, einzelne Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von den Agarplatten gepickt, in 2 ml LB-Medium (100 mg/ml Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37°C und 200 rpm im Schüttler inkubiert. Eine Maxi-ÜK wurde mit 100 µl einer Mini-ÜK angeimpft.

5.1.2 Herstellung von Agarplatten

Zur Herstellung von ampicillinhaltigen Agarplatten wurden 28 g LB Broth Base (Invitrogen) und 16 g Agar unter Rühren in 1 l aqua dest. gelöst. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert. Nach Abkühlung auf 60°C wurde 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) dazugegeben, einige Male geschwenkt und die Lösung auf Bakterienröhrchen verteilt. Nach dem Erstarren der Agarose wurden die Platten bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

5.1.3 Anlegen von Glycerinkulturen

Aus einer Maxi-ÜK wurden 850 µl Bakterienkultur zusammen mit 150 µl Glycerollsg. in ein Kryoröhrchen gegeben und in einem Eis-Ethanolbad schockgefroren. Die Glycerinkulturen werden bei -80°C gelagert.

Glycerollösung: 50% Glycerol
 50% LB⁺-Medium

5.1.4 Hitzeschock-Transformation von Bakterien

Hierfür wurden 100 µl chemisch kompetente *E.coli Top10* (AG Scheller) auf Eis aufgetaut und mit 10 µl eines Ligationsansatzes in einem Eppendorfgefäß 20 min auf Eis inkubiert. Nach 1 min erfolgte ein Hitzeschock von 42°C und die Zellen wurden für weitere 2 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde ihnen 400 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und sie wurden für 1 h in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension 5 min bei 8000 rpm abzentrifugiert und 350 µl des Überstandes wurden verworfen. Das Pellet wurde im restlichen Medium resuspendiert und mit Hilfe eines sterilen Drigalski-Spatels auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden

über Nacht invers bei 37°C in den Brutschrank gelegt. Ab dem nächsten Morgen wurden sie bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 PCR

Mit einer PCR wurden für diese Arbeit Plasmidabschnitte von ~3000 bp amplifiziert, wobei über das Primerpaar spezifische Schnittstellen für eine zielgerichtete Ligation eingeführt wurden.

Template (Plasmid) und Primer wurden in einer Konzentration von 100 ng/µl eingesetzt. Die *Annealing* -Temperatur wurde so gewählt, dass sie 3-4°C unter der des Primers mit der geringsten Schmelztemperatur lag.

Reaktionsansatz 50 µl:

1 µl Pwo- oder Pfu-DNA-Polymerase
1,5 µl Primer vorwärts
1,5 µl Primer rückwärts
1 µl Template (100 -500 ng)
1 µl dNTP (10 mM)
5 µl 10 x Reaktionspuffer
39 µl PCR-H₂O (Eppendorf)

Das folgende PCR-Programm wurde dann in einem Thermocycler (MiniCycler PTC-1152; BioRad) durchgeführt. Dabei wurden die Schritte 2.-4. in 25 Zyklen wiederholt. Nach der Reaktion wurden 10 µl des PCR-Ansatzes zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen.

1. Initiale Denaturierung	95°C	5 min
2. Denaturierung	95°C	45 sec
3. Annealing	50 -72°C ¹⁾	45 sec
4. Elongation	68°C oder 72°C	2 -6 min ²⁾
5. Finale Elongation	68°C oder 72°C	5 min
6. Lagerung	4°C	∞

¹⁾ Zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt

²⁾ Elongationszeit richtet sich nach der Prozessivität der verwendeten Polymerase.

Pwo-DNA-Polymerase (68°C) 1500 Nukleotide/min

Pfu-Polymerase (72°C) 500 Nukleotide/min

5.2.2 Gelelektrophorese mit Agarosegelen

Die Gelelektrophorese wurde benutzt um DNA-Fragmente ihrer Größe nach auf zu trennen und ihre Länge bzw. Konzentration anhand eines Standards (MassRuler, Fermentas) zu bestimmen. Für ein 1-2 % Agarosegel (w/v) wurden 1-2 g Agarose abgewogen und in 100 ml 1 x TAE-Puffer durch 2 minütiges Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurden 6 µl Ethidiumbromid (1 µg/µl) zugegeben, geschwenkt und die Agarose in einen Plexiglasschlitten (Institutswerkstatt) gegossen. Das polymerisierte Gel wurde in eine Gelkammer (Institutswerkstatt) mit 1 x TAE-Puffer gelegt und mit Proben beladen. Üblicherweise mit 6 oder 12 µl inklusive 6 x Probenpuffer. Die Auftrennung erfolgte bei 6 V/cm für 60-90 min. Danach wurden die Gele unter UV-Licht (Gel Imager; INTAS) fotografiert und analysiert.

5.2.3 Präparative Aufreinigung von Plasmid DNA aus Bakterien

Folgende Aufreinigungsmethoden beruhen auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Durch Zugabe einer SDS- und NaOH-haltigen Lösung werden die Zellen lysiert und Proteine, chromosomale sowie plasmidale DNA denaturiert. Die anschließende Neutralisation des pH-Werts durch Natrium- bzw. Kaliumacetat führt zu einer schnellen Renaturierung der Plasmid

DNA, welche dadurch in Lösung bleibt und sehr leicht durch Zentrifugation oder Filtration gewonnen und anschließend mit Isopropanol präzipitiert werden kann.

5.2.3.1 Mini-Präparation mit Diatomeenerde

Dazu wurde ~1 ml einer Mini-ÜK in ein steriles Eppendorfgefäß gekippt und 2 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Dekantieren verworfen und das Pellet in 150 µl Puffer I durch vortexen resuspendiert. Anschließend wurden zuerst 150 µl Puffer II und danach 150 µl Puffer III hinzugefügt und dazwischen vorsichtig geschüttelt. Die Ansätze wurden 15 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert um Zelltrümmer, ausgefallene Proteine und chromosomale DNA zu entfernen. Währenddessen wurde für jeden Ansatz ein neues Eppendorfgefäß vorbereitet in welches jeweils 900 µl L6 und 50 µl Diatomeenlösung pipettiert wurde. Die Überstände der Proben wurden zu den L6–Diatomeenlösungen gegeben und für 5 min bei RT inkubiert, wobei jede Minute kurz aufgeschüttelt wurde. So wurde der DNA Zeit gegeben an die Kiesegelmatrix zu binden. Eine Vakuumkammer wurde vorbereitet indem auf die Öffnungen eine der Proben entsprechenden Anzahl von Silica–Gel-Filtersäulen mit 5 ml Spritzen (ohne Kolben) aufgesteckt wurden. Die Proben wurden in die Spritzen gefüllt und durchgesaugt. Es wurde mit je 5 ml Waschlösung nachgespült und die Säulen in frische Eppendorfgefäße gegeben. Diese wurden für 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert um die Waschlösung zu entfernen. Anschließend wurden die Säulen in neue Eppendorfgefäße gesteckt und die DNA mit je 50 µl TE–Puffer in einem letzten Zentrifugationsschritt (1 min bei 13.000 rpm) eluiert.

Die Methode wurde bei allen preparativen DNA–Isolierungen für Klonierungen angewendet wenn das Plasmid größer als 10 kb war, da sich mit GenElute™ Gel Extraction-Kits nur Plasmide bis 10 kb aufreinigen lassen.

5.2.3.2 Maxi-Präparation von Plasmid DNA

Maxi-Präparationen wurden mit dem Kit *NucleoBond PC500* (Macherey Nagel) durchgeführt. 150 ml einer Bakterienkultur wurden für 15 min bei 4000 rpm absedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 12 ml Puffer S1 (RNAse) resuspendiert. Nach Zugabe von 12 ml des Puffers S2 (SDS und NaOH) wurde 6-8-mal geschwenkt und 2-3 min gewartet. Danach wurden 12 ml Puffer S3 (KaAc) hinzugegeben, der Zentrifugenbecher wurde vorsichtig geschwenkt und 5 min auf Eis aufbewahrt. In der Zwischenzeit wurde ein Faltenfilter vorbereitet, auf einen Erlmeyerkolben gesetzt und mit 6 ml sterilem ad befeuchtet. Das Lysat wurde in den Filter gegeben und der Durchfluss im Kolben aufgefangen. Eine chromatographische Anionenaustauschsäule (AX 500, Macherey Nagel) wurde mit 6 ml des

Puffers N2 äquillibriert und der aufgefangene Durchfluss aus dem Kolben auf die Säule gegeben. Nachdem die Säule durchgelaufen war, wurde mit 32 ml des Puffers N3 gewaschen. Die Säule wurde auf ein 50ml Falcon Röhrchen gesetzt und die Plasmid DNA mit 15 ml Puffer N5 eluiert. Die in N5 in hoher Konzentration enthaltenen Cl⁻ Ionen verdrängen die negativ geladene DNA von der Säule (Anionenaustausch).

Die Plasmid DNA wurde mit 10 ml Isopropanol gefällt, 10 min bei RT stehen gelassen und bei 4000 rpm 1 h pelletiert. Das Isopropanol wurde vorsichtig abgekippt und das Pellet mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Ethanol wurde abgesaugt und das Pellet für 30 min zum trocknen in den Brutschrank gestellt. Schließlich wurde es in 50 -200 µl nucleasefreiem H₂O aufgenommen und mit einem Photometer (Biophotometer 6131; Eppendorf) die DNA Konzentration bestimmt.

Buffer S1:

- 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8.0

Buffer S2:

- 200 mM NaOH, 1% SDS

Buffer S3:

- 2.8 M KAc, pH 5.1

Buffer N2:

- 100 mM Tris, 15% ethanol, 900 mM KCl, 0.15% Triton X-100, adjusted to pH 6.3 with H₃PO₄

Buffer N3:

- 100 mM Tris, 15% ethanol, 1.15 M KCl, adjusted to pH 6.3 with H₃PO₄

Buffer N5:

- 100 mM Tris, 15% ethanol, 1 M KCl, adjusted to pH 8.5 with H₃PO₄

5.2.4 PCR–Purification und Gel-Extraktion

Zur Reinigung verdauter Vektoren und PCR–Produkte wurden die beiden Kits GenElute™ Gel Extraction und GenElute™ PCR Clean-Up von Sigma–Aldrich verwendet. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren

5.2.5 Phenolreinigung von DNA

Für eine Sequenzierung wurden Mini–Präparationen einer Phenol–Chloroform Extraktion unterzogen, um störende Proteinverunreinigungen zu minimieren. Hierzu wurde zunächst 1/10 Vol. 3M Natriumacetat (ph 5,2) zur DNA–Lösung gegeben. Anschließend wurde 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) dazu pipettiert und 30 sec gevortext. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 10000 g für 5 min. Die obere wässrige DNA-haltige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und der Phenolschritt wiederholt. Schließlich wurde die DNA mit 98%igem Ethanol gefällt und für 30 min ins

Tiefkühlfach -20°C gelegt. Die gefällte DNA wurde bei 10000 g für 5 min präzipitiert, der Überstand abgekippt und mit 500 μl 70 %igem Ethanol gewaschen. Es wurde nochmal wie zuvor zentrifugiert und das Ethanol mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Das Pellet wurde zum trocknen 30 min in den Brutschrank gestellt und in 50 μl H_2O aufgenommen.

5.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration einer DNA Probe wurde mit einem Photometer (Biophotometer 6131, Eppendorf) ermittelt. Meist wurde die Probe 1:20 oder 1:100 verdünnt, in UV durchlässige Küvetten (Brand) pipettiert und bei 260 nm vermessen. Dazu wurde auf dem Bedienungsfeld des Photometers unter „Method“ der Knopf „dsDNA“ gedrückt. Anschließend wurde unter dem Menüpunkt „Dilution“ die gewünschte Verdünnung eingegeben (z.B. 5 μl Probe + 95 μl Diluent = 1:20) und mit „Enter“ bestätigt. Betätigung der Knöpfe „Blank“ bzw. „Sample“ startete die Messung. Daraufhin wurde die DNA –Konzentration direkt in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ausgedruckt. Auch die Verunreinigungen durch Proteine (260/280–Wert) und RNA (260/230–Wert) wurden aufgezeichnet.

5.2.7 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Mini-Präparationen wurden zur Kontrolle in einem 10 μl Ansatz verdaut. Hier wurde meist ein 10 -20 facher Mastermix für die entsprechende Zahl an Minis angesetzt.

1 μl Restriktionspuffer (10x)
0.2 μl Restriktionsenzym
3 μl DNA aus Miniprep
ad 10 μl H_2O

Bei Maxi-Präparationen wurde zur Überprüfung folgender Ansatz verwendet.

1 μl Restriktionspuffer (10x)
0.5 μl Restriktionsenzym
(evtl. 0.5 μl 2. Restriktionsenzym)
1 μl Plasmid (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
ad 10 μl H_2O

Alle Plasmide für eine Ligation wurden in einem 20 μl Ansatz verdaut.

2 μl Restriktionspuffer (10x)
1 μl Restriktionsenzym
(evtl. 1 μl 2. Restriktionsenzym)

5-10 µg Plasmid (1 µg/µl)
ad 20 µl H₂O

PCR-Ansätze wurden mit DpnI verdaut. DpnI ist ein Enzym das nur methylierte DNA schneidet und in den meisten Plasmiden über viele Erkennungsstellen verfügt. Durch die Zerstückelung der Ursprungsplasmids mit DpnI wurde dessen Replikation bei der Klonierung vermieden. Dazu wurde 1 µl DpnI in 20 µl des PCR-Ansatzes gegeben.

Anschließend wurden die PCR-Produkte zum aktivieren der Schnittstellen in einem 25 µl Ansatz einer Restriktion unterzogen.

2,5 µl Restriktionspuffer (10x)
1 µl Restriktionsenzym
(evtl. 1 µl 2. Restriktionsenzym)
20 µl gereinigter PCR -Ansatz
ad 25 µl H₂O

Verdaut wurde immer bei 37°C und zwar über Nacht im Inkubator oder im Wasserbad für mindestens 3 h.

5.2.8 5'-Dephosphorylierung von Plasmid DNA

Um eine Religation eines vermeidlich unvollständig verdauten Plasmids zu verhindern, wurden 5'-Enden mit dem Enzym FastAP (Fermentas) behandelt. Da das Enzym in jedem erhältlichen Puffer des Herstellers funktioniert, wurde einfach 1 µl FastAP nach einem Verdau zu dem Ansatz gegeben und dieser weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde im Heizblock bei 85°C für 15 min deaktiviert und über eine Gel-Extraktion oder eine PCR-Reinigung entfernt.

5.2.9 Ligation

Zur semiquantitativen Bestimmung der DNA-Konzentration von Vektor und Insert wurden beide zusammen mit einem Größenstandard (MassRuler, Fermentas) auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Durch optischen Vergleich der Bandenstärke mit den bekannten Konzentrationen der Markerbanden konnte die Konzentration der Ligationskomponenten abgeschätzt werden. Durch Kenntnis der genauen Länge von Insert und Vektor wurde aus der Konzentration (in ng/µl) die molare Konzentration (in fmol/µl) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Molare Konzentration (fmol/}\mu\text{l) = } \frac{\text{Konzentration (ng/}\mu\text{l) x } 10^6}{\text{Länge (bp) x 649 (pg/fmol bp)}}$$

Eine weitere Möglichkeit, die für einen Ligationsansatz benötigte Menge an Vektor und Insert zu bestimmen ist die, Reste aus dem Restriktionsansatz als Referenz auf einem Agarosegel mit aufzutragen. Da ein Restriktionsansatz in der Regel 250 ng/μl (>5μg /20 μl) DNA enthält, werden so nach dem Verdau 0,2 μl (>50 ng) und 1,6 μl (>400 ng) als Referenz verwendet. Sofern das Insert auch aus einem Restriktionsverdau stammt, kann man hier genau so verfahren. Bei Inserts aus einem PCR–Ansatz oder einer Annealingreaktion ist das nicht möglich. In einem 20 μl Ligationsansatz wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:4 eingesetzt.

2 μl T4 Ligase-Puffer (10x)

1 μl T4 Ligase

1 Teil Vektor (50-400 ng)

4 Teile Insert

ad 20 μl H₂O

Der Ligationansatz wurde bei 14°C über Nacht oder bei RT für 4 h inkubiert.

5.2.10 Sequenzierungsreaktion

Um fertig klonierte Vektor–Insert–Konstrukte zu überprüfen, wurden diese einer Cycle-Sequencing Reaktion mit einem *BigDye™ Terminator 1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing* Kit unterzogen. Das Prinzip des Kits beruht auf der Kettenabbruchreaktion von Sanger (Sanger et al., 1979) mit der Besonderheit, dass die Didesoxynukleotide des Bigdye mit einem fluoreszierenden Farbstoff (*dye*) versehen sind, der von einer DNA-Sequenziermaschine mit Hilfe eines Lasers detektiert werden kann. Für eine Reaktion in einem 5 μl Ansatz wurden verwendet:

3,3 μl Phenol gereinigter DNA (aus Maxi oder Mini)

0,7 μl Sequenzierprimer (100 ng/μl)

1 μl Bigdye 1.1

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte dann in einem Thermocycler (MiniCycler PTC 1152; BioRad) unter folgenden Bedingungen: Die Aufreinigung und letztendliche Sequenzierung wurde von der hauseigenen Diagnostik übernommen.

Denaturierung	90°C	30 sec
Annealing	50°C	30 sec
Elongation	60°C	4 min
x 25 Cycles		
Lagerung	4°C	∞

5.3 Eukariotische Zellen

Die im Folgenden beschriebenen Methoden gelten für alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien. Kultiviert wurden alle Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator (Hereaus). Alle Zentrifugationsschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, mit 1200 rpm für 3 min. Alle verwendeten Medien und Lösungen wurden auf 37°C vor gewärmt.

Zusätze in den verwendeten Medien:

DMEM:

Penicillin	100 µg/ml
Streptomycin	100 µg/ml
FCS	10% (v/v)

MEM:

Penicillin	100 µg/ml
Streptomycin	100 µg/ml
L(+)-Glutamin	500 µg/ml
FCS	10% (v/v)

RPMI-1640:

Penicillin	100 µg/ml
Streptomycin	100 µg/ml
L(+)-Glutamin	2mM
FCS	10% (v/v)

5.3.1 Einfrieren von Zellen

Eukariotische Zellen wurden in dem für sie geeigneten Medium aufgenommen und gezählt. Die Zellzahl wurde mit einer Mischung aus 10%DMSO/ 40%FCS/ 50% Medium auf 1×10^7 eingestellt und 1 ml sofort in ein bereitgelegtes, mit Bleistift beschriftetes Kryoröhrchen, überführt. Diese wurden in einen *Cryo Freezing Container* gegeben und bei -80°C ü. N. langsam eingefroren, um die Zellschäden durch das Einfrieren gering zu halten. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen für die Langzeitlagerung auf flüssigen Stickstoff gegeben.

5.3.2 Auftauen von Zellen

Es wurden 10 ml Medium in einem 15 ml Falcon vorgelegt. Das Kryoröhrchen mit den bei -80°C in N_2 gelagerten Zellen wurde 1-2 min bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, danach in das vorgelegte Medium gegeben und abzentrifugiert. Das Medium wurde abgekippt und die Zellen in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 75 cm^2 Kulturflasche mit 10 ml frischem Medium transferiert und bei 37°C in einem CO_2 -Inkubator (5% CO_2 in der Atmosphäre) gelegt.

5.3.3 Passagieren von adhärennten Zellen

Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde sofort entfernt und die Zellen durch die Zugabe von 5 ml ATV für 3-5 min bei 37°C trypsinisiert. Sobald alle Zellen abgelöst waren, wurden 5 ml frisches Medium dazugegeben und gut resuspendiert. 9 ml der Zellsuspension wurden verworfen und 1 ml gegebenfalls in einer größeren Kulturflasche mit frischem Medium (14 ml für 75 cm^2 -Flaschen, 29 ml für 250 cm^2 -Flaschen) weiterkultiviert. Passagiert wurde in der Regel zwei Mal wöchentlich. Bei den AAV 293 Zellen immer bei einer Zelldichte von $\sim 50\%$ lag.

Zusammensetzung von ATV:

NaCl	8.0 g
KCl	400 mg
D-Glucose	1,0 g
NaHCO_3	580 mg, pH 7,2-7,4
Trypsin	500 mg
Versen	200 mg
aq. bidest	ad 1l

5.3.4 Zelldichtebestimmung

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dafür wurden die Zellen mit ATV abgelöst und gut resuspendiert. 20 µl Zellsuspension wurden mit Trypanblaulösung im Verhältniss 1 zu 4 verdünnt. Da nur tote Zellen durch Trypanblau angefärbt werden, ermöglichte diese Färbung die Bestimmung der Lebendzelldichte, sowie der Vitalität der Kultur.

Als Vorbereitung zur eigentlichen Zählung wurden Neubauer-Zählkammer und Deckglas gesäubert und anschließend die äußeren beiden Flächen des Objektträgers mit 1-2µl Flüssigkeit benetzt. Dann wurde das Deckglas unter leichtem Druck an die Zählkammer angepreßt, bis sich Newtonsche Ringe bildeten. Durch Pipettieren der Zellsuspension an den Rand zwischen Deckglas und Objektträger wurde die Suspension durch die auftretenden Kapillarkräfte in die Zählkammer hineingesaugt.

Unter dem Lichtmikroskop wurden die in den Großquadraten der Zählkammer liegenden Zellen gezählt. Um den statistischen Fehler zu minimieren wurden mindestens 150-200 Zellen gezählt. Lag die ermittelte Zellzahl darunter, wurde entweder eine geringere Verdünnung der Zellsuspension gewählt, oder es wurde eine weitere Zählkammer beladen und ausgezählt. In der Regel wurde eine Verdünnung um den Faktor 4 (1:3) gewählt.

Der Abstand zwischen Deckglas und Objektträger beträgt 0,1 mm und jedes der Großquadrate hat eine Fläche von 1 mm x 1 mm. Über jedem der Quadrate bildet sich daher ein Volumen von 0,1 mm x 1 mm x 1 mm = 0,1 mm³ oder 0,1 µl. Anhand der pro Großquadrat Q bestimmten Zellzahl N läßt sich daher die Zellzahl pro Milliliter verdünnter Zellsuspension ermitteln. Durch Einbeziehung des Verdünnungsfaktors V bei der Trypanblaufärbung ergibt sich daraus die Zelldichte D (Zellen/ ml) in dem Kulturgefäß.

Man erhält also:

$$D = \frac{N}{Q} \cdot V \cdot 10^4$$

mit

D: Zelldichte in der Kultur in Zellen/ml

N: Zahl der gezählten Zellen

Q: Anzahl der ausgezählten Großquadrate

V: Verdünnungsfaktor der Zellsuspension bei der Trypanblaufärbung

10⁴: Umrechnungsfaktor von Zellen/0,1µl auf Zellen/ml

Beispiel: Bei einer Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblaulösung um den Faktor 4 (25 µl Zellsuspension + 25 µl Trypanblaulösung + 50 µl PBS) werden in 4 Großquadraten insgesamt 216 Zellen gezählt. Daraus ergibt sich eine Zelldichte von $216/4 \times 4 \times 10^4 = 2,16 \times 10^6$ Zellen/ml.

Zusammensetzung der Trypanblaulösung:

Trypanblau	0,1% (v/v)
Ethanol	20% (v/v)
aq. bidest.	

5.3.5 Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Polyethylenimine (PEI) ist ein kationisches Polymer, das durch seine hohe Ladungsdichte Nukleinsäure bindet und komplexiert. DNA-Polykation-Komplexe werden über Endocytose effizient von verschiedenen Zellarten aufgenommen und durch den Protonsponge-Effekt des Polykations vor intrazellulärer Degradierung geschützt.

Der Ablauf einer Transfektion erstreckte sich insgesamt über 4-5 Tage. Am 1.Tag wurden Zellen gezählt und je nach Größe des gewünschten Ansatzes in entsprechenden Wells oder Schalen ausgesät. Am 2. Tag überprüfte man zunächst die Konfluenz der Zellen, die bei ~ 80% liegen sollte, und fuhr mit dem Ansetzen der DNA- bzw. PEI-Lösungen fort. Nachdem diese durch vortexen gründlich vermischt und 30 min bei RT inkubiert worden waren, um Bildung von DNA-PEI-Komplexen zu ermöglichen, wurde der Transfektionsmix vorsichtig auf die mit frischem Medium versorgten Zellen getropft und das Well/ die Schale leicht geschwenkt. Am 3. Tag erfolgte eine Natrium -Butyrat -Induktion um die von Plasmid-CMV-Promotoren gesteuerte Genexpression zu steigern. Nach 6-8 h wurde das Medium gewechselt, d.h. altes durch frisches Medium ersetzt. Am 4. oder 5. Tag wurden die Zellen geerntet, mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS analysiert, und schließlich zur Gewinnung von Proteinen bzw. Viruspartikeln homogenisiert.

Im Folgenden sind die angewendeten Transfektionsansätze tabellarisch zusammengefasst. Von der PEI-Lsg. wurde in der Regel ein Mastermix für alle Transfektionen hergestellt. (alle Angaben pro Transfektion)

Tag 1:

Nr.	Arbeitsschritt	Substanz	Kulturgefäß		
			12-well Platte	6 cm Schale	10 cm Schale
1.	293T oder AAV 293 Zellen aus-plattieren	Zellen / well od. Schale	4 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁶	6 x 10 ⁶
		Medium / well od. Schale	• 1 ml	• 5 ml	• 10 ml

Tag 2:

Nr.	Arbeitsschritt	Substanz	Kulturgefäß		
			12-well Platte	6 cm Schale	10 cm Schale
1.	PEI Lsg. ansetzen	PEI (1 mg/ml)	• 3,6 µl	• 18 µl	• 90 µl
		Medium ohne Zusätze	• 46,4µl	• 232 µl	• 410 µl
2.	DNA Lsg. ansetzen	Gesamt DNA	• 1,2 µg	• 6 µg	• 30 µg
		Medium ohne Zusätze	• 48,8 µl	• 244 µl	• 470 µl
3.	PEI Lsg. zu DNA Lsg. zügig zugeben und gut mischen	PEI Lsg.	• 50 µl	• 250 µl	• 500 µl
		DNA Lsg.	• 50 µl	• 250 µl	• 500 µl
4.	Gemisch 15-30 min bei RT inkubieren				
5.	Medium von Zellen entfernen				
6.	Medium mit FCS auf Zellen geben	ml Medium	• 500µl	• 2,5 ml	• 9 ml
		% FCS	• 12%	• 12%	• 12%
7.	Transfektions Mix zu den Zellen geben		• 100µl	• 0,5 ml	• 1 ml
8.	Zellen über Nacht bei 37°C, 5% CO ₂ inkubieren				

Tag 3:

Nr.	Arbeitsschritt	Substanz	Kulturgefäß		
			12-well Platte	6 cm Schale	10 cm Schale
1.	Natriumbutyrat-Induktion Endkonzentration 10 mM	20 µl Na-Bu (500 mM) / ml Medium	• 20 µl	• 60 µl	• 200 µl
2.	6-8 h bei 37°C, 5% CO ₂ inkubieren				
3.	Medium von Zellen entfernen				
4.	Medium mit FCS auf Zellen geben	ml Medium	• 1 ml	• 3,0 ml	• 10 ml
		% FCS	• 10%	• 10%	• 10%
5.	Zellen über Nacht bei 37°C, 5% CO ₂ inkubieren				

Tag 4 oder 5:

Je nach Anwendung wurden die Zellen am 4. oder 5. Tag geerntet.

5.3.6 Isolierung von hämatopoetischen Stammzellen aus murinem Knochenmark

Für die Präparation von hämatopoetischen Stammzellen (engl. *hematopoietic stem cells*; abgekürzt HSCs) wurden 4 bis 12 Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse (Charles River/Wiga, Sulzfeld, Germany) verwendet, die bis zu ihrer Tötung unter pathogenfreien Bedingungen im institutseigenen Tierstall gehalten wurden. Nach der artgerechten Tötung durch CO₂ wurden die Mäuse rücklings auf einem Styropordeckel fixiert und das Fell vom Bauch ausgehend zu den Hinterpfoten mit einer Schere aufgeschnitten. Die Hinterbeine wurden vorsichtig im Hüftgelenk abgetrennt. Oberschenkel (*femur*)- und Schienbeinknochen (*tibia*) der hinteren Extremitäten wurden freigelegt, durch Zupfen mit einer Pinzette von Gewebe befreit und zur Desinfektion 2-5 min in Isopropanol gelegt. Anschließend wurden die Knochen mit sterilem PBS abgespült und die Gelenkköpfe mit einer Schere abgeschnitten. Das Knochenmark wurde dann mit einer PBS gefüllten Spritze (Kanüle 27G) über einem Nylon-Einwegsieb (70 µm) ausgespült bis der Knochen durchsichtig war und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen. Die so gewonnenen HSCs wurden bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert, in frischem RPMI-1640-Medium resuspendiert und gezählt. Die Ausbeute betrug etwa 2×10^7 Zellen pro Tier.

Zusammensetzung des R10-Mediums:

RPMI -1640; 10% GM-CSF; 50 µM β-Mercaptoethanol

5.3.7 Isolierung von murinen Lymphozyten

Die für den Versuch benötigten Tiere (BALB/c) wurden wie unter 3.3.6 beschrieben, gehalten und getötet. Von den Lymphknoten (Lage s. Abbildung unten) wurden so viele wie Möglich mit einer Pinzette abgezupft und in eisgekühltes PBS gegeben. Während Lymphgewebe sofort auf den Boden des Röhrchens sank, schwamm irrtümlich gezupftes Fettgewebe auf der Oberfläche. Die Lymphknoten wurden in einer Petrischale mit PBS zwischen zwei sterilen Objektträgern verrieben und durch ein 70 µm Einwegsieb in ein 50 ml Röhrchen gespült. Die Zellen wurden für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert in 10 ml RPMI-1640 aufgenommen und gezählt. Aus zwei Mäusen konnten ca. 4×10^7 Lymphozyten isoliert werden, die in einem anschließenden Proliferationstest verwendet wurden.

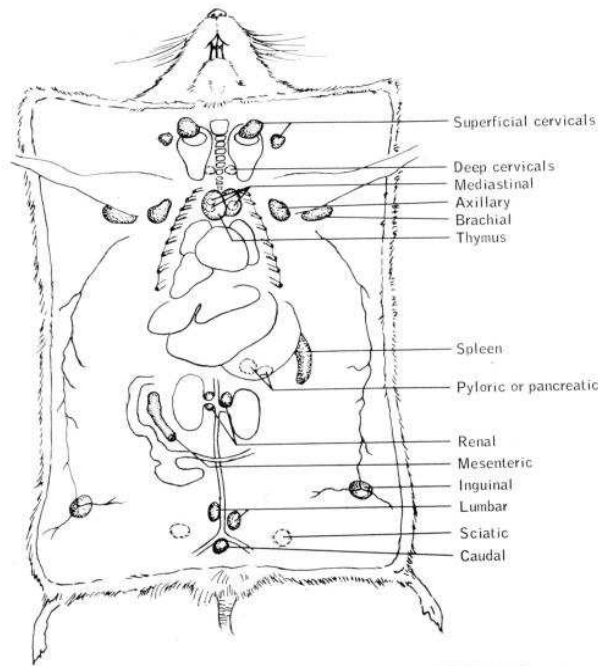


Abb. 5.3.7.1: Lage der Lymphknoten in der Maus

Aus Vincenzo Covelli - Guide to the Necropsy of the Mouse

5.3.8 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen mittels einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Blutzapfen aus der Transfusionsmedizin der Universität Würzburg wurden mit einer sterilen Schere an beiden Enden aufgeschnitten und der Inhalt in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen. Je 10 ml wurden auf vier neue 50 ml Röhrchen verteilt und mit 30 ml RT-warmem RPMI-1640 Medium verdünnt. Das Blut wurde mit je 10 ml LSM 1077 (Ficoll) unterschichtet (Vorsicht! Das Blut darf sich nicht mit dem Ficoll vermischen) und für 20 min bei 1800 rpm zentrifugiert. Wichtig ist hier, dass man bei RT zentrifugiert und die Zentrifuge ohne Bremse auslaufen lässt. Nach der Trennung sollten folgende Schichten von oben nach unten sichtbar sein. Zuerst Plasma, dann eine Schicht von *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) die auch *buffy coat* genannt wird, der Ficoll-Paque, und schließlich Erythrozyten und Granulozyten. Der Leukozytenfilm wurde mit einer sterilen Glaspipette vorsichtig abgesaugt und in neue 50 ml Röhrchen überführt. Diese wurden auf 50 ml mit PBS 0,1 % EDTA (EDTA zur Vermeidung der Blutgerinnung) aufgefüllt und für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets in PBS 0,1 % EDTA resuspendiert und der Inhalt von je zwei Röhrchen zu einem zusammengefasst. Die Röhrchen wurden wieder bis auf 50 ml mit PBS 0,1 % EDTA aufgefüllt und nochmals für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Röhrchen erneut bis zu

50 ml mit Puffer gefüllt und ein Aliquot (20 µl) für eine Zellzählung entnommen. Abschließend wurden die Zellen nochmals für 10 min bei 900 rpm zentrifugiert und je nach Bedarf in RPMI-1640 resuspendiert. Aus einem Blutzapfen erhielt man bis zu 7×10^8 PBMCs.

5.3.9 Generierung von dendritischen Zellen (DZ)

A) aus murinen HSC

3×10^6 muriner HSC-Zellen wurden in 10 ml R10-Medium resuspendiert und in 10 cm Petrischalen ausgesät (Tag 0). An den Tagen 3 und 6 wurden weitere 10 ml R10 Medium hinzu gegeben. An Tag 8 wurden die Zellen geerntet, gezählt und für weitere Experimente verwendet. Bei Verwendung kleinerer Petrischalen wurden die Zellzahl sowie das Volumen des Mediums entsprechend angepasst.

Zusammensetzung des R10-Mediums:

RPMI-1640; 10% GM-CSF; 50 µM β-Mercaptoethanol

GM-CSF stammt aus den gesammelten Überständen einer Zellkultur, sodass die genaue Konzentration nicht bestimmt werden konnte.

B) aus humanen PBMC

Die aus den Blutzapfen erhaltenen PBMCs wurden zu je 5×10^7 mit 10 ml RPMI -1640 in 10 cm Petrischalen ausgesät und ü.N. im Brutschrank inkubiert (Tag 0). Die schwereren Monozyten, aus denen DZs generiert werden sollen, lagern sich auf dem Boden der Schale ab, während die restlichen Leukozyten (u.a. T- und B-Zellen) im Medium schwimmend verweilen. Am nächsten Morgen (Tag 1) wurde das Medium vorsichtig abgenommen und durch frisches RPMI-1640 ersetzt. Die in dem Überstand befindlichen Leukocyten wurden gezählt und für spätere Experimente eingefroren. Außerdem wurden jetzt der Wachstumsfaktor GM-CSF (Leukine® sargramostim 800 U/ ml) sowie das Zytokin IL-4 (250 U/ ml) dazugegeben. Nach weiteren 2 Tagen Inkubation im Brutschrank wurden 3 ml frisches Medium und GM-CSF sowie IL-4 hinzupipettiert (Tag 3). Die Zusätze GM-CSF und IL-4 wurden für ein Gesamtvolumen von 12 ml berechnet, da man von etwa 1 ml Verlust an Medium durch Verdunstung ausgeht und die Zusätze von Tag 1 verbraucht sind. Bis zur Ernte (Tag 5) wurden die PBMCs im Brutschrank aufbewahrt. Die Entwicklung der Monozyten zu unreifen DZs sollte auch mikroskopisch verfolgt werden. Hier kann mit etwas Erfahrung schon am ersten Tag beurteilt werden, ob sich eine Fortführung des Experimentes

lohnt, wenn man Zahl der adhärennten Monozyten auf dem Schalenboden abwägt. Am Ende wurden meist $\sim 1,5 \times 10^6$ hDZs aus 5×10^7 PBMCs gewonnen.

5.3.10 Aktivierung dendritischer Zellen durch Neuromelanin und Dopaminmelanin

Neuromelanin (NM) wurde von Thomas Elpel nach einem Protokoll von Li et al., 2005 präpariert, gereinigt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Insgesamt vier Präparationen zu je 1-2 mg. Ein Teil der NM-Präparation war mit Proteinase K behandelt (NM+). Alle NM-Proben stammten von Probanden ohne Anzeichen einer Parkinson Erkrankung. Dopaminmelanin (DAM) wurde ebenfalls fertig aufgereinigt und gefriergetrocknet von Prof. Dr. Manfred Gerlach bereitgestellt. Im Laufe der Arbeit wurden verschiedene Methoden versucht um die Melanine für die Experimente nutzbar zu machen. Folgende Tabellen geben einen Überblick über die Art der Aufbereitung von DAM und NM.

DAM

StockNr.: Datum/Probe	Konz.	Lösungsmittel	suspendiert mit	autoklaviert	Endotoxinfrei
#1) 26.11.07	1mg/ml	PBS steril	Ultraschall	nein	kein Test
#2) 22.01.08	1mg/ml	PBS steril	Ultraschall	nein	kein Test
#3) 13.02.08	5mg/ml	PBS steril	Ultraschall	ja	kein Test
#4) 26.06.08	5mg/ml	PBS steril	Ultraschall	ja	ja
#5) 17.02.09	5mg/ml	steriles H ₂ O	Vortex	ja	ja

NM

StockNr.: Datum/Probe	Konz.	Lösungsmittel	suspendiert mit	autoklaviert	Endotoxinfrei
#1) 23.09.08	5mg/ml	PBS steril	Ultraschall	ja	nein

NM						
#2) NM	14.07.09	5mg/ml	PBS steril 10% DMSO	Pipette	ja	kein Test
#3) NM	14.04.10	5mg/ml	PBS steril	Pipette	ja	ja
#4) NM+	14.04.10	5mg/ml	PBS steril	Pipette	nein	ja

Im Folgenden wird nur die schlussendliche Verfahrensweise beschrieben. Die erhaltenen, abgewogenen NM und NM+ -Proben wurden autoklaviert und unter einer sterilen Werkbank mit sterilem PBS durch auf und ab pipettieren suspendiert. Die Konzentration der Suspension wurde auf ~5 mg/ ml eingestellt. Mit DAM wurde ebenso verfahren. NM, NM+ und DAM wurden einem Endotoxintest unterzogen um mögliche Verunreinigungen durch LPS auszuschließen. Die benötigte Menge an Melanin für die Aktivierung der DZs wurde mit DAM austitriert und schließlich auch für NM und NM+ auf 0,05 mg/ ml festgelegt. Generierte DZs wurden 48 h mit den Melaninen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erst bei 800 rpm für 30s abzentrifugiert und der Überstand abgekippt, um im Medium gelöstes, nicht phagozitiertes Melanin zu entfernen. Danach wurde frischer PBS-Puffer dazugeben und die Zellen wurden zweimal gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte bei 1200 rpm und 3 min. Anschließend wurden die Zellen gezählt und für die jeweiligen Versuche (FACS, MLR) verwendet.

5.3.11 T-Zell Proliferationstest

Dieser Test dient als *in vitro* Modell für die Aktivierung von T-Zellen und als Test für die Antigenerkennung durch T-Zellen. Im speziellen handelt es sich hier um eine allogene *mixed lymphocyte reaction (MLR)*. Allogen deshalb, weil stimulierte DZs von C57BL/6 Mäusen (Donor A) zusammen mit frisch präparierten Lymphozyten von BALB/c Mäusen (Donor B) kultiviert wurden. Die Anzahl der Lymphozyten (inkl. T-Zellen) wurde bei diesem Experiment auf 4×10^5 pro well auf einer 96-Lochplatte festgelegt und die Zahl der DZs austitriert. Für MLRs mit humanen DZ (hDZ) wurden als T-Zellreservoir eingefrorene Leukozyten aus einer früheren hDZ Generierung verwendet (3.3.9 B). Die Proliferation und die Aktivierung der T-Zellen wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin verfolgt. Das *pulsen*, d.h. die Zugabe von [³H]methyl-thymidine (1 µCi/well) erfolgte nachdem die Zellen von A und B für 3 Tage zusammen inkubiert wurden. Am 4. Tag wurden die einzelnen Kulturen der 96-

Lochplatte mittels eines „Harvesters“ (TomTec) auf eine Glasfieber Filtermatte (Filtermat A; Wallac) mit 96 Feldern gewaschen. Davor und danach wurde jeweils durch 3 „single wash“-Schritte (Select > single wash) gespült. Die Matte wurde dann für 30 min in einem extra dafür bereitgestellten Brutschrank getrocknet. Danach wurde die Glasfiebermatte mit Szintillationsflüssigkeit getränkt und in eine spezielle Folie (sample bag; Wallac) eingeschweisst. Der Radioaktive Zerfall wurde mit einem 1450 Microplate Counter gemessen. Für jedes Loch auf der Platte ergibt sich ein Wert cpm (*counts per minute*). Der sogenannte Stimulationsindex als Maß für die Proliferation der T-Zellen wird aus $\text{cpm (Kultur)} / \text{cpm (autologe Kontrolle)}$ berechnet.

5.4 Mikroskopie

5.4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Transfektions- bzw. Infektionseffizienz von Zellen zu überprüfen wurden sie unter einem UV-Mikroskop betrachtet und fotografiert. Die transfizierten Zellen exprimierten das grün fluoreszierende Protein GFP oder das rot fluoreszierende Protein mRFP. GFP stammt aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria*, welches UV-Licht absorbiert und deshalb grün (509 nm) fluoresziert. mRFP wurde aus der indopazifischen Anemone *Discosoma striata* isoliert. RFP absorbiert den grünen Teil des Lichtspektrums und emittiert rotes Licht mit einem Wellenlängenmaximum bei 583 nm. Die Zellen wurden in Schälchen oder Wellplatten unter dem Mikroskop in eine entsprechende Halterung gelegt und bei einer 10-fachen Vergrößerung im Durchlicht angesehen. Durch das Einschalten eines optischen Filters, der die zur Anregung des Farbstoffs notwendige Wellenlänge isoliert, und das gleichzeitige betätigen eines Farbteilers wurden die grün bzw. rot fluoreszierenden Zellen sichtbar.

5.4.2 Konfokalmikroskopie

Mit NM, NM+ und DAM behandelte DZs wurden auf einen Objektträger gegeben und mit einem *Meta Confocal Microscope* und einem 63 x Objektiv (N.A 1,4) fotografiert. Mit Hilfe der Software SP3.2 (Zeiss) wurden neben Einzelbildern auch Schichtaufnahmen (Z-Stapel) von DZs gemacht. Alle Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Nora Müller und Harry Harms in der Abteilung für Zytometrie und Bildverarbeitung des Virologischen Instituts Würzburg erstellt.

5.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Analyse einer Transfektion und der Expression von Rezeptor- und Signalproteinen (MHC II, CD11c, CD86, INF- γ) wurde ein FACScan (*Fluorescence activated cell sorting*) benutzt. Sehr große Zellmengen können hier in Sekunden anhand fluoreszierender Marker (z.B. GFP, FITC, PE, APC) auf die Häufigkeit eines Ereignisses innerhalb einer Zellpopulation hin untersucht werden. Das FACS-Gerät detektiert dabei Streulicht bzw. Fluoreszenzimpulse die von Zellen emittiert werden während sie einen Laserstrahl passieren. Das Streulicht wird durch die Zellgröße, die Struktur der Zellmembran sowie durch intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Die Zellen können damit in unterschiedliche Fraktionen sortiert und gezählt werden. Als wesentliche Parameter dienen hierzu der sogenannte *Forward Scatter* (FSC = Vorwärtsstreulicht) und der *Side Scatter* (SSC = Seitwärtsstreulicht). Der FSC wird durch Beugung des Lichts hervorgerufen und gibt Auskunft über die Zellgröße. Der SSC wird durch die Brechung des Lichts verursacht und dient als Maß für die Granularität einer Zelle.

Zur Messung im FACScan wurden adherente Zellen in der Regel mit 1-2 ml ATV trypsinisiert, in ebenso viel Medium resuspendiert und 500 μ l in FACS-Röhrchen überführt. Von nicht adherenten Zellen wurden 500 μ l direkt aus der Kulturschale entnommen. Die Zellen wurden 3 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und das überstehende Medium abgekippt. Anschließend wurden sie, je nach Versuch, erst mit Antikörpern gefärbt oder gleich mit 100 μ l 4%iger Formalinlösung fixiert, gevortext und je nach Zelldichte mit 300-500 μ l PBS verdünnt.

Die Aufnahme der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Becton & Dickinson FACScan Durchflußzytometers und der Software Cell Quest Pro 3 (Becton & Dickinson). Die Auswertung wurde mit dem Programm FlowJo erledigt.

Zusammensetzung der Formalinlösung (4%):

Formaldehyd (37%)	11 ml
PBS	89 ml

5.6 Immunochemische Methoden

5.6.1 Immunoassay zum Nachweis von DAM-Antikörpern

Für einen qualitativen Nachweis von DAM-Antikörpern aus dem Serum von mit DAM immunisierten Kaninchen wurde einerseits versucht DAM auf 96-Lochplatten zu *coaten*, andererseits ein Immunoassay in 1,5 ml Eppendorfgefäßen durchgeführt.

Zum *coaten* wurde eine Verdünnungsreihe einer DAM-Lösung (1mg/ml) von 1:2 bis 1:116 hergestellt. Jeweils 50 µl wurden in Duplikaten auf eine 96-Lochplatte (Flachboden) pipettiert. Die Platte wurde abgedeckt ü.N. auf einen Schüttler gestellt, damit sich die Pigmente gut verteilen und eintrocknen konnten. Am Tag darauf wurde die Platte mit Alufolie bedeckt und für 2 h auf einen 80°C warmen Heizblock gelegt. Danach wurde mit Serumproben ein ELISA durchgeführt.

Für den Immunoassay in 1,5 ml Eppendorfgefäßen wurden die benötigten Eppendorfgefäße zunächst ü. N. mit FCS geblockt. Am nächsten morgen wurden je 50 µl einer ebenfalls ü.N. mit FCS bzw. BSA 2% geblockten DAM-Stocklösung (1mg/ml) in die vorgesehenen Tubes gefüllt. Dazu wurden 100 µl verschiedener Serumverdünnungen gegeben, das ganze gevortext und für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Es folgten drei Waschschrirte mit 1 ml TBS 0,1% Tween mit dazwischenliegenden Zentrifugationschritten von 13000 rpm für 3 min. Danach wurde das Pellet mit 50 µl einer 1:3000 Verdünnung eines Anti-rabbit-HPR-Konjugats versetzt und für 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Es folgten drei Waschschrirte, wie oben beschrieben. Als Substrat für die HPR wurden je 50 µl TMB verwendet. Die Proben wurden für 10 min dunkel gelagert. Nach der Zugabe eines Stopreagenzes und 10 minütiger Inkubation, wurde nochmals kurz abzentrifugiert. Die Überstände wurden auf eine 96-Lochplatte überführt und die Absorbtion bei 450 nm gemessen.

5.6.2 Agglutinationstest zum Nachweis von DAM-Antikörpern

Hierfür wurden Serumproben von mit DAM immunisierten Kaninchen 1:20 verdünnt. Davon ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe von 1:5 pipettiert. Die Proben wurden auf eine 96 Lochplatte gegeben und mit 1,25 µg DAM (1 mg/ml) vermischt. Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank wurden die Proben im Lichtmikroskop analysiert.

5.6.3 ELISA zur quantitativen Bestimmung von Zytokinkonzentrationen

Für den Nachweis von Zytokinen (IL-6 und TNF-α) aus dem Überstand von dendritischen Zellkulturen wurden verschiedene ELISA OptEIA Kits (BD) verwendet. Der Test beruht auf dem Prinzip eines *Sandwich* -ELISA. Ein erster monoklonaler Antikörper gegen ein Epitop des Zytokins ist auf dem Boden eines Mikrotiterstrips verankert um Zytokine aus einer unbekanntem Probe einzufangen. Ein zweiter biotinylierter Zytokin-Antikörper bindet von oben auf den Capsiden und ermöglicht indirekt deren Detektion. Die vielen Biotinmoleküle sind wegen ihrer hohen Affinität zu Streptavidin in der Lage mehrere Streptavidin-

Peroxidase-Komplexe zu binden, was eine Verstärkung des Signals zur Folge hat. Die Zugabe eines Substrates und dessen Umsetzung durch die Peroxidase führt schließlich zu einer Farbreaktion die proportional zu der Menge an gebundenem Zytokin-Partikeln ist. Die Absorption wurde bei 450 nm mit einem ELISA-Reader gemessen und mit Excel ausgewertet. Der ELISA wurde in allen Punkten nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.7 Proteinchemische Methoden

5.7.1 Gewinnung von Proteinlysaten aus Zellkulturen

Dazu wurde das Medium einer Zellkultur (mind. 1×10^6 Zellen) entfernt, der Zellrasen mit reichlich PBS benetzt und mit einem Zellschaber abgelöst. Die Zellen wurden in einem 15 ml Falcon bei 1200 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 300 µl frischem PBS resuspendiert und in ein Eppendorftube gegeben. Die geernteten Zellen wurden mittels einer 4-maligen freeze and thaw Passage zwischen flüssigem Stickstoff und einem 37°C Wasserbad aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden 3 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorftube überführt. Um eine Degradierung der Proteine zu vermeiden wurden 3 µl Proteinaseinhibitor dazugegeben und die Proteinlösungen immer auf Eis gelagert.

5.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die benötigte Menge an Bradford-Reagenz wurde im Verhältnis 1:4 mit destilliertem Wasser verdünnt. Es wurde eine Standardreihe mit 10 Verdünnungsstufen hergestellt. Und zwar zu je 1 ml Bradford-Reagenz, 0 bis 30 µl Proteinstandard (1 µg/µl BSA) in 3er Schritten. Von den zu bestimmenden Proben wurden 1-10 µl eingesetzt. Alle Ansätze wurden gevortext und für mindestens 5 min bei RT inkubiert. Standardreihe und Proben wurden zu je 200 µl/Well nach folgendem Schema auf eine 96 Loch -Platte pipettiert.

21	21	21	X ₅	X ₅	X ₅	X ₁₃	X ₁₃	X ₁₃	X ₂₁	X ₂₁	X ₂₁
0	0	0	24	24	24	X ₆	X ₆	X ₆	X ₁₄	X ₁₄	X ₁₄
3	3	3	27	27	27	X ₇	X ₇	X ₇	X ₁₅	X ₁₅	X ₁₅
6	6	6	30	30	30	X ₈	X ₈	X ₈	X ₁₆	X ₁₆	X ₁₆
9	9	9	X ₁	X ₁	X ₁	X ₉	X ₉	X ₉	X ₁₇	X ₁₇	X ₁₇
12	12	12	X ₂	X ₂	X ₂	X ₁₀	X ₁₀	X ₁₀	X ₁₈	X ₁₈	X ₁₈
15	15	15	X ₃	X ₃	X ₃	X ₁₁	X ₁₁	X ₁₁	X ₁₉	X ₁₉	X ₁₉
18	18	18	X ₄	X ₄	X ₄	X ₁₂	X ₁₂	X ₁₂	X ₂₀	X ₂₀	X ₂₀

Standardreihe: Rinder-Serum–Albumin BSA

X₁: Proben-Nullwert (= Bradford–Reagenz mit 1-10 µl PBS)

X_{n>1}: unbekannte Proben

Die Extinktion bei 595 nm wurde mit einem ELISA–Reader gemessen. Die Daten wurden in Excel übertragen und eine Eichgerade erstellt. Anhand der Steigung m und des Mittelwerts der Extinktion y wurde die Proteinkonzentration $x = y/m$ berechnet. Das Ergebnis x wurde durch die eingesetzte Probenmenge geteilt, um die Konzentration in µg/µl zu erhalten.

5.7.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS–Page)

Die SDS–Gelelektrophorese beruht darauf, dass Proteine durch Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und proportional zu ihrer Größe negativ geladen werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle im elektrischen Feld ist demnach abhängig von ihrem Molekulargewicht, wonach sie schließlich aufgetrennt werden.

Zur Herstellung von vier Polyacrylamidgelen wurden entsprechend viele Aluminiumplatten seitlich mit zwei Spacern versehen, je eine Glasplatte darauf gelegt und zusammen in einen Gießrahmen gespannt.

Zusammensetzung für vier mittelgroße Gele:

	Trenngel (Gesamtvolumen 40ml)	
	10%	12%
Acrylamid-Lsg.	10ml	12ml
Tris-Hcl pH8,8	14,9ml	14,9ml
Wasser	14,9ml	12,9ml
20% SDS	200µl	200µl
10% APS	150µl	150µl
TEMED	15µl	15µl

	Sammelgel (20ml)
Acrylamid-Lsg.	2,5ml
Tris-Hcl pH6,8	2,5ml
Wasser	15ml
20% SDS	100µl
10% APS	100µl
TEMED	20µl

Zuerst wurde das Trenngel in die Gelkammern gegossen und mit gesättigtem Butanol überschichtet. Die Polymerisation dauerte 45 min. In der Zwischenzeit wurde das Sammelgel vorbereitet, alle Zutaten bis auf APS und TEMED gemischt und beiseite gestellt. Nach 45 min wurde das Butanol abgekippt und mit aqua dest. nachgespült. Das Sammelgel wurde fertiggestellt und auf das Trenngel gegossen. Nach weiteren 20 min konnten die Gele beladen oder bei 4°C feucht verpackt im Kühlschrank gelagert werden. Für die Elektrophorese wurden selbst hergestellte und gekaufte 10-12%ige Polyacrylamidgele benutzt. Ein Gel wurde in eine Gelkammer gespannt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Die Proben aus der Bradford-Bestimmung wurden mit SDS-Probenpuffer auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt und 10 min bei 95 °C im Heiz block aufgeköcht.

Pro Tasche wurden 10 µg Probe aufgetragen und doppelt bestimmt. In den Seitentaschen wurden 5 µl Proteinstandard bzw. 10 µl eines Biotin-Standards gegeben. Die biotinylierte Proteinleiter wurde für 2-3 min bei 95°C aufgeköcht . Die Auftrennung erfolgte bei 35 mA für 60 min.

5.7.4 Western Blot

Die Methode beschreibt allgemein den Transfer (>*blotting*) von aufgetrennten Proteinen aus einem Gel auf eine immobilisierte Membran. Da die *Blotting*-Bedingungen aber stark von den Eigenschaften des jeweiligen Proteins abhängig sind, kann folgend beschriebene Methode nicht allgemein angewandt werden. Geblottet wurde für diese Arbeit im sogenannten *semi-dry* Verfahren.

Nach der SDS-Page wurde das Gel in Transferpuffer gelegt und die Blottingkammer vorbereitet. Es wurden nacheinander

- a. 2 dicke Blottingpapiere
- b. 3 dünne Blottingpapiere
- c. Nitrocellulose
- d. das Gel
- e. 3 dünne Blottingpapiere
- f. 2 dicke Blottingpapiere

in Transferpuffer getränkt und möglichst gerade und ohne Luftblasen auf die Anode gelegt.

Mit einer Glaspipette wurden etwaige Luftpinschlüsse vorsichtig herausgerollt. Mit dem Deckel (Kathode) wurde die Kammer geschlossen und für 105 Minuten mit 135 mA

(ca. 2 mA/cm²) an eine Spannungsquelle angeschlossen. Anschließend wurde der Transfer mit einer reversiblen Ponceau S Färbung (P 7170; Sigma) überprüft. Die Nitrocellulose wurde dazu 2-5 min in der Lösung geschwenkt. Das Ponceau S ist mehrmals verwendbar und wurde zurück in in lichtdicht verpacktes Röhrchen gegeben. Die Membran wurde mit

VE-Wasser gespült, bis die roten Banden deutlich zu erkennen waren. Danach wurde die Cellulose zügig mit 0,1 %iger NaOH entfärbt und 3-mal 1 min mit VE -Wasser gewaschen. Die Membran wurde nun über Nacht und bei 4°C mit 5% iger Milchlösung blockiert, um freie Bindungsstellen der Cellulose abzusättigen. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit einem oder zwei spezifischen primären Antikörpern (z.B. gegen hIDE). Die optimale Menge an Antikörper wurde in einer Verdünnungsreihe ermittelt und dieser in Waschpuffer verdünnt. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei RT.

Danach wurde die Membran 4-mal 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Der sekundäre Antikörper (*Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP-Konjugat*; BioRad) wurde 1:3000, der Antikörper für die Biotinleiter (*anti-biotin HRP linked antibody*; Cell Signaling Technology) 1:2000 mit 5%iger Milchlösung verdünnt. Beide wurden für 2 h mit der Membran bei RT inkubiert. Anschließend wurde wie zuvor 4-mal gewaschen und die Membran 1 min in ECL-Nachweisreagenz (Pierce) geschwenkt. ECL ist ein chemilumineszierendes Substrat für die *horseradish peroxidase* (HRP) die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist. Die Detektion der Luminol-Reaktion erfolgte in einer Intelligent Dark Box (LAS-3000; Fujifilm). Die Graustufen der Banden wurden mit dem Programm Image J ausgemessen und mit Excel ausgewertet.

5.7.5 Test auf LPS-Verunreinigung mit *limulus ameobocyte lysate* (LAL)

Um eine Verunreinigung von DAM und NM mit LPS auszuschließen, wurden zwei verschiedene LAL-Tests verwendet. Das E-Toxate Kit von Sigma und QCL-1000 von Lonza. Beide Tests beruhen auf demselben Prinzip. Das in einer verunreinigten Probe enthaltene Endotoxin katalysiert, wenn es mit LAL zusammengebracht wird, eine enzymatische Reaktion. Der genaue Reaktionsmechanismus ist laut Herstellerangaben (Manual E-Toxate) aber nicht bekannt.

Bei E-Toxate aktiviert Endotoxin zuerst mehrere „*trypsin-like preclotting enzymes*“, welche anschließend durch eine teilweise Proteolyse eines „coagulogens“ zu dessen Verklebung führt. Die Wirkung eines Endotoxines äussert sich am Ende durch eine Gelbildung der Probe. Für den Test wurden sterile, gestopfte Pipettenspitzen und sterile FACS-Röhrchen verwendet.

Der QCL-1000-LAL-Test ist so konzipiert, das Endotoxin ein im LAL enthaltenes Proenzym aktiviert, welches dann gelbes p- Nitroanilin (pNA) von einem künstlichen Substrat abspaltet. Der Effekt von Endotoxin wird hier über die Abspaltung von gelbem p-NA gemessen und kann bei 405 nm bestimmt werden.

Beide Tests wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

5.7.6 Extrazelluläre Antikörperfärbung von Zelloberflächenproteinen

Zur Analyse dendritischer Zellen wurde eine Reihe von membranständigen Proteinkomplexen mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt. Hierfür wurden am Tag 8 einer DC-Reifung Aliquots der Zellkultur in FACS-Röhrchen überführt und diese bei 800 rpm für 1 min abzentrifugiert. Bei dem kurzen Zentrifugationsschritt bleibt nicht endozytiertes NM oder DAM im Überstand und kann abgekippt werden. Die Zellen wurden zweimal mit PBS 0,1% BSA gewaschen und dabei mit 1200 rpm für 3 min abzentrifugiert. Danach wurde eine je nach Bedarf entsprechende Antikörperverdünnung dazu pipettiert und gevortext. Bei einer 3-fach Färbung (d.h. FITC, PE und APC) wurden alle Antikörper auf einmal hinzu gegeben. Die Proben wurden für 30 min im Kühlschrank inkubiert und anschließend dreimal mit PBS 0,1% BSA gewaschen. Um die Zellen auch später im FACS analysieren zu können, wurden sie mit 2% Formaldehydlösung fixiert.

5.7.7 Intrazelluläre Antikörperfärbung von Proteinen

Um die Detektierbarkeit des Proteins zu steigern, wurde 6 h vor der Färbung das Reagenz GolgiStop™ zur Zellkultur gegeben. Dabei handelt es sich um einen Protein Transport Inhibitor der eine Akkumulation von Zytokinen und Proteinen im Golgi Apparat verursacht. Ein Aliquot (500 µl) der zu färbenden Zellen wurde anschließend in ein FACS-Röhrchen überführt. Es wurde 1 ml 4% iger Formaldehydlösung dazugegeben und 20 min inkubiert. Die Zellen wurden damit fixiert und enthaltene Proteine stabilisiert. Danach erfolgte eine Permeabilisierung der Zellmembran durch die Zugabe von 2 ml Saponin-Puffer. Nach weiteren 15 min Inkubation wurde zweimal mit PBS 0,1% BSA gewaschen, d.h. mit den Zentrifugationsschritten 1200 rpm für 3 min und der Zugabe von 3 ml PBS. Der Antikörper wurde entsprechend der Herstellerempfehlung in PBS 0,1% BSA verdünnt, auf die Zellen gegeben und 30 min im Kühlschrank verstaut. Schließlich folgten wieder 2 Waschschrte bevor die Zellen mit 2% iger Formaldehydlösung für eine weitere Analyse prepariert wurden.

6. Ergebnisse

6.1 Reifung von dendritischen Zellen durch Stimulation mit Neuromelanin

Falls Neuromelanin (NM) in der Parkinsonschen Krankheit eine immunogene Rolle übernimmt, könnte NM in der Lage sein dendritische Zellen (DZ) zu aktivieren. Wie in der Einleitung unter 3.3 beschrieben, müssen für die Aktivierung von DZ und einer erfolgreichen Antigenpräsentation drei wesentliche Faktoren erfüllt sein. Erstens muss das Antigen in die DZ aufgenommen werden. Zweitens müssen MHC II Moleküle zur Antigenpräsentation und kostimulatorische Oberflächenmoleküle von der DZ exprimiert werden. Und drittens müssen stimulierende Zytokine ausgeschüttet werden, um T-Zellen (TZ) zur Proliferation anzuregen. Ob NM ein Auslöser für eine vermutete Autoimmunität bei MP sein kann, sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Dafür wurden *in vitro* DZ-Kulturen aus murinem Knochenmark und aus humanen PBMC angelegt. Die DZ wurden 48 h mit DAM, NM, NM+ und LPS inkubiert. Anschließend wurden die DZ mikroskopiert, um festzustellen ob die Melanine phagozytiert wurden. Die wichtigen Aktivierungsmoleküle MHC II und CD86 wurden gefärbt und im FACS untersucht. Das Medium wurde auf die Anwesenheit von Zytokinen hin überprüft und es wurde versucht, ob durch DAM oder NM aktivierte DZ in der Lage sind allogene TZ in einer MLR proliferieren zu lassen.

Tatsächlich konnte die Endozytose von NM bei murinen (m) und humanen (h) DZ beobachtet werden (Abb. 6.1.2.1). mDZ zeigten durch die Aufnahme von NM sogar eine erhöhte Expression von MHC II sowie CD86 (Abb. 6.1.4.1), und gaben hohe Mengen der Zytokine TNF- α und IL-6 ins Medium ab (Abb. 6.1.5.1 und 6.1.5.2). Schließlich konnte in einer *mixed lymphocyte reaction* (MLR) die Proliferation allogener T-Zellen, durch NM behandelte mDZ, angeregt werden (Abb. 6.1.6.3). Um zu klären, welche Rolle das Melanin Rückrat von NM bei der Aktivierung der DZ hat, wurde zum Vergleich synthetisches Dopaminmelanin (DAM) eingesetzt. DAM fehlen jegliche Protein- und Lipidkomponenten.

6.1.1 Keine LPS-Verunreinigung in DAM und NM

Da DZ sehr sensitiv auf mögliche LPS-Verunreinigungen reagieren, wurde der LPS-Gehalt der in dieser Arbeit verwendeten Melaninpräparationen untersucht (5.7.5). Bei dem E-Toxate Test wurden alle Gele die sich durch ein einfaches Umdrehen des FACS-Röhrchens zerstören ließen als negativ gewertet (Abb. 6.1.1.1 und Manual E-Toxate S.6 Interpretation). Die Ergebnisse mit dem E-Toxate Test waren schwierig zu beurteilen. Bei DAM (Abb. 6.1.1.1) härtete das Gel teilweise aus, ließ sich aber durch Umdrehen zerstören. Mit dem

zuverlässigeren LAL QCL-1000 Test wurden alle Proben eindeutig negativ getestet (Abb. 6.1.1.3). Die Proben aus diesem Test wurden für alle folgenden Versuche verwendet.

Röhrchen			
A	B	C	D-H
-	+	-	+

Abb. 6.1.1.1: E-Toxate zeigt kein LPS in einer DAM-Suspension

Der Test weist einen unteren Grenzwert von 0,03 EU/ml Endotoxin auf. Alle Standardverdünnungen waren positiv. DAM, das in der gleichen Konzentration eingesetzt wurde wie in allen späteren Versuchen, ist im Rahmen des Tests als LPS frei zu bewerten.

A = 0,05 mg/ml DAM #4

B = Test für Inhibition durch Probe; enthält A + 0,4 EU/ml LPS

C = negative Kontrolle

D-I: D =0,5; E =0,25; F =0,125; G =0,06; H =0,03 LPS (EU /ml)

(+) hartes Gel

(-) kein hartes Gel

Röhrchen			
A	B	C	D
+	+	-	+

Abb. 6.1.1.2: LPS-Verunreinigung bei einer NM-Probe

E-Toxate wurde auch mit NM durchgeführt. Hier allerdings mit einem positiven Ergebnis.

A = 0,05 mg/ml NM #1

B = Test für Inhibition durch Probe; enthält A + 0,4 EU/ml LPS

C = negative Kontrolle

D = LPS (0,5 EU/ml)

(+) hartes Gel

(-) kein hartes Gel

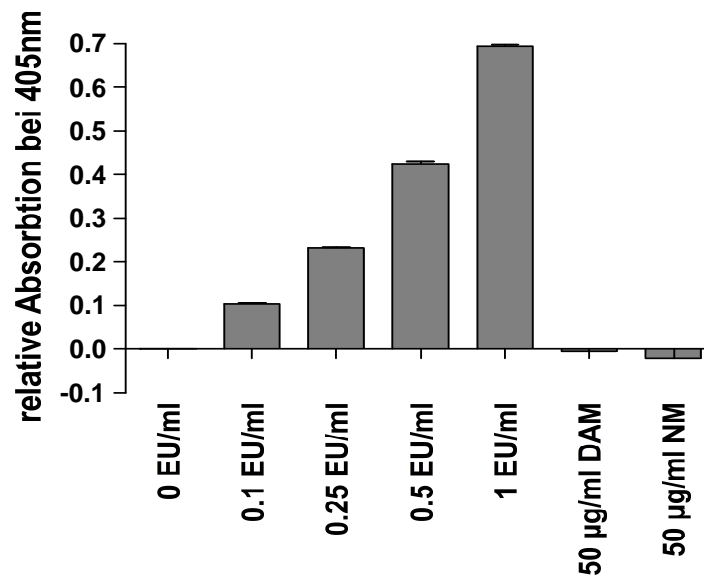


Abb. 6.1.1.3: LAL-Test von DAM und NM ist negativ

Mit einem LAL QCL-1000 Test wurden die Melaninsuspensionen auf LPS-Verunreinigungen getestet. Der Standard wurde positiv getestet, während 50 µg DAM und NM LPS frei waren. Die relative Absorbtion von DAM und NM ergibt sich aus dem Messwert abzüglich der Eigentrübung. Diese wurde durch eine mitgeführte Kontrolle mit DAM bzw. NM ohne LAL bestimmt. Bei den untersuchten Suspensionen handelte es sich um DAM #5 und NM #3. (135)

6.1.2 Murine und humane DZ phagozytieren DAM und NM

Der erste Schritt für eine Antigenpräsentation durch DZ ist die Aufnahme des Antigens in die Zelle. Um zu untersuchen ob NM von DZs aufgenommen wird, wurden humane (h) und murine (m) DZ-Kulturen angelegt und mit NM und DAM versetzt.

Nach 48 h konnte man in allen Fällen eine schwarze, granuläre Pigmentierung der DZs erkennen (Abb. 6.1.2.1 und 6.1.2.2). Z-Stapelaufnahmen zeigen eindeutig, dass die Pigmente im Zellinneren liegen und somit von den DZs aufgenommen wurden (Abb. 6.1.2.3 und 6.1.2.4) (135).

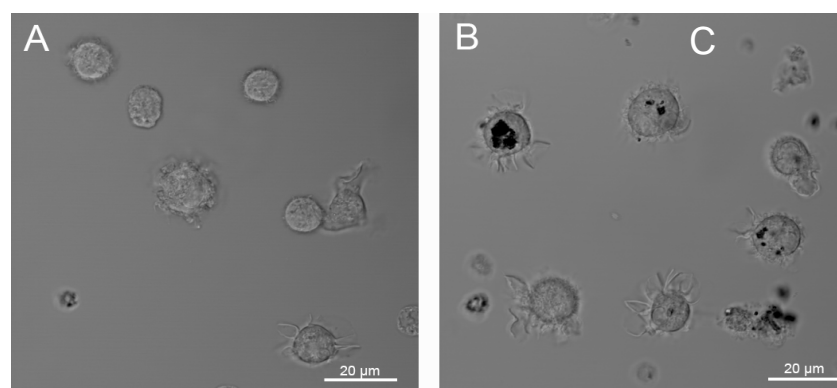


Abb. 6.1.2.1: mDZ phagozytieren NM

DZ wurden 48 h mit oder ohne Proteinase K-behandeltem NM (NM+) inkubiert. Die Kulturen wurden konfokalmikroskopisch bei 63-facher Vergrößerung (N.A 1,4) untersucht. Bild (A) zeigt eine mDZ-Kultur ohne NM+. Bild (B) zeigt die mDZ-Kultur die NM+ (schwarz) phagozytiert haben (135).

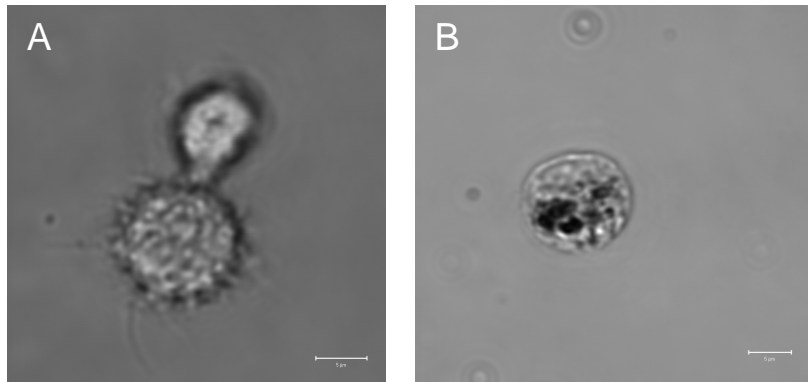


Abb. 6.1.2.2: hDZ phagozytieren DAM

hDZ phagozytierten ebenfalls Melanin. (A) zeigt eine einzelne hDZ der Kontrollkultur ohne DAM. (B) zeigt eine einzelne hDZ die DAM phagozytiert hat. Der Maßstabsbalken entspricht 5µm.

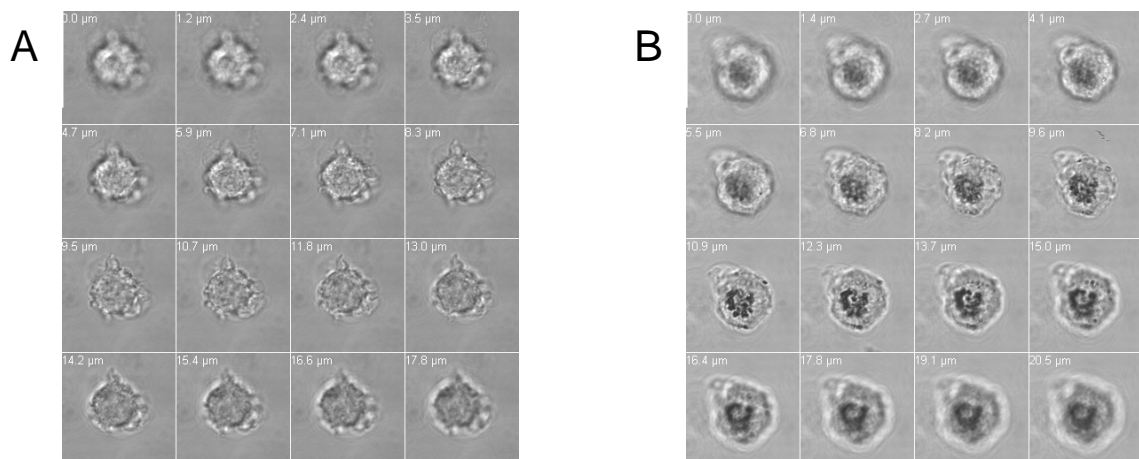


Abb. 6.1.2.3: mDZ phagozytieren DAM

Eine Schichtaufnahme zeigt, dass mDZ DAM phagozytieren (135). Die mDZ wurden 48 h mit oder ohne DAM inkubiert. Je eine repräsentative mDZ aus einer Kultur wurde mit differentieller Interferenz-Kontrastmikroskopie untersucht und aus den Bildern wurden Z-Stapel angefertigt. Die Abstände der Schichten sind oben links in den Einzelbildern zu sehen. Durchfokussiert wurde von unten nach oben.

Die Abbildung 6.1.2.3 lässt gut erkennen, dass die Umriss des granulären, schwarzen Melanines in der Zellmitte am schärfsten sind und DAM von der Zelle phagozytiert wurde (B). Bei der Kontrolle (A) ist keine phagozytierte Struktur zu erkennen. Die Aufnahmen wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Harry Harms aus der Abteilung für Zytometrie und Bildverarbeitung des virologischen Instituts Würzburg angefertigt.

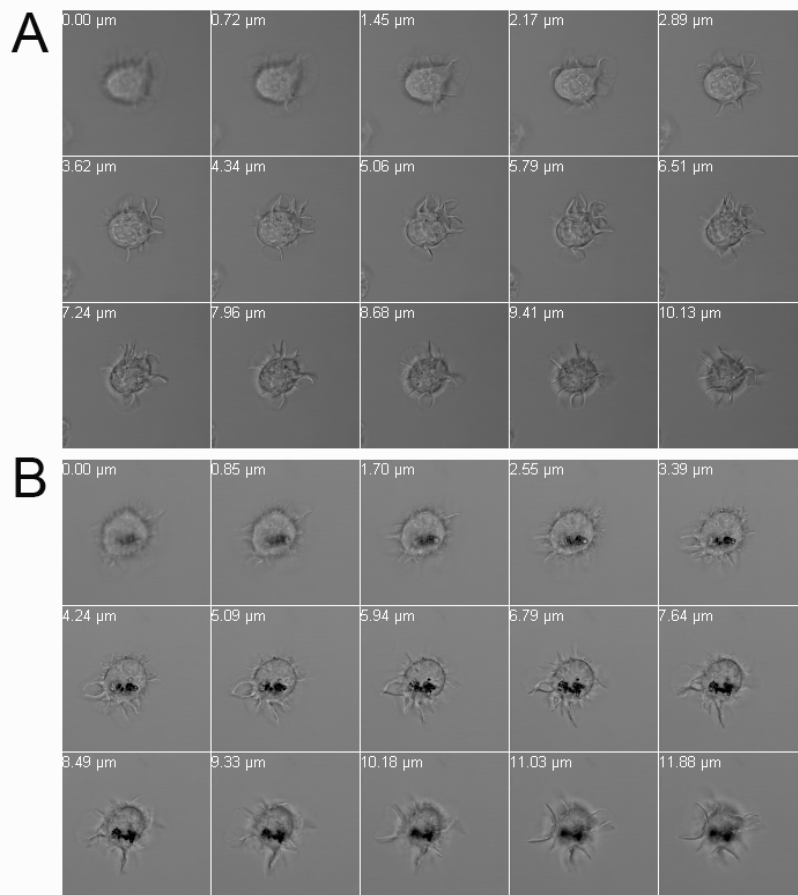


Abb. 6.1.2.4: mDZ phagozytieren NM

Die Schichtaufnahme zeigt, dass mDZ auch NM phagozytieren (135). mDZ wurden 48 h mit **(B)** und ohne NM **(A)** inkubiert. Die Aufnahme wurde von Nora Müller, aus der Abteilung für Zytometrie und Bildverarbeitung des virologischen Instituts Würzburg, fotografiert. Oben links in den Einzelbildern ist jeweils der Abstand vom Startpunkt in μm angegeben.

Die Phagozytose der Melanine konnte im FACS auch ohne Antikörperfärbung sehr gut beobachtet werden, da sich mit Melanin beladene DZ in ihrer Granularität von leeren DZ unterscheiden (Abb. 6.1.2.5). Die Melanine selbst waren im FACS nicht zu sehen. Bereits bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml DAM phagozytietten die mDZ genug Melanin um sich in ihrer Granularität von der Kontrolle zu unterscheiden. Da die verfügbare Menge an NM knapp bemessen war, wurden 0,05 mg/ml Melanin für alle weiteren Experimente verwendet.

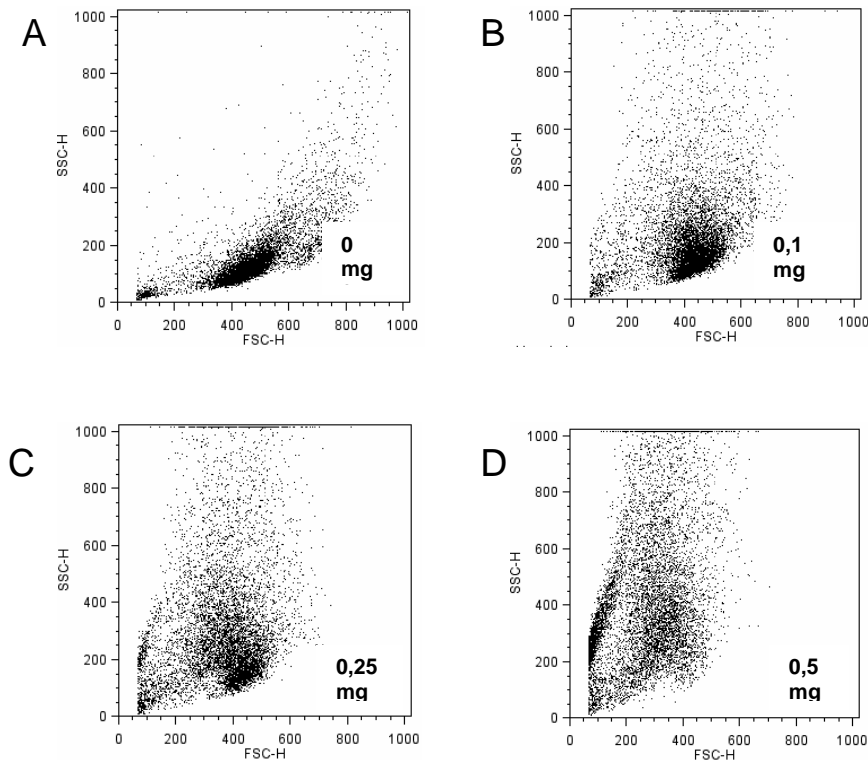


Abb. 6.1.2.5: DAM-Phagozytose von mDZ im FACS

mDZ wurden in Kultur ausdifferenziert und für 48 h mit DAM inkubiert. Die Mengenangaben entsprechen DAM in mg/ml. DAM und NM selbst waren im FACS nicht sichtbar.

Mit zunehmender Menge von zugesetztem DAM (**A<D**), verschiebt sich der FSC nach links und der SSC nach oben, da die Zellen durch die Aufnahme der DAM-Partikel granulärer werden. Zwischen 0,1 und 0,25 mg/ml DAM lassen sich gut ohne Gefährdung der Zellen einsetzen, um eine Phagozytose zu beobachten. Ab 0,5 mg/ml DAM sind vermehrt tote Zellen zu sehen (**D**).

6.1.3 NM lässt mDZ spontan reifen

Nach der Aufnahme eines Antigens migrieren DZ aus den peripheren Geweben und reifen auf dem Weg in die Lymphknoten. Zu der Reifung gehört neben einer morphologischen Veränderung vor allem die verstärkte Expression von MHC II Molekülen an der Zelloberfläche. Auch das für die Antigenpräsentation wichtige kostimulatorische Molekül CD86 und das mDZ-spezifische Integrin CD11c werden verstärkt exprimiert. Die Expression von MHC II und CD86 wurde in dieser Arbeit durch eine Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Bei der 3-fach Färbung wurden zunächst CD11c⁺ mDZ eingegrenzt und deren Fluoreszenz von MHC II (nach oben) und CD86 (nach rechts) dargestellt. Es zeigte sich schließlich, dass die Expression von MHC II und CD86, nur durch die Zugabe von NM und LPS signifikant

erhöht wird (Abb. 6.1.3.1 und 6.1.3.2). Der Effekt von DAM fiel dagegen deutlich schwächer aus und fehlte in einigen Experimenten sogar gänzlich (Abb. 6.1.3.1).

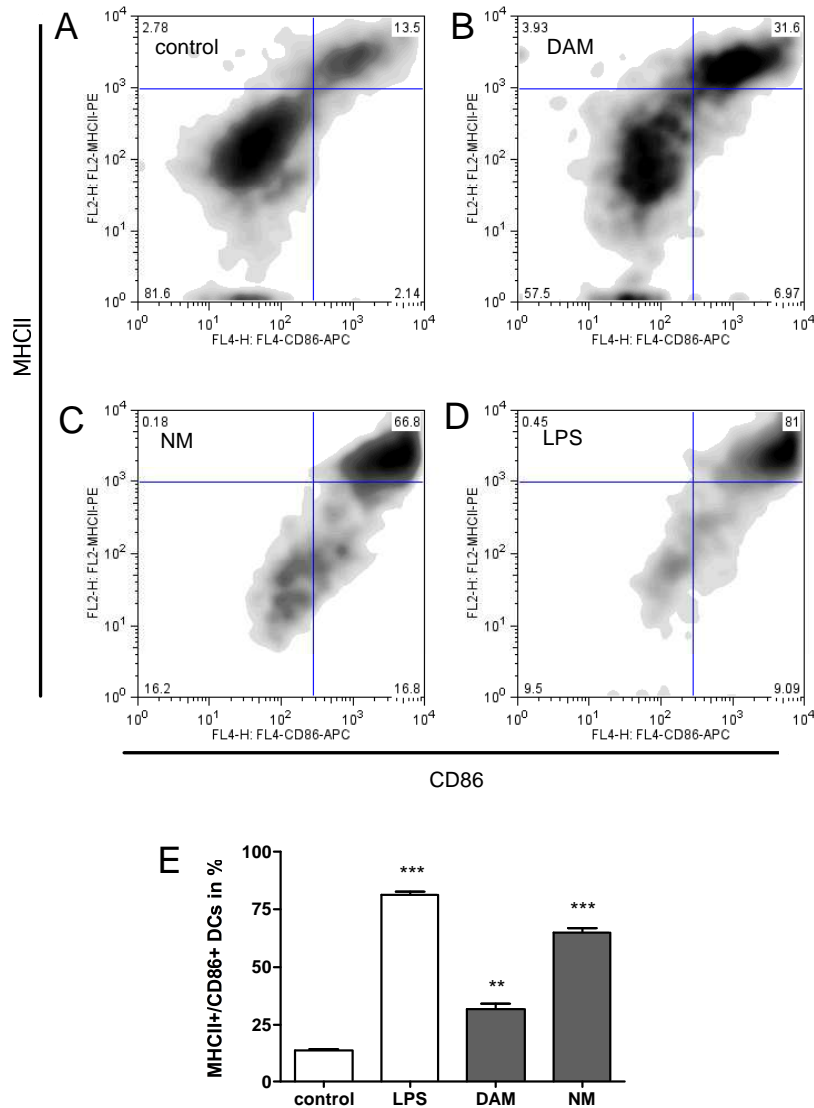


Abb. 6.1.3.1: mDZ werden durch die Phagozytose von NM aktiviert

Unreife mDZ wurden an Tag 8 ihrer Entwicklung 48 h mit NM #3, DAM #5 und LPS inkubiert. Die Melanine wurden LPS-frei getestet. Die Oberflächenmoleküle CD11c, MHC II und CD86 wurden mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt. CD11c⁺ mDZ wurden eingegrenzt und deren Fluoreszenzen für MHC II (nach oben) und CD86 (nach rechts) in einem „density-plot“ dargestellt. Die Konzentration von LPS betrug 0,5 mg/ml. Die von DAM und NM 0,05 mg/ml. (***) vs. control, p < 0.001; ** vs. control, p = 0.0013) (135).

Unbehandelte mDZ (A) zeigen im Versuch Abb. 6.1.3.1 eine geringe Voraktivierung die durch eine kleine Population von MHC II^{high} Molekülen gekennzeichnet ist. DAM behandelte mDZ (B) zeigen einen Anstieg des Anteils MHC II/ CD86-positiver Zellen. NM behandelte mDZ (C) zeigen eine ähnlich starke MHC II/ CD86-Expression wie die positive Kontrolle mit

LPS (D), was auf eine Aktivierung der mDZ durch NM schließen lässt. Die Aktivierung der mDZ ist bei NM signifikant (E).

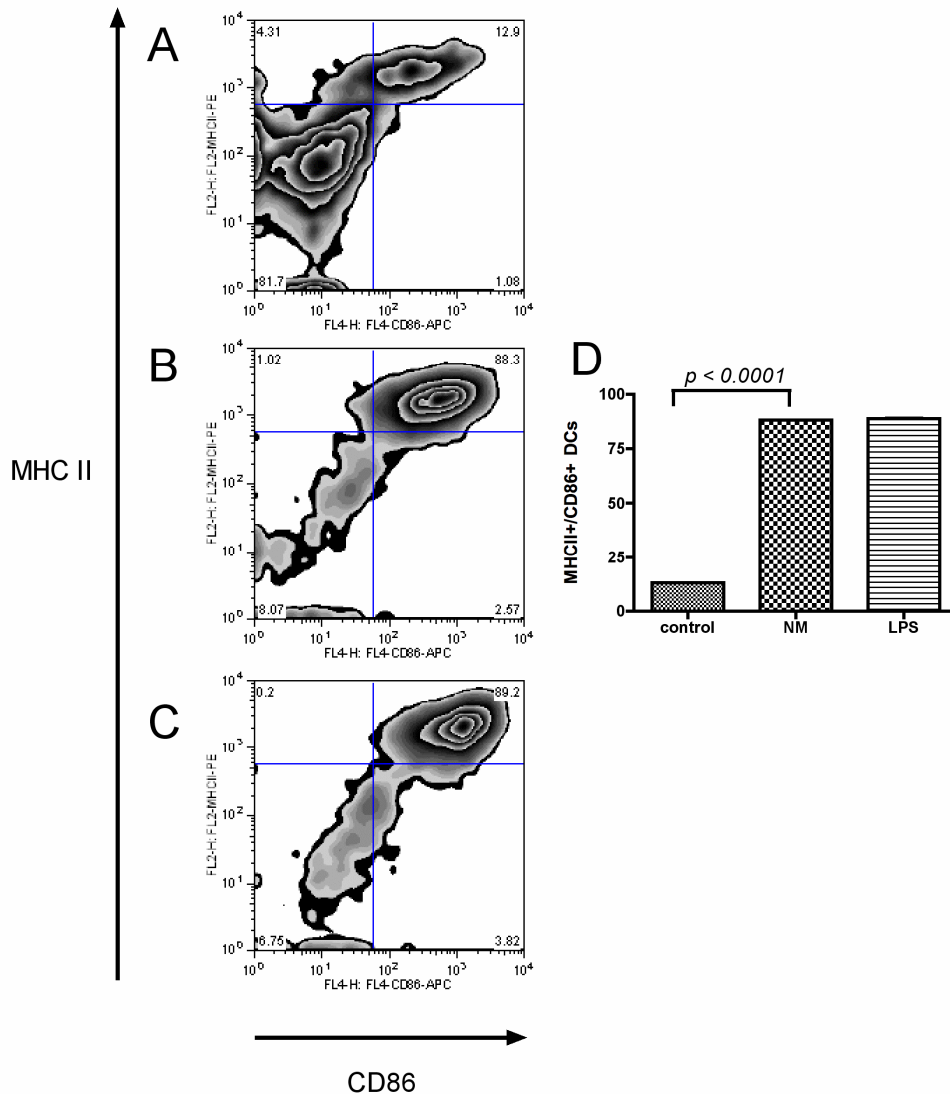


Abb. 6.1.3.2: mDZ werden durch Phagozytose von NM aktiviert

Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer Wiederholung des Experimentes von Abb. 6.1.3.1 ohne DAM.

Auch im Versuch Abb. 6.1.3.2 ist zu erkennen, dass NM die mDZ spontan reifen lässt (B). Unreife mDZ im unteren linken Quadranten (A) befinden sich nach der Behandlung mit NM und LPS oben rechts (B und C), d.h. das antigenpräsentierende Molekül MHC II und der kostimulatorische Komplex CD86 wurden wie bei einer inflammatorischen Aktivierung mit LPS (C) verstärkt auf der mDZ Oberfläche exprimiert. Die Aktivierung der mDZ durch NM ist auch hier signifikant (D).

6.1.4 DAM zeigt auch bei hDZ keine Wirkung

Für eine durch NM verursachte inflammatorische Antwort im menschlichen Organismus ist natürlich die Reaktion von humanen DZ entscheidend. Deshalb wurden aus humanen Blutproben PBMC isoliert und diese in Kultur zu unreifen hDZ ausdifferenziert. hDZ wurden mit CD11c gefärbt und eingegrenzt. Die Zugabe von DAM bewirkte wie bei den mDZ keine vermehrte MHC II/ CD86-Expression. Allerdings ist auch die Aktivierung durch LPS für eine Immunreaktion ungewöhnlich niedrig und erreicht für MHC II gerade den doppelten Wert der Kontrolle. Außerdem wurde durch LPS keine CD86-Expression ausgelöst (Abb. 6.1.4.1). Deswegen ist der Erfolg der hDZ-Kultivierung fraglich. Versuche mit NM wurden deshalb kaum unternommen.

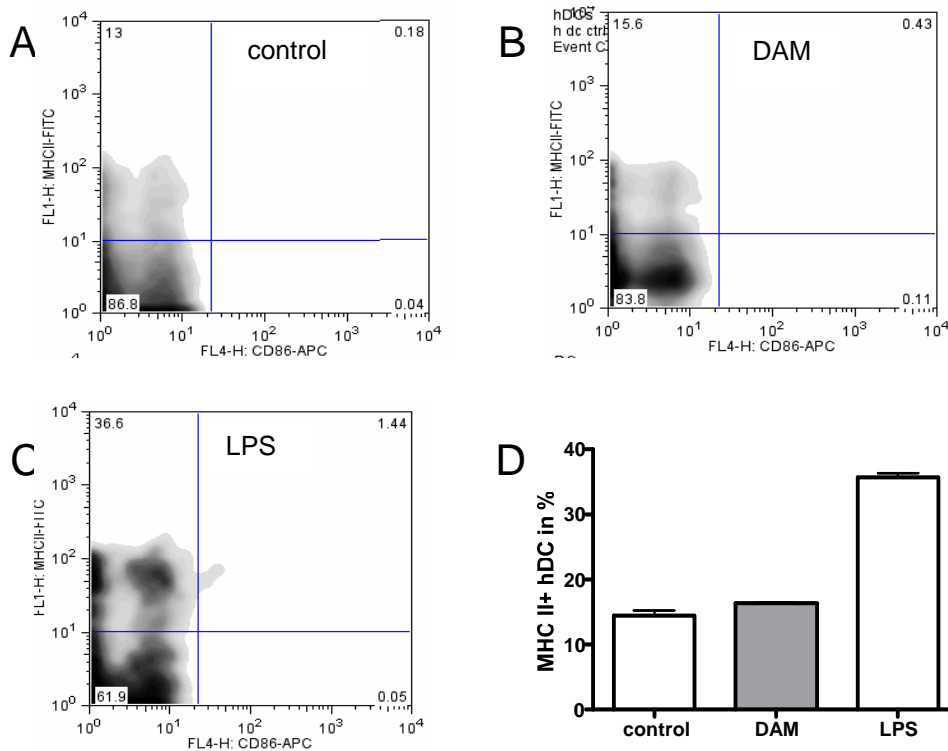


Abb. 6.1.4.1: hDZ ließen sich durch DAM nicht aktivieren

hDZ wurden nach 3.3.9 B) generiert und 48 h mit DAM #5 inkubiert. Die CD11c⁺ hDZ Population wurde eingegrenzt und ihre Fluoreszenzen von MHC II (nach oben) und CD86 (nach rechts) dargestellt. (A) Unbehandelte hDZ. (B) hDZ mit DAM. (C) hDZ mit LPS. (D) Zeigt die Triplikate des Versuchs zusammengefasst in einem Säulendiagramm.

6.1.5 NM stimuliert die Ausschüttung von IL-6 und TNF- α bei mDZ

Für eine vollständige Aktivierung einer Effektor-TZ durch eine DZ ist die Ausschüttung von stimulierenden Zytokinen erforderlich. Sowohl IL-6 als auch TNF- α sind als stimulierende Faktoren für die T-Zellproliferation bekannt, und in eine Reihe immunologischer Mechanismen involviert die zu einer chronischen Inflammation führen können. mDZ wurden in Kultur mit Melaninen versetzt und das Medium nach 48 h mit einem TNF α - bzw. IL-6-ELISA Assay analysiert. Nur durch NM aktivierte mDZ, nicht aber DAM-behandelte Zellen, konnten hohe Konzentrationen beider Zytokine ins Medium abgeben (Abb. 6.1.5.1 und 6.1.5.2) (135).

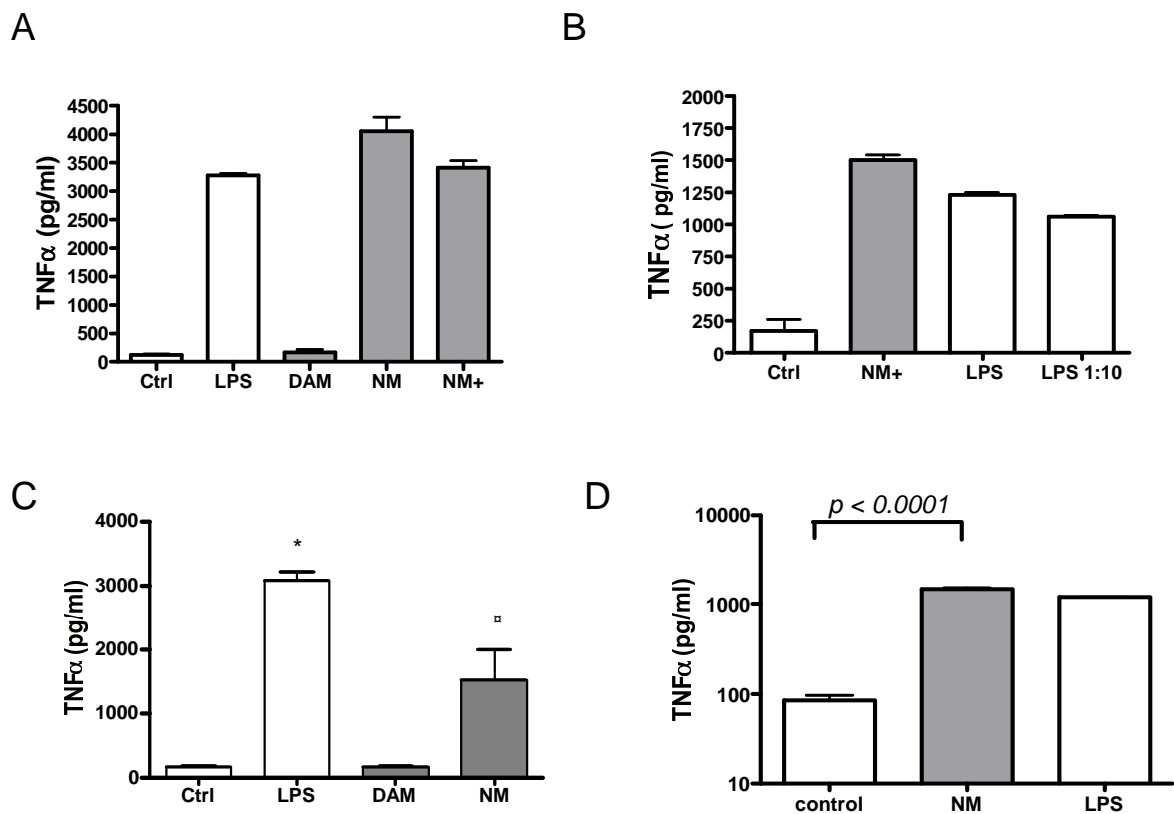


Abb. 6.1.5.1: NM regt die Ausschüttung des Zytokins TNF- α bei mDZ an

mDZ wurden 48 h mit DAM, NM, NM+ und LPS behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen für 3 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und mit dem Überstand ein ELISA durchgeführt. Für den Versuch wurde das TNF- α ELISA Kit, OptEIA™ von BD Biosciences verwendet. Alle Abbildungen stellen Einzelversuche mit Triplikaten dar, wenn nicht anders angegeben. **(C)** zeigt eine Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten mit Triplikaten (* *p* < 0.0001; Ctrl = control)

Der Versuch in Abb. 6.1.5.1 zeigt, dass DAM keinen Einfluss auf die TNF- α Ausschüttung der mDZ hat **(A)**. Der Unterschied zwischen NM und NM+ ist zwar signifikant **(A)**, konnte aber nach mehreren Versuchen nicht genauer bestimmt werden. Mal produzierten NM+

behandelte mDZ mehr TNF- α , mal NM behandelte. Beide jedoch immer sehr viel mehr als DAM und ähnlich viel wie die LPS + Kontrolle. Auch die Verdünnung von LPS auf dieselbe Konzentration wie die Melanine (0,05 mg/ml) zeigte im Bezug auf TNF- α keinen deutlichen Unterschied **(B)**.

Bei DAM-behandelten Zellen zeigte sich in mehreren Versuchen kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen **(A und C)**. Die detektierte Menge TNF- α schwankt bei NM und NM+ behandelten DZ zwischen 1000 **(A)** und 4000 pg/ml **(B und D)** und ist mit dem Effekt von LPS (0,5 mg/ml) vergleichbar.

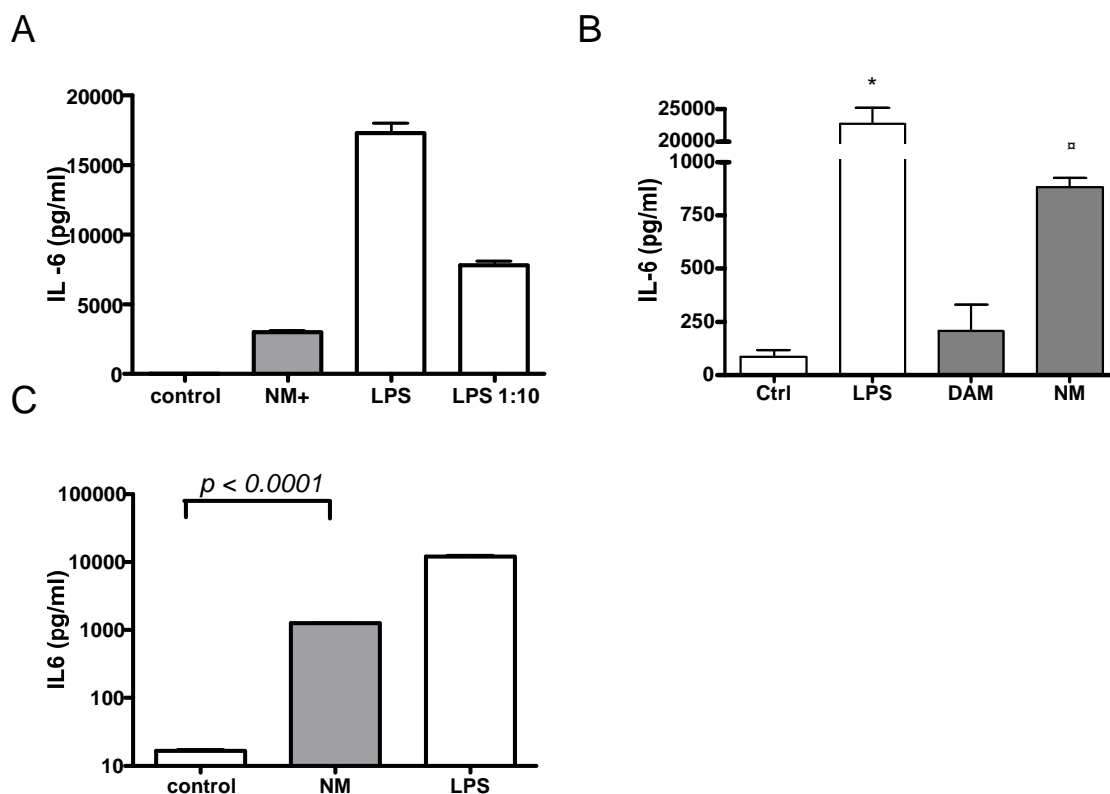


Abb. 6.1.5.2: NM und NM+ regt die Ausschüttung von IL-6 bei mDZ an

Der gezeigte Versuch entspricht dem aus Abb. 6.1.5.2. Nur wurde hier das ELISA Kit, OptEIA™ für IL-6 verwendet. Alle Abbildungen stellen Einzelversuche mit Triplikaten dar, wenn nicht anders angegeben. Im Diagramm **(B)** wurden zwei unabhängige Experimente mit Triplikaten zusammengefasst (* *p* < 0.0001).

Im Vergleich zu TNF- α wird sehr viel mehr IL-6 von den aktivierten mDZ ins Medium abgegeben (Abb. 6.1.5.2). In **(A)** ist die „control“ im Verhältnis zu der von LPS hervorgerufene Menge an IL-6 verschwindend gering. DAM hat wie schon im TNF- α -ELISA zu sehen, keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion von mDZ **(B)**. Auch das Proteinase

behandelte NM+ ruft eine ähnlich hohe IL-6 Produktion wie NM hervor (**A und B**). Die Menge von sezerniertem IL-6 bei NM (0,05 mg/ml) blieb auch bei mehreren Versuchen annähernd konstant um 1000 pg/ml und ist damit im Schnitt etwa 10-mal niedriger als bei LPS (0,5 mg/ml).

6.1.6 Mit NM behandelte mDZ lassen T-Zellen proliferieren

Wie aus den vorangegangenen Versuchen abzuleiten ist, haben mit NM behandelte mDZ theoretisch die Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren. Dies sollte nun konkret in einer *mixed lymphocyte reaction* (MLR) getestet werden, indem aktivierte DZ zu allogenen TZ gegeben wurden. Zunächst einmal musste eine für den Versuch geeignete Zellzahl an DZ ermittelt werden (Abb. 6.1.6.1). Die T-Zellproliferation wird entlang der Y-Achse in *counts per minute* (cpm) dargestellt, welche mit der Zahl neu eingebauter radioaktiv markierter Thymidine in den proliferierenden T-Zellen (TZ) korreliert. Als TZ-Quelle wurden Lymphozyten verwendet, die frisch aus den Lymphknoten einer Maus präpariert wurden. Die Zahl der verwendeten Lymphozyten variierte je nach Ausbeute zwischen 2×10^6 und 4×10^6 pro Ansatz. Außerdem musste die optimale Dauer des Experimentes bestimmt werden (Abb. 6.1.6.2). Dafür wurde eine MLR vierfach angesetzt und zwischen 24-96 h inkubiert. Schließlich konnten mit NM-behandelte mDZ eine signifikante Proliferation von mTZ auslösen (Abb. 6.1.6.3).

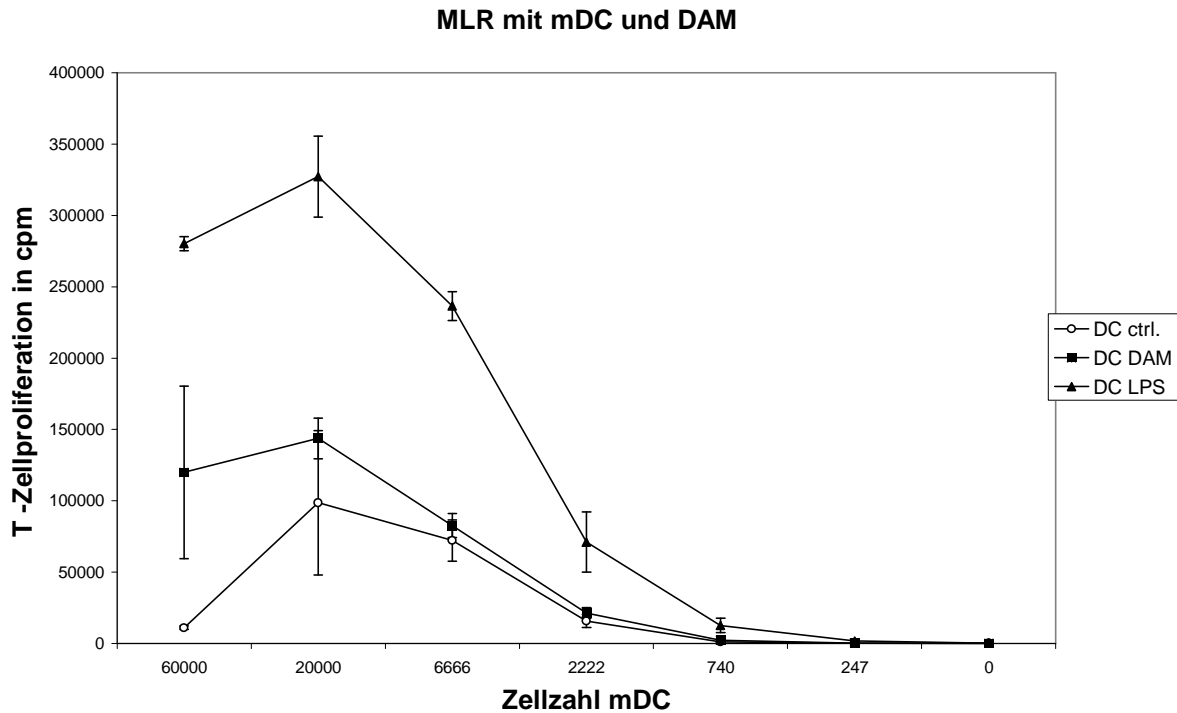
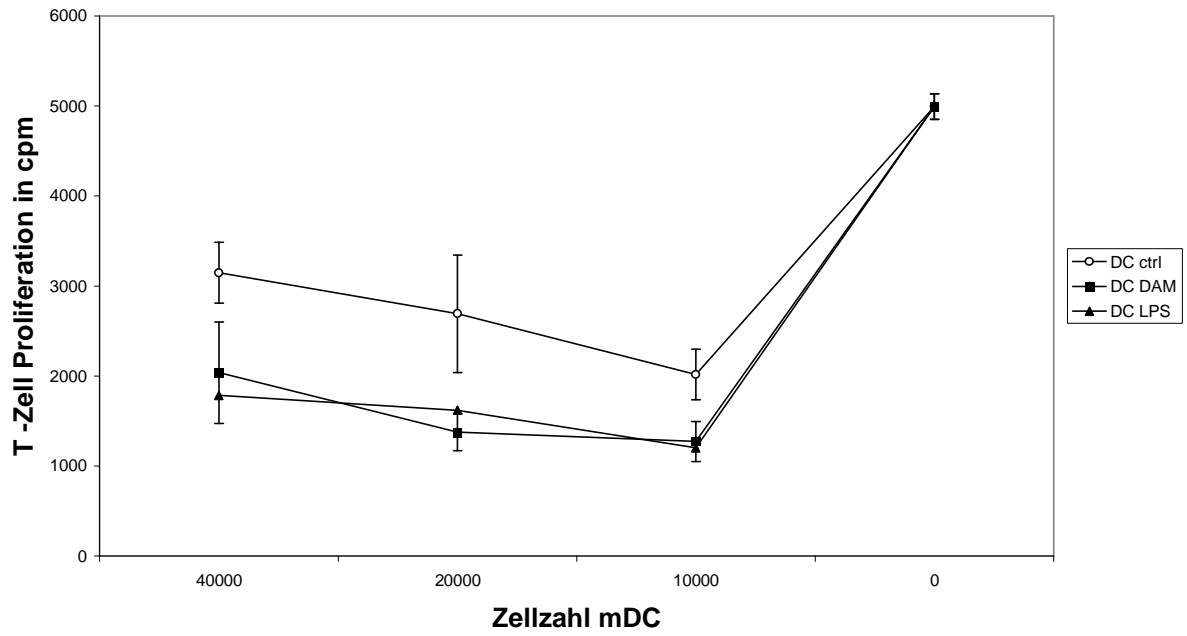
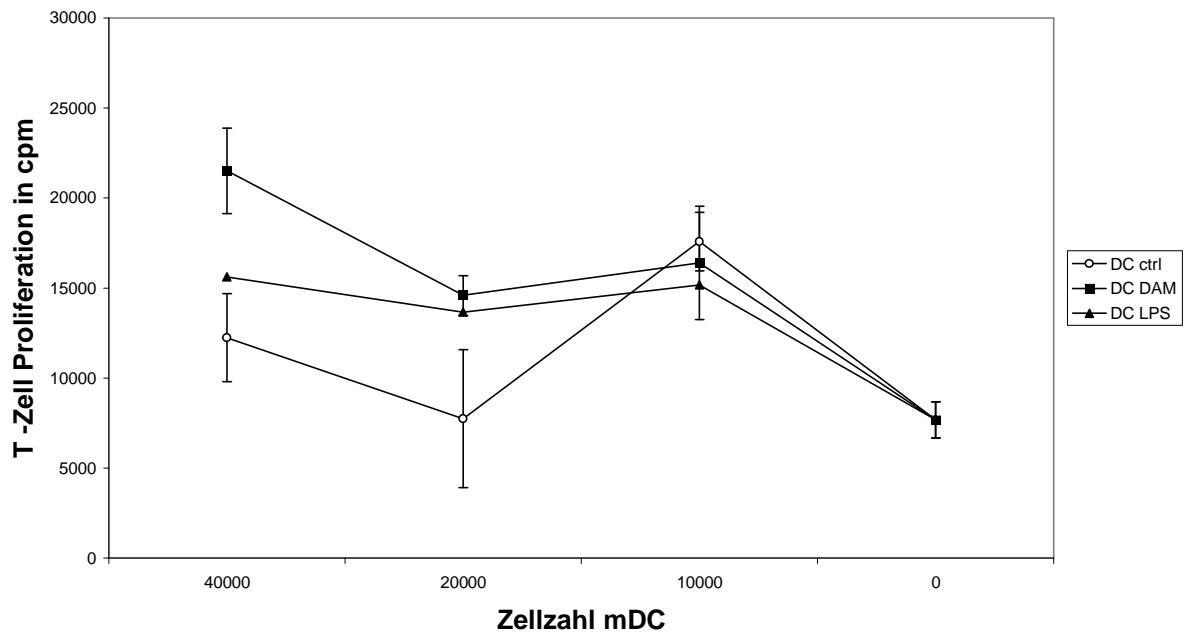


Abb. 6.1.6.1: Titration von murinen DZ für die MLR

Die mDC einer C57BL/6 Maus wurden mit DAM und LPS stimuliert und 48 h später geerntet. Die Zahl der mDC wurde ausgehend von 6×10^5 jeweils halbiert und zusammen mit je 4×10^6 frisch präparierten Lymphozyten einer BALB/c Maus in Triplikaten auf einer 96-Lochplatte für 72 h inkubiert. Anschließend wurde [^3H]methyl-thymidine ($1 \mu\text{Ci/well}$) zugegeben und die T-Zellproliferation am darauf folgenden Tag gemessen. Der Nullwert entspricht der Lymphozyten Kontrolle.

Die mit LPS behandelten, positiven Kontroll-DZ (DC LPS) regen die allogenen TZ ab einer Zellzahl von 20000 DZ deutlich zur Proliferation an. Zwischen den mit DAM behandelten DZ (DC DAM) und der negativen Kontrolle (DC ctrl.) ist bei dieser Zellzahl kein signifikanter Unterschied ersichtlich. Die kaum vorhandene Standardabweichung bei 60000 DZ (LPS und ctrl.) deutet auf den Tod der Kontrollzellkulturen hin, sodass kein Vergleich zu DZ DAM möglich war.

A**MLR mit mDC und DAM nach 24 h****B****MLR mit mDC und DAM nach 48 h**

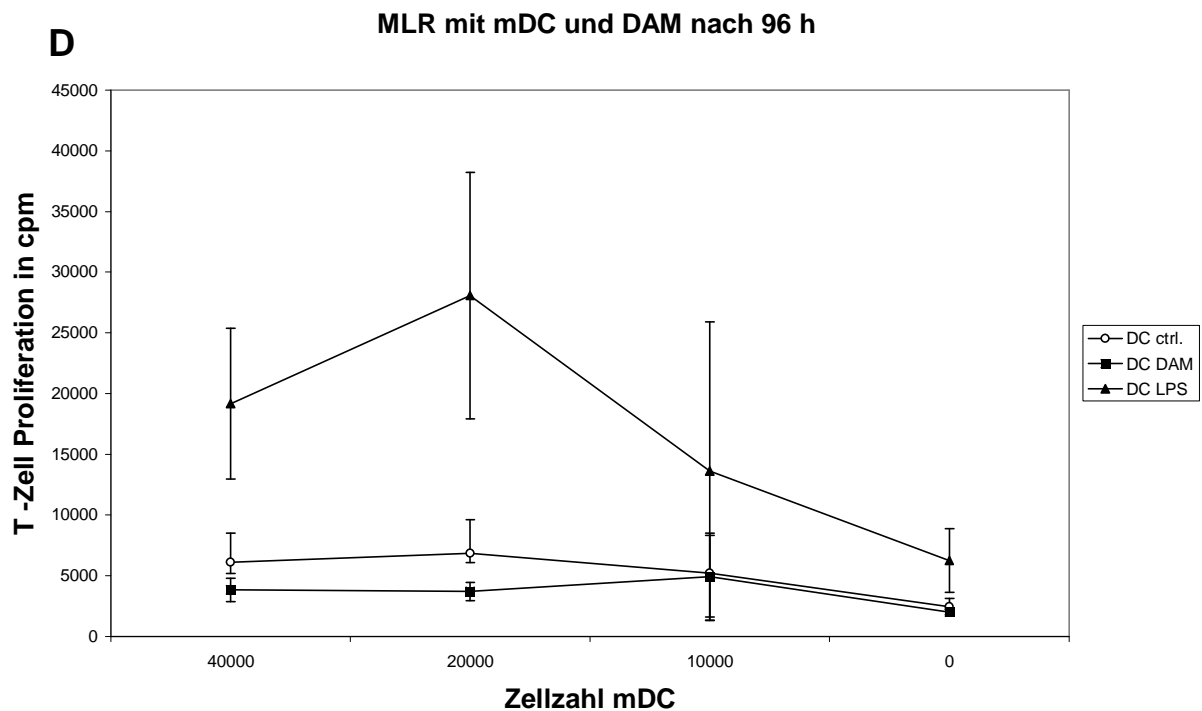
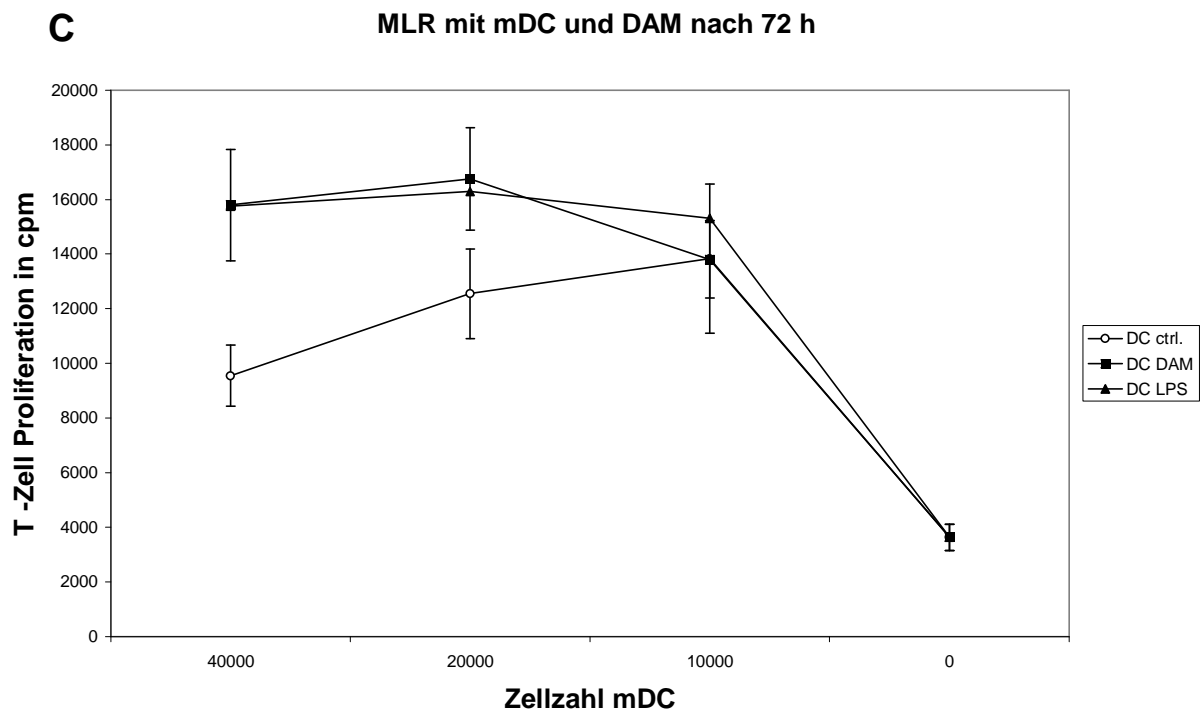


Abb. 6.1.6.2: TZ zeigen in einer MLR nach 72 h die größte Proliferation

Eine MLR unter den gleichen Bedingungen wie das Experiment aus Abb. 6.1.6.1 wurde über einen Zeitraum von 4 Tagen durchgeführt. Für jeden Tag wurde eine 96-Lochplatte verwendet. Es wurden 2×10^6 Lymphozyten pro Well eingesetzt. Nach je 24 h (A), 48 h (B), 72 h (C) und 96 h (D) wurde [^3H]methyl-thymidine (1 $\mu\text{Ci/well}$) zugegeben.

Die Proliferation von allogenen T-Zellen steigert sich bei DAM DZ und LPS DZ bis 72 h **(C)** und bricht nach 96 h Inkubation wieder ein. Zusätzlich nimmt die Standardabweichung nach 96 h stark zu. Die TZ Proliferation ist deshalb nach 72 h am besten messbar. Allerdings ist die + Kontrolle mit LPS im Vergleich zum vorherigen Versuch deutlich geringer und deshalb ist die scheinbare Aktivierung durch DAM DZ nach 72 h fraglich.

Nachdem die Bedingungen des Experimentes festgelegt waren, wurden mehrere Versuche mit DAM und NM behandelten mDZ durchgeführt. Zunächst wurde die Reifung der behandelten DZ-Kulturen im FACS überprüft (Abb. 6.1.3.1). In dem überstehenden Medium wurde mittels ELISA die Konzentration von TNF α und IL-6 bestimmt (Abb. 6.1.5.1 und 6.1.5.2). Anschließend wurde eine MLR mit frisch präparierten Mauslymphozyten angesetzt und 72 h im Brutschrank inkubiert (Abb. 6.1.6.3).

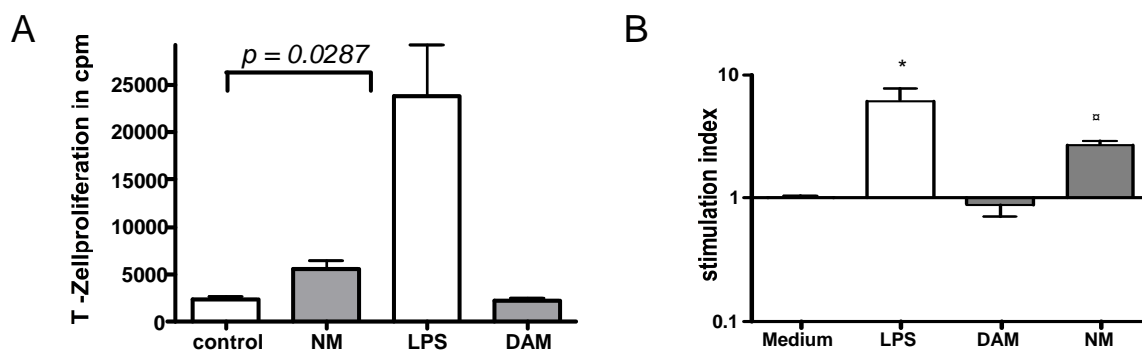


Abb. 6.1.6.3: Durch NM aktivierte mDZ regen die Proliferation von T-Zellen in einer MLR an

(A) zeigt eine T-Zellproliferation von zwei unabhängigen MLR-Versuchen über 72 h. Triplikate mit 4×10^5 mDZ und $3,5 \times 10^6$ Lymphozyten (T-Zellen). T-Zellen der BALB/c Maus wurden durch NM-behandelte mDZ einer C57BL/6 Maus zur Proliferation angeregt (135).

Bei der Inkubation mit DAM zeigen die mDZ keinen Unterschied zu unbehandelten mDZ.

Durch die Berechnung eines Stimulationsindex (cpm Kultur / cpm Kontrolle; * $p < 0.0001$) wird der Unterschied zwischen DAM und NM deutlicher **(B)**.

Eine Proliferation von hTZ durch NM-behandelte hDZ konnte nicht beobachtet werden. Aufgrund der FACS-Ergebnisse (Abb. 6.1.4.1), wurden kaum Versuche mit NM durchgeführt. Eine Behandlung der hDZ mit DAM scheint die Proliferation zu inhibieren (Abb. 6.1.6.4).

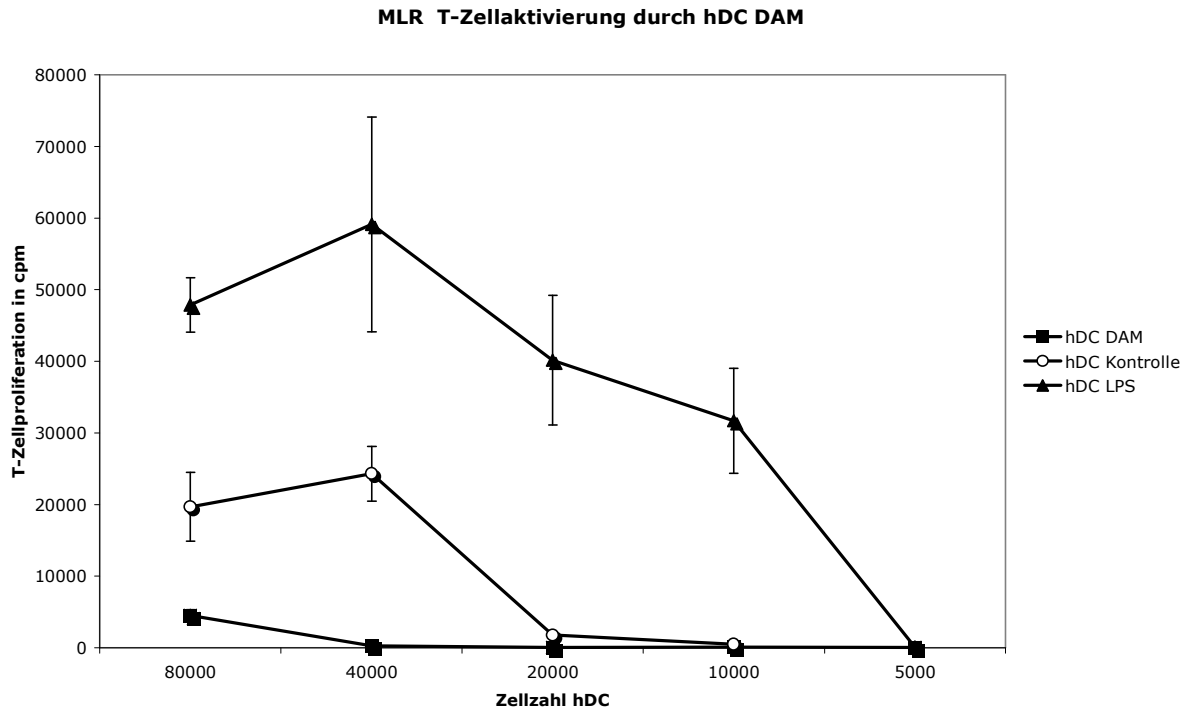


Abb. 6.1.6.4: Mit DAM behandelte hDC aktivieren keine T-Zellen

hDC wurden für 48 h mit und ohne DAM inkubiert. Die so behandelten hDC wurden in einer Verdünnungsreihe in Triplikaten auf eine 96-Lochplatte gegeben und zusammen mit je 4×10^6 aufgetauten Leukozyten einer früheren PBMC-Isolierung für 72 h inkubiert. Einen Tag nach der Zugabe von [³H]methyl-thymidine (1 µCi/well) wurde der Einbau der radioaktiven Thymidine gemessen.

Mit DAM behandelte hDC konnten humane T-Zellen nicht zur Proliferation anregen. Die Behandlung der hDC mit DAM hat einen negativen Effekt auf die Proliferation. Die cpm-Werte sind niedriger als die der Kontrolle mit unbehandelten hDC (Abb. 6.1.6.4). Die hier verwendeten hDC wurden auch gefärbt und im FACS untersucht (Abb. 6.1.4.1)

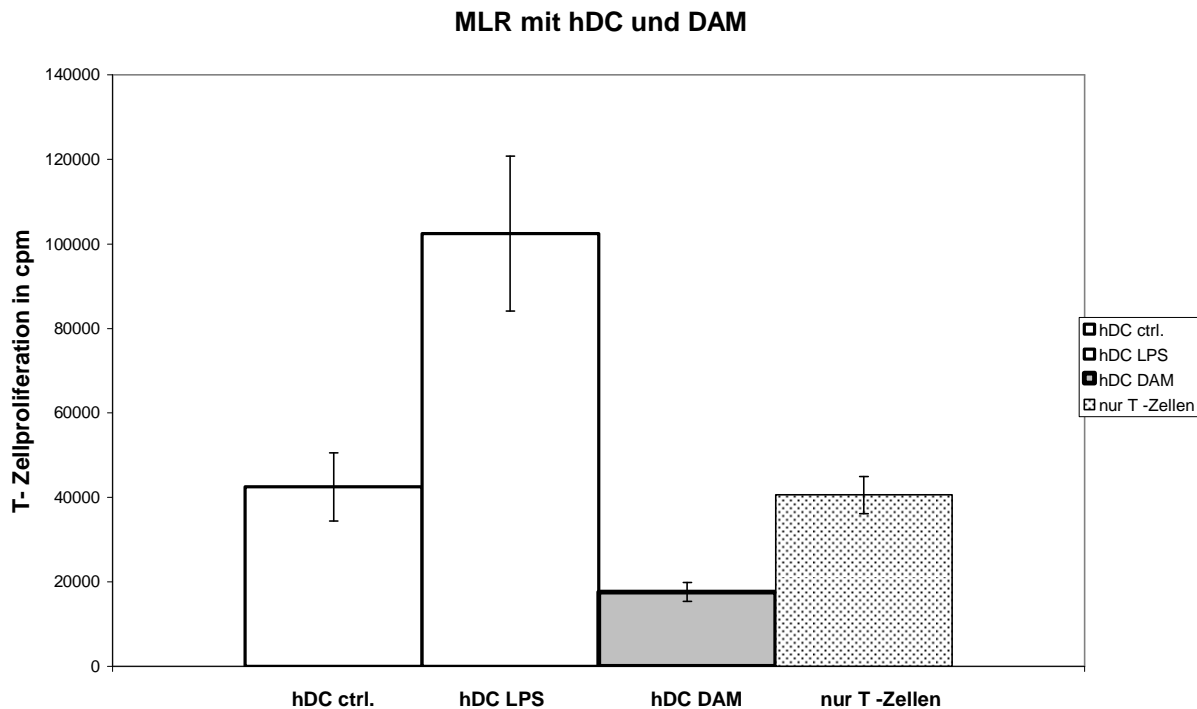


Abb. 6.1.6.5: DAM hemmt die Proliferation von T-Zellen

hDC wurden 48 h mit DAM und LPS inkubiert. Je 8×10^5 hDC wurden nach der Ernte in Triplikaten auf einer 96-Lochplatte ausgesät und zusammen mit 4×10^6 aufgetauten Leukozyten eines anderen Spenders für 72 h im Brutschrank inkubiert. Zu den Zellen wurde [3 H]methyl-thymidine (1 μ Ci/well) pipettiert und die T-Zellproliferation an Tag 4 gemessen. Der Versuch wurde zweimal wiederholt und das Ergebnis in einem Säulendiagramm zusammen gefasst dargestellt.

Der Versuch (Abb. 6.1.6.5) bestätigte das Ergebnis von Abb. 6.1.6.4. Unreife, nicht behandelte hDC (hDC ctrl.) haben keine Wirkung auf die hTZ-Proliferation. Die gemessenen cpm-Werte entsprechen der Proliferationskontrolle mit hTZ ohne hDC und DAM (rechts). Beim Einsatz von DAM-behandelten hDC (hDC DAM) sinkt die Zahl der radioaktiv markierten T-Zellen. Die TZ-Proliferation wird durch DAM scheinbar gehemmt. Durch die Zugabe von LPS zu den hDC wurde nur eine geringe Proliferation der hTZ erreicht, welche sich in einer Verdoppelung des cpm-Wertes ausdrückt.

Um eine mögliche Zytotoxizität von DAM nach den vorangegangenen Ergebnissen zu untersuchen, wurde zu einer abnehmenden Konzentration von DAM eine Konstante Menge LPS gegeben (Abb. 6.1.6.6). Erst bei einer 10-mal geringeren DAM-Konzentration als bei den mTZ erholte sich die LPS-induzierte Proliferation. DAM selbst löste keine Proliferation aus.

Zytotoxizität von DAM in MLR

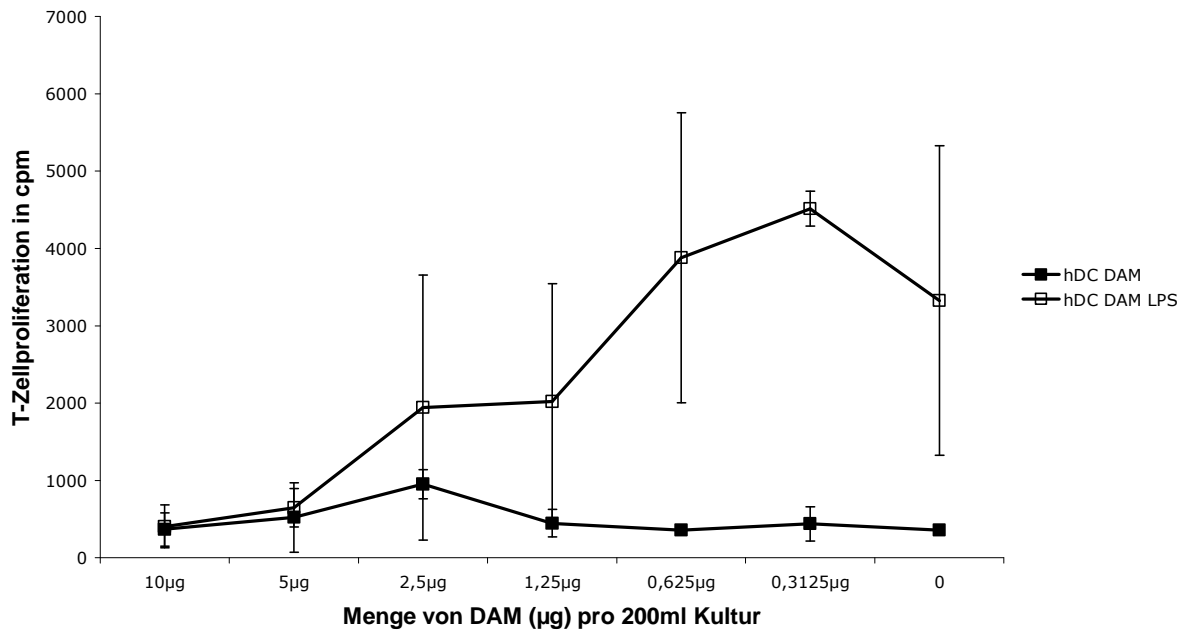


Abb. 6.1.6.6: DAM inhibiert die hTZ-Proliferation durch LPS

Von einer hDZ-Kultur wurden an Tag 5 ihrer Generierung je 4×10^5 /Well in Triplikaten auf eine 96-Lochplatte gegeben. Von DAM wurde eine Verdünnungsreihe, ausgehend von der sonst üblich verwendeten Konzentration (0,05 mg/ml), pipettiert und dazugegeben. Die T-Zellen (4×10^6 /Well) einer früheren PBMC Isolierung wurden für den Versuch aufgetaut. Nach 72 h wurde gepulst und am darauf folgenden Tag die Proliferation gemessen.

6.2 In DAM-immunisierten Kaninchen konnten keine Anti-DAM-Antikörper nachgewiesen werden

Um einen diagnostischen Antikörper gegen DAM zu erhalten, immunisierte die Firma ImmunoGlobe im Auftrag Kaninchen mit DAM. Den immunisierten Tieren wurde nach sechs Wochen Blut entnommen und in einem Immunoassay zum Nachweis von Antikörpern gegen DAM getestet. Da es nicht gelang DAM auf eine 96-Lochplatte zu *coaten*, wurde der Immunoassay wie unter 5.6.2 beschrieben durchgeführt. Der ELISA mit DAM als stationärer Phase, blieb ergebnislos (Abb. 6.2.2). Auch mit einem einfachen Agglutinationstest konnten keine IgM gegen DAM in den Seren nachgewiesen werden (Abb. 6.2.1).

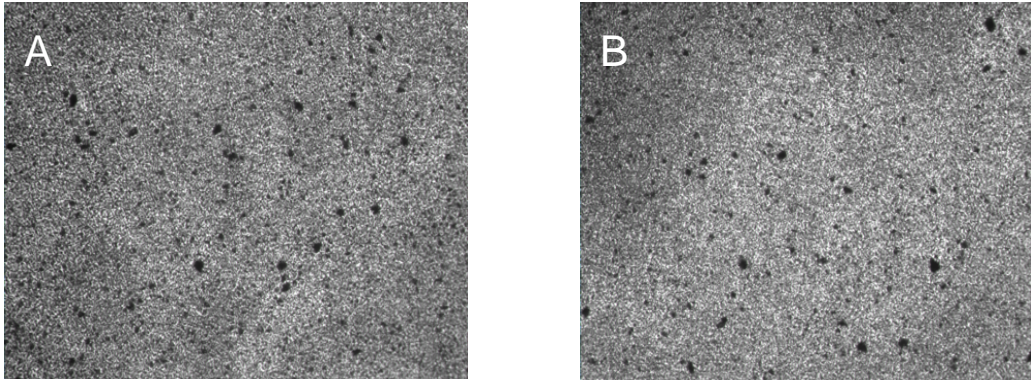


Abb. 6.2.1: Die Zugabe von DAM zu den Seren immunisierter Kaninchen zeigte keine Agglutination

(A) Zur Verdünnung (1:500) einer Serumprobe wurde DAM gegeben und der Ansatz nach 2 h Inkubation mit 400-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop betrachtet. Die Kontrolle (B) zeigt keine Agglutination von DAM durch Antikörper.

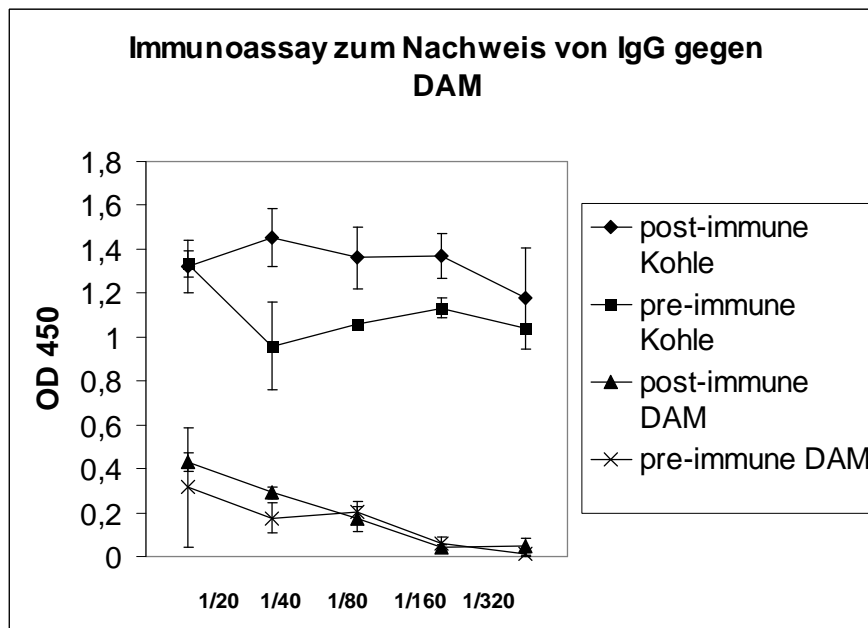


Abb. 6.2.2: Der Nachweis von spezifischen Antikörper gegen DAM bei immunisierten Kaninchen gelang nicht

Entlang der Y-Achse ist die gemessene optische Dichte (OD) bei 450 nm angegeben. Auf der X-Achse ist die Verdünnungsreihe der Serumprobe dargestellt. Jeder Punkt der Reihe stellt ein Triplikat der jeweiligen Serumverdünnung dar.

Bei dem Assay in Abbildung 6.2.2 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Serum-Kontrolle (pre-immune) und der finalen Serumprobe (final) festgestellt werden. Der Test wurde mit Seren verschiedener Tiere durchgeführt und führte jedes Mal zu demselben Ergebnis. Aktivkohle diente als Vergleich zu DAM betreffend seiner Adsorptionsfähigkeit gegenüber Biomolekülen.

6.3 Die Plasmidklonierungen für ein AAV basiertes *in vitro*-Testsystem zum Abbau von A β durch hIDE

Um den Abbau von A β durch hIDE *in vitro* studieren zu können, mussten zunächst einige virale Plasmide kloniert und eine APP-exprimierende Testzelllinie erzeugt werden. Die Zelllinie sollte die Proteine APPwt (wt =Wildtyp) und APPsw (sw =schwedische Mutation) kontinuierlich und stabil exprimieren. Dafür wurden die DNA-Sequenzen der beiden APP-Proteine in jeweils einen foamyviralen Vektor (BF014) kloniert. Am Ende der beiden APP-Sequenzen wurde ein FLAG- oder His-Tag angehängt, um die Expression beider Proteine mittels Western Blot quantifizieren zu können (Abb. 6.3.1.1). Anschließend wurden die fertigen BF014-Plasmide zusammen mit gag, pol, env (foamyvirale Helferplasmide) in 293T Zellen transfiziert und erfolgreich transformierte Zellen im FACS über das *green fluorescent protein* (GFP) aussortiert. Die Expression von APP wurde mittels Western Blot von Johannes Alexander in seiner Diplomarbeit überprüft und war erfolgreich. GFP-positive Zellen wurden weiter kultiviert, passagiert und schließlich zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

6.3.1 Klonierung von BF014-hAPP

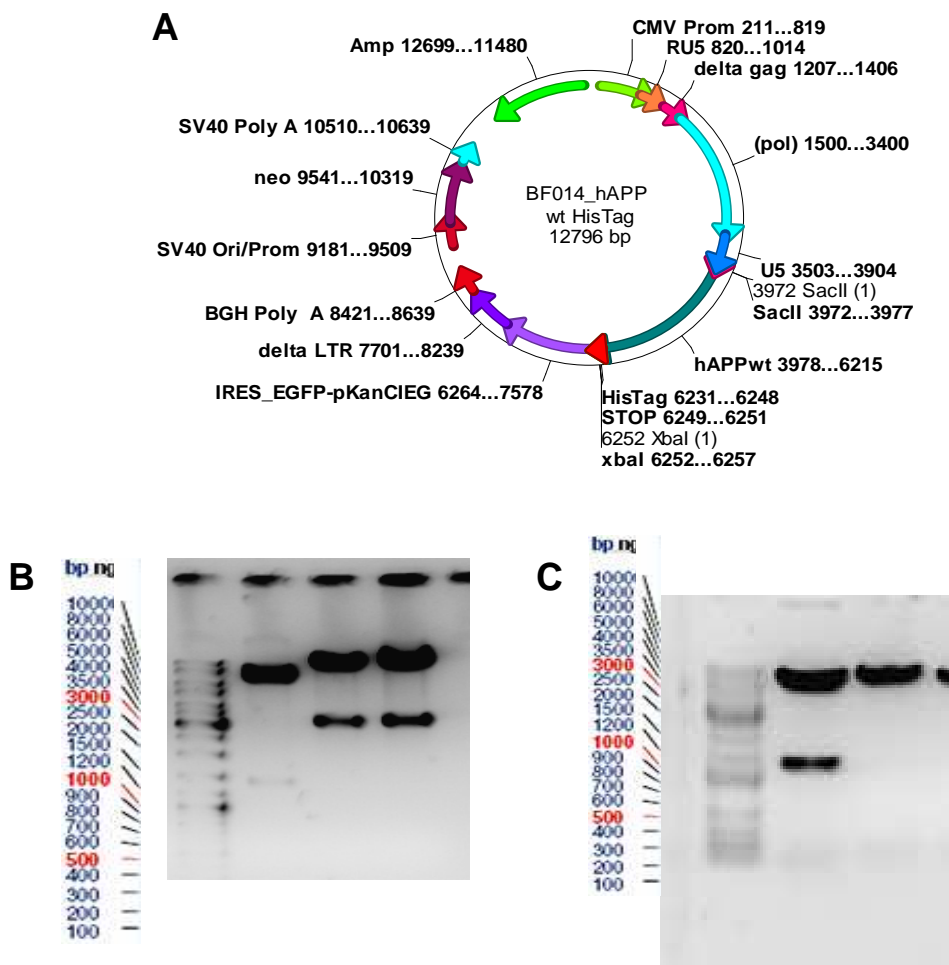
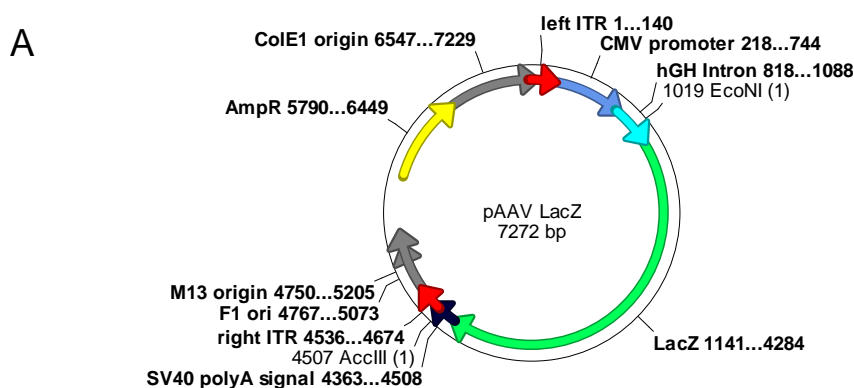


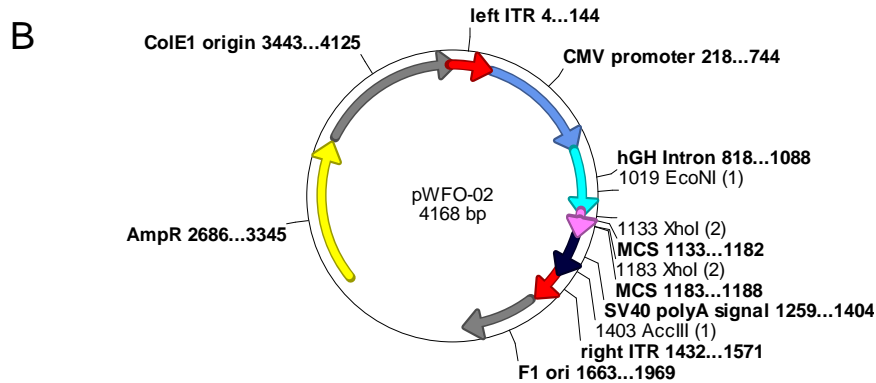
Abb. 6.3.1.1: Für die Herstellung einer hAPP exprimierenden Zelllinie wurde das foamyvirale Plasmid BF014–hAPP kloniert

hAPP wurde über die Schnittstellen SacII und XbaI in drei verschiedenen Versionen in das Foamyvirale Plasmid BF014 hinein ligiert. Und zwar der Wildtyp (wt) von hAPP sowie dessen Sequenz mit der schwedischen Mutation (sw). Stellvertretend ist hier die Plasmidkarte von BF014-hAPP wt-His-Tag abgebildet. Im Gelbild (1% Agarosegel) des Kontrollverdaus (**A**) zu sehen: v.l.n.r.: Gene Ruler Mix; pAAV-hIDE-mRFP; BF014-hAPPwt-His-Tag; BF014-hAPPsw-His-Tag Die Vektoren BF014 wurden mit EcoRI kontrollverdaut und die gewünschten Fragmente 1) 9692 bp und 2) 3104 bp erhalten. Die Richtigkeit der hAPP Sequenzen wurde in einer Sequenzierung bestätigt. **B**) V.l.n.r.: MassRuler High Range; BF014-hAPPsw-FLAG. Das BF014 Plasmid wurde mit EcoRI kontrollverdaut und die zu erwartenden Fragmente erhalten.

6.3.2 Klonierung von pAAV-hIDE-mRFP

Die nächste Komponente des A β -Testsystems ist ein AAV-hIDE-Expressionsplasmid. Aus Gründen der niedrigen Verpackungskapazität von AAV, wurde als Ausgangsplasmid das pAAV-LacZ-Plasmid aus dem Stratagen *helper-free Kit* gewählt. Durch die Entfernung der LacZ-Sequenz sollte ein möglichst kleines AAV-*backbone* erzeugt werden, das genügend Platz für die Einfügung der hIDE-Sequenz und des Reportergens mRFP (*monomeric red fluorescent protein*) bietet. Die Klonierung erfolgte in drei Schritten. Erstens wurden mit Hilfe zweier Primerpaare kurze Verbindungsstücke (Linker) erzeugt, die einerseits zur Elimination von LacZ führt und andererseits eine neue XbaI-Schnittstelle beinhaltet. Zweitens wurde über XbaI eine *multiple cloning site* (MCS) eingefügt (Abb. 6.3.2.1). Drittens wurde die Sequenz von hIDE in die neue MCS ligiert (Abb. 6.3.2.2).





1)

pAAV_fw_EcoNI: 5'- CAGCT**CCTGGAGCAGGG**AG
pAAV_rv_XbaI: 5'-GCT**CTAGATGCTTTAGCAGGCTCTTT**CG

2)

pAAV_fw_XbaI: 5'-GCT**CTAGAGCCATGTCTGCCCGTATTT**C
pAAV_rv_AccIII: 5'-GTG**TCCGGAGATCCAGACATGATA**AG

MCS

5'-CTAGACTCGAGAGCGCTAAGCTAGCGTTTAAACGAATTCAAGGATCCGCAAGCTTT

Schnittstellen in 5`-3`-Richtung:

XhoI, Eco47III, BlnI, DraI, EcoRI, BamHI, HindIII

Abb. 6.3.2.1: Aus dem Plasmid pAAV-LacZ wurde LacZ entfernt und durch eine MCS ersetzt

Aus dem Plasmid pAAV-LacZ (**A**) wurde die Sequenz von LacZ folgendermaßen entfernt und durch eine *multiple cloning site* (**MCS**) ersetzt. Mit dem Primerpaar **1**) wurde aus dem hGH-Intron heraus ab EcoNI bis kurz vor LacZ ein erster Linker erzeugt. Ähnlich mit dem Primerpaar **2**) in Gegenrichtung ab der Schnittstelle für AccIII, über die SV40 Poly A Signalsequenz, bis kurz vor LacZ. Die beiden Linker und das AAV-LacZ Plasmid wurden mit den entsprechenden Enzymen verdaut und in einer 3-Fragment Ligation zusammengefügt. Nach der Isolierung, dem Kontrollverdau, der Sequenzierung und der Maxipräparation wurde über die neue Schnittstelle XbaI eine MCS eingefügt. Für die MCS wurden zwei Polynucleotidsequenzen von Sigma verschmolzen. Das entstandene Plasmid pWFO-02 (**B**) wurde mit Hilfe von Conrad Weber und Bianca Fries kloniert.

In das Plasmid WFO-02 wurde in der Diplomarbeit von Patrick Neuenhöfer die DNA Sequenz von hIDE über die Schnittstelle XhoI hinein ligiert.

Die Funktion des Plasmids pAAV-hIDE wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Rhoda Busch überprüft. Anschließend wurde über BlnI und PmeI das Reporterogen mRFP in das Plasmid eingefügt (Abb. 4.2.3). Der Vektor wurde kontrollverdaut, sequenziert und in eine

293T Zelllinie transfiziert. Bei einer einfachen Transfektion des Plasmids leuchteten die Zellen im Fluoreszenzmikroskop rot. Die Verpackung des Plasmids in AAV-Partikel gelang nicht.

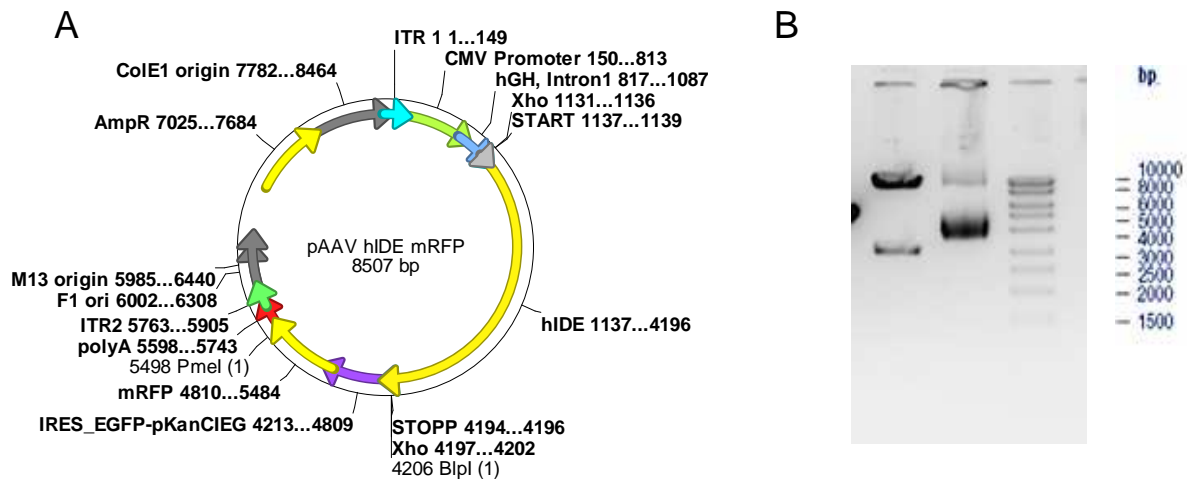


Abb. 6.3.2.2: In pAAV-hIDE wurde mRFP kloniert

Die Sequenz des Proteins mRFP (A) wurde über die Schnittstelle BlnI und ein *blunt end* (PmeI) in das Plasmid pAAV-hIDE ligiert. Auf dem Bild (1% Agarosegel) des Kontrollverdaus (B) zu sehen: v.l.n.r.: Gene Ruler DNA Mix; pAAV-hIDE-mRFP; unbekannt. Das Plasmid AAV wurde mit EcoRI kontrollverdaut und die zu erwartenden Fragmente 1) 7126 bp; 2) 1381 bp erhalten

7. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Themen bearbeitet. Hauptthema war die Untersuchung der immunstimulatorischen Effekte von NM auf dendritische Zellen (DZ) und deren mögliche Implikation auf die Pathogenese der Parkinson-Krankheit. Unterthema war die Klonierung eines viralen hIDE Vektors zum enzymatischen Abbau von A β für eine mögliche gentherapeutische Anwendung bei der Alzheimer Erkrankung.

7.1 Die Untersuchung der immunstimulatorischen Effekte von DAM und NM auf dendritische Zellen

7.1.1 Endotoxintest von DAM und NM

In dieser Arbeit wurde die immunogene Wirkung von DAM und NM auf DZ untersucht. Um auszuschließen, dass LPS-Verunreinigungen die Versuche stören, wurden verschiedene DAM- und NM-Proben mit Endotoxintests geprüft (5.7.5 und 6.1.1). Obwohl die chemischen Herstellungs- und Aufreinigungsprozesse von DAM und NM (136) (137) eine LPS-Verunreinigung unwahrscheinlich machen, könnte es beim Einwiegen der Melanine zu LPS-Kontamination kommen. Alle DAM- und NM-Suspensionen wurden deshalb nach dem Abwiegen autoklaviert. Auch das Mitführen von LPS als positive Kontrolle ist eine Kontaminationsgefahr. Hier kann eine nicht abgeworfene Pipettenspitze zu LPS-Verunreinigungen führen. Ein Endotoxintest müsste streng genommen daher vor jedem Versuch durchgeführt werden. Bei dem E-Toxate Test ist die Auswertung problematisch, da dem Benutzer im Bezug auf die Bildung des Geles viel Interpretationsspielraum gegeben ist. Vor allem wenn eine Mischung aus Gel und Flüssigkeit vorliegt. Im Manual wird angegeben, dass der Test als negativ zu bewerten ist, wenn sich das Gel durch umdrehen des Testgefäßes zerstören lässt. Wie vorsichtig man das tut und ob die Flüssigkeit in der unteren Hälfte des Röhrchens den Geldeckel dabei durchbricht, beeinflussen die Auswertung.

Aus diesem Grund wurden die Melaninproben zusätzlich mit einem chromatischen LAL QCL-1000 Test von Lonza geprüft. Eine LPS-Kontamination wird hier durch einen Farbumschlag angezeigt, dessen Intensität im ELISA-Reader bei 405 nm gemessen wird. Alle für die Versuche verwendeten Melaninproben wurden damit negativ getestet. Beide Tests sind sehr teuer und können eine LPS-Verunreinigung nicht zu 100% ausschließen. LPS-Konzentrationen unter 0,03 EU/ml bei E-Toxate und unter 0,1 EU/ml bei QCL-1000 können nicht detektiert werden. 10 *endotoxin units* (EU)/ml entsprechen 1ng/ml LPS (BD Application note). Da DZ erst bei ca. 0,03-0,1 ng/ml LPS reagieren (138) (139) und die Detektionslimits der Tests um das 10-fache darüber liegen, kann aber davon ausgegangen werden, dass die

in dieser Arbeit beobachteten Effekte tatsächlich von NM, und nicht durch eine LPS-Kontamination, verursacht wurden.

7.1.2 Die Generierung von mDZ und hDZ im Vergleich

Zur Generierung von mDZ aus dem Knochenmark von Mäusen (5.3.6) wurden C57BL/6 Mäuse verwendet. Sie wurden ein bis zwei Wochen im hauseigenen Tierstall artgerecht gehalten und vor der Knochenmarksentnahme mit CO₂ getötet. Nach der schon beschriebenen Methode ließen sich mindestens 2×10^7 Zellen aus einer Maus gewinnen, wovon zirka 70% in Kultur mit GM-CSF zu unreifen mDZ ausdifferenzierten (77). Der Wachstumsfaktor GM-CSF wurde aus einer parallel kultivierten transgenen Zelllinie durch steriltfiltrieren des überstehenden Mediums gewonnen (77) und in einer verschraubbaren Flasche bei 4 °C gelagert. Schlecht ausdifferenzierte mDZ könnten die Folge von denaturiertem oder falsch dosiertem GM-CSF gewesen sein. In dem Fall wurde die GM-CSF-erzeugende Kultur ausgetauscht und eine neue Stocklösung angelegt. Auch die Qualität von FCS könnte sich empfindlich auf den Erfolg der Generierung ausgewirkt haben (77).

Das verwendete Medium (R10) enthielt neben 10% FCS auch 50µM β-Mercaptoethanol, um die Anheftung der Zellen auf dem Schalenboden zu minimieren. Die Entwicklung von DZ wird in Suspension bevorzugt (140). Die Verwendung von Petrischalen anstelle von Zellkulturschalen unterstützt die Entwicklung der DZ durch verminderte Anheftung zusätzlich. Außerdem werden DZ dadurch bei der Ernte leichter von den Makrophagen getrennt, da diese eher am Schalenboden haften bleiben (77).

Während die Erzeugung von unreifen mDZ gut gelang, konnte keine wirklich gute hDZ-Kultur generiert werden. Bei mehreren Versuchen konnte durch LPS keine CD86-Expression hervorgerufen werden (Abb. 6.1.4.1). Schon die Isolierung von PBMC aus den Blutproben erfordert hinsichtlich der Ausbeute mehr Geschick als das Isolieren von HSC aus murinem Knochenmark. Falls der Ficollgradient nicht sauber unterschichtet wird, ist die PBMC Ausbeute stark reduziert. Zudem ist die Zahl der Monozyten aus denen hDZ differenziert werden sollen (5.3.9 B) mit 3-8% aller Leukozyten eine kleine Population. Beim Einsatz von 5×10^7 PBMC konnten mit $< 1 \times 10^6$ nur achtmal weniger hDZ erzeugt werden als bisher beschrieben (76) (141). Bei der Maus dagegen wurden aus $2-3 \times 10^7$ mehr als $1,6 \times 10^7$ mDZ erhalten.

7.2.2 Die Melanine DAM und NM

Das natürlich vorkommende NM ähnelt strukturell stark dem künstlich hergestellten Dopamnimelanin (DAM) (136). Beide Melanine zeigen eine vergleichbare Affinität zu Proteinen und Lipiden (39). Obwohl DAM wegen seiner zytotoxischen Wirkung nicht als Modellmelanin für NM geeignet scheint (136) (142) (143), war es für diese Arbeit wichtig herauszufinden, ob Protein- bzw. Lipidreste oder das Melaninrückrat eine Aktivierung der DZ bewirken. Als Positivkontrolle wurde LPS gewählt, da DZ sehr sensitiv darauf reagieren. Die Melanine DAM, NM und NM+ wurden von Thomas Arzberger (Neuropathologie München) präpariert und aufgereinigt.

DAM wird im Labor unter physiologischen Bedingungen (pH 7) durch Autooxidation von Dopamin hergestellt. Es hat die Konsistenz eines Pulvers und lässt sich durch stetiges pipettieren zu einer feinkörnigen Suspension verarbeiten. Die Suspension wurde autoklaviert und der Flüssigkeitsverlust mit sterilem PBS bzw. aqua dest. ausgeglichen. Die Sonifizierung (137) von DAM ist nicht ratsam, da Ultraschallsonden im Institut auch zum Aufschluss von Bakterien verwendet werden und so LPS-Verunreinigungen in die Probe gelangen können.

Das Gewebe aus dem NM extrahiert wurde stammte von gesunden Spendern ohne bekannte neurologische Erkrankungen. NM ist klebriger als DAM und lässt sich schwer zu einer homogenen, feinkörnigen Suspension verarbeiten. Die Konzentrationsangaben sind deshalb ungenau. NM+ ließ sich, vermutlich wegen seiner Behandlung mit Proteinase K, wesentlich besser suspendieren. Der Zusammenhalt der Partikel wurde durch die Spaltung der Proteine deutlich vermindert und die Körnung dadurch einheitlicher. Trotzdem blieb auch von NM+ viel an den Eppendorfgefäßwänden haften. Die Melaninkonzentration für die Versuche wurde austitriert und im FACS analysiert (Abb. 6.1.2.5). Schon eine Menge von 0,1 mg/ml Melanin reicht aus, um eine Phagozytose von Melanin durch DZ zu beobachten. Allerdings wurden, wegen der geringen verfügbaren Gesamtmenge von NM, nur 0,05 mg/ml Melanin für alle Versuche verwendet.

7.2.3 Die Phagozytose von NM lässt mDZ reifen

Die Entdeckung selbstreaktiver Antikörper gegen α -Synuclein, Ferritin, und „Anti-Melanin-IgG“ in Seren und dem ZNS von Parkinson Patienten (26) (137), sowie die Opsonisierung von NM durch den Komplementfaktor C1q (144), deuten auf die Entwicklung einer adaptiven Immunantwort in der Pathogenese von MP hin. Da nur NM-haltige Zellen der SNpc von der Neurodegeneration bei MP betroffen sind, könnte NM der Auslöser für die beobachteten Immunreaktionen sein. Für die Induktion einer adaptiven Immunantwort müssen NM jedoch jedoch zunächst DZ aktiviert werden.

Durch Konfokalmikroskopie konnte sehr schön gezeigt werden, dass DAM, NM und NM+ nach 48 h Inkubation von mDZ und hDZ phagozytiert wurden. Auch die für reife DZ phänotypische Veränderung in der Morphologie (Ärmchen) sind gut sichtbar (Abb. 6.1.2.1 und 6.1.2.3). Um die Reifung der DZ auch physiologisch nachzuweisen, wurden die Aktivierungsmarker MHC II und CD86 mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt. Zur Diskriminierung der mDZ von anderen Zellen (Makrophagen) der heterogenen HSC-Kultur, wurden die Proben zusätzlich mit einem Antikörper gegen CD11c gefärbt (77) (145).

NM und NM+ (nicht gezeigt) aktivierten mDZ in ähnlichem Ausmaß wie die Positivkontrolle mit LPS (Abb. 6.1.3.1 und 6.1.3.2). Bei den mDZ, die DAM phagozytiert hatten, war immer eine scheinbare Voraktivierung (MHC II^{high}) erkennbar, die sich in einer etwa 5-15% höheren Fluoreszenz von MHC II gegenüber der Kontrolle ausdrückte (Abb. 6.1.3.1). Diese vermeintliche Voraktivierung ist methodisch bedingt und in geringem Maße nicht zu vermeiden. Bei der Erzeugung von mDZ aus Knochenmarkszellen mit GM-CSF stellt sich ab Tag 10 ein Gleichgewicht von zwei Unterpopulationen ein. Die DZ-Kultur besteht zu diesem Zeitpunkt aus 50-70% unreifen MHC II^{low} und zu 30-50% aus reifen MHC II^{high} DZ (77). Schwankungen im Aktivierungszustand von 20% könnten durch eine solche Voraktivierung erklärt werden, die in unterschiedlichen Schalen während der Inkubation mit DAM aufgetreten sein könnten.

DAM konnte die mDZ nicht aktivieren, obwohl es gut phagozytiert wurde. Offenbar reicht das Melaninrückrat allein nicht für eine Aktivierung aus, wird aber effektiv phagozytiert. Da sich DAM und NM in ihrer Melaninstruktur gleichen (39) (136), könnten Lipid- und/oder Peptidkomponenten von NM für eine funktionelle Aktivierung der mDZ verantwortlich sein.

Durch Injektion von NM ins Gehirn von Ratten konnten Mikroglia aktiviert und eine Neurodegeneration ausgelöst werden (26) (53). Zusätzlich zu dieser rein proinflammatorischen Aktivität von NM deuten die hier gezeigten Ergebnisse darauf hin, dass NM nach erfolgter Aufnahme und Aktivierung von DZs eine adaptive Immunantwort auslösen könnte. Vergleichbar konnte *in vitro* gezeigt werden, dass extrazelluläres NM immunogen ist, und über die Aktivierung von DZ allogene TZ zur Proliferation anregen kann (7.2.5).

7.2.4 NM regt bei mDZ die Ausschüttung von Zytokinen an

Von NM ist bekannt, dass es bei Mikroglia *in vitro* NF- κ B aktiviert, und die Ausschüttung der Zytokine TNF- α und IL-6 auslöst (66). TNF- α fördert unter anderem die Migration und Reifung von DZ. Beide Zytokine regulieren die Expression von Komplementfaktoren und sind wichtige Indikatoren für eine Immunantwort (146). Im Versuch (Abb. 6.1.5.1 und 6.1.5.2) konnte gezeigt werden, dass NM bei mDZ ebenfalls die Ausschüttung der Zytokine TNF- α

und IL-6 auslöst. NM verursacht eine TNF- α Ausschüttung, die im Experiment zwischen 1000 und 4000 pg/ ml lag (Abb. 6.1.5.1). Die Schwankungen sind vermutlich durch die Konsistenz-bedingten ungleichen Melaninkonzentrationen zu erklären (7.3.2). Das Proteinase K-behandelte NM unterschied sich bei keiner Messung wesentlich von nativem NM. Durch eine Proteinase K-Behandlung werden Proteine und Peptidreste aufgrund der starken Affinität von NM zu Proteinen möglicherweise nicht vollständig abgebaut (39). Mit NM assoziierte Lipide bleiben außerdem intakt. Im Medium von DAM-behandelten mDZ konnten keine Zytokine detektiert werden.

Die Tatsache, dass nach der festgestellten Reifung (MHC II und CD86) auch Zytokine wie TNF- α und IL-6 produziert wurden, könnte tatsächlich ein Hinweis auf die Aktivierung der mDZ über PAMP (1.3) sein. Joffre et al. konnten in einem Versuch zeigen, dass nur über PAMP aktivierte DZ auch TNF- α produzierten (75). Da aber DZ normalerweise nicht durch endogene Peptide und Lipide aktiviert werden, ist eine oxidative Veränderung eines Lipids wie von Coutant et al. Beschrieben, als Auslöser denkbar (74). Lipidperoxidation in der SN ist bei MP ein immer auftretendes Phänomen (64) (147). Zwar stammen die verwendeten NM Proben von gesunden Menschen, aber die SN ist auch dort ein höchst oxidatives Medium. NM aus post mortem Geweben von MP Patienten für ähnliche Versuche zu isolieren ist schwierig, da im Endstadium von MP bereits bis zu 90% der NM-haltigen Neuronen verloren sind.

Ein weiteres wichtiges Zytokin, dessen Vorkommen es zu prüfen lohnt, ist IL-12. Es stimuliert die Produktion von IFN- γ und ist somit das wichtigste Zytokin für Aktivierung des Th1 Weges. Außerdem wird IL-12 eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf von Autoimmunerkrankungen zugeschrieben (148).

Eine IFN- γ Färbung von proliferierenden TZ wurde zum Ende der Arbeit noch versucht und blieb ergebnislos. Ob kein IFN- γ von den TZ gebildet wurde oder ein methodischer Fehler der Grund dafür war, konnte leider nicht geklärt werden.

7.2.5 Durch NM aktivierte mDZ regen allogene mTZ zur Proliferation an

Mit einer MLR (5.3.11) sollte untersucht werden, ob durch NM aktivierte mDZ auch mTZ zur Proliferation anregen können. Bei wenigen Versuchen mit DAM konnte eine geringe Proliferation der mTZ beobachtet werden (Abb. 6.1.6.1 und 6.1.6.2 C). Meistens war jedoch die Standardabweichung (STABW) so groß, dass sich der DAM-Wert mit der Kontrolle überschneidet. Die allgemein großen STABW bei der MLR rühren daher, dass nicht alle DZ Melaninpartikel phagozytierten. Die Zahl der angeregten TZ unterliegt dementsprechend einer starken Schwankung, da für die Proliferation ein Zellkontakt mit aktivierten mDZ notwendig ist (149). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus 6.1.3 und 6.1.5 stellte sich

heraus, das mit DAM behandelte mDZ nicht in der Lage sind, eine Proliferation allogener mTZ auszulösen (Abb. 6.1.6.3). Mit NM behandelte mDZ regten dagegen signifikant mehr mTZ zur Proliferation an als die Kontrolle. Eine dazu passende Aktivierung von MHC II und CD86 zeigt die FACS-Analyse in Abb. 6.1.3.1.

7.2.6 NM und hDZ

Aus Zeitgründen und Mangel an NM wurden nur wenige Versuche mit hDZ durchgeführt. Eine Aktivierung von hDZ durch DAM oder NM konnte bei keiner Antikörperfärbung von MHC II und CD86 beobachtet werden. Außerdem inhibierte DAM die TZ Proliferation bei allen MLR-Versuchen (Abb. 6.1.6.4 und 6.1.6.5). Eine Bestätigung der Ergebnisse 6.1.3, 6.1.5 und 6.1.6 mit hDZ wäre wünschenswert aber nicht zwingend, da die Aktivierungswege einer adaptiven Immunantwort über PRRs bei Säugern konserviert sind und es noch keine Hinweise auf einen Unterschied zwischen Mensch und Maus gibt.

Wegen mangelnder Erfahrung bei der Kultivierung der hDZ wurde die Zahl der Vorläuferzellen, die Monozyten, oft falsch eingeschätzt. Die Anzahl der Monozyten verschiedener Blutproben schwankt erheblich (5.3.8).

Für die Eingrenzung reifer hDZ bei der FACS-Analyse wurde der falsche Marker gewählt. CD83, und nicht CD11c, ist der spezifische Marker für reife hDZ, da er nur auf reifen hDZ stabil exprimiert wird (150) (151) (152). Mit einer zusätzlichen Färbung von CD14 hätten Makrophagen, die in gerigem Maße auch CD86 exprimieren, ausgeschlossen werden können. hDZ verlieren CD14 während ihrer Reifung aus den Monozyten (153).

Anders als bei der Generierung von mDZ aus HSC, zirkulieren im peripheren Blut schon Untergruppen von hDZ. Mit einem Antikörper gegen CD11c⁺ wurden möglicherweise nur die wenigen unreifen hDZ in der Blutprobe detektiert. Diese Untergruppe der hDZ exprimiert CD86 sehr schwach (154), besitzt aber die Fähigkeit in Kultur zu reifen und eine allostimulatorische Reaktion hervorzurufen (155). Trotzdem konnte in dieser Arbeit keine Expression von CD86 bei hDZ durch LPS ausgelöst werden. Die Zahl der MHC II-exprimierenden Zellen wurde bei hDZ nur um 20% gesteigert (Abb. 6.1.4.1). Ähnlich verhielten sich die hDZ mit LPS auch in einer MLR, mit dem Ergebnis einer Verdoppelung der hTZ gegenüber der Kontrolle (Abb. 6.1.6.5). Zum Vergleich wurde der Anteil MHC II-exprimierender mDZ durch LPS-Stimulation um 80% erhöht (Abb. 6.1.3.2) und zehnmal mehr mTZ proliferierten (Abb. 6.1.6.3). Die Ergebnisse mit hDZ deuten auf einen methodischen Fehler bei der Generierung der hDZ-Kulturen hin. Gründe hierfür könnten eine zu geringe Ausbeute bei der Ficollisolation oder eine falsche Dosierung von GM-CSF oder IL-4 sein.

7.2.7 Zytotoxische Wirkung von DAM auf hDZ

Die Zytotoxizität von DAM ist nicht unbekannt (142). Jie Li et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass DAM bei einer Konzentration von 0,1mg/ml schon nach 24 h toxisch auf SK-N-SH Zellen wirkt (143).

Eine Zytotoxizität hängt von der Konzentration und der Länge der Inkubationszeit ab. Auch in der vorliegenden Arbeit war eine zytotoxische Wirkung von DAM in Abhängigkeit von der Konzentration und der Inkubationszeit zu erkennen.

Sowohl hDZ wie auch mDZ wurden nach 48 stündiger Inkubation mit DAM für die Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblau gefärbt. Dadurch erscheinen tote Zellen unter dem Mikroskop blau. Bei keiner Färbung waren auffällig viele tote Zellen zu sehen. Im FACS sind lysierte Zellen oder Zelltrümmer an sehr niedrigen SSC- und FSC-Werten zu erkennen. Bei einer Menge zwischen 0,05 und 0,1 mg/ml DAM zeigten sich keine Anzeichen einer Zytotoxizität bei mDZ (Abb. 6.1.2.5 B, C). Erst bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml DAM sinken die FSC-Werte bedenklich und lassen auf Zelltrümmer schließen (Abb. 6.1.2.5 D). Auch bei den 3-fach Färbungen sieht man in den Abbildungen A jeweils eine vitale mDZ Population im linken unteren Quadranten, die durch spontane Reifung, ausgelöst durch DAM oder NM, in den rechten oberen Quadranten wandert (Abb. 6.1.3.1 und 6.1.3.2). Die nicht vorhandene Aktivierung von mDZ durch DAM kann also nicht auf eine Zytotoxizität zurück zu führen sein. Ob der negative Stimulationsindex bei den Proliferationstests mit DAM-behandelten mDZ die Folge eines zytoxischen Effektes aufgrund der längeren Inkubation mit DAM (weitere 72h) ist, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden (Abb. 6.1.6.3 B).

hDZ wiesen in der FACS-Analyse allgemein sehr niedrige SSC- und FSC-Werte auf, liessen jedoch nach 48 h keinen negativen Einfluss von DAM im Unterschied zu unbehandelten Zellen erkennen (Abb. 6.1.4.1). Allerdings inhibierten DAM-behandelte hDZ in der Regel die Proliferation von hTZ (Abb. 6.1.6.6). Das wurde gezeigt indem zu einer konstanten Menge LPS, als Aktivator für die Proliferation, eine abnehmende Menge DAM gegeben wurde. Die durch LPS üblicherweise ausgelöste Proliferation wurde unterdrückt und erholte sich erst bei etwa 3,125 µg/ml DAM. Das könnte bedeuten, dass hDZ (3,125 µg/ml) im Vergleich zu mDZ (50 µg/ml) DAM nur in 10-fach geringerer Konzentration tolerieren. Die mit DAM behandelten hDZ wurden für den Versuch gewaschen, um überschüssiges Melanin weitestgehend zu entfernen und eine negative Wirkung von DAM auf hTZ auszuschliessen.

7.2 Immunoassay zum Nachweis von Anti-DAM-IgG

Bei einigen Untersuchungen die eine inflammatorische Funktion von NM während der Pathogenese von Parkinson vermuten lassen, stieß man auf selbstreaktive Anti-Melanin-IgG

Antikörper in Seren von MP Patienten (137), sowie auf Antikörper gegen α -Synuclein und Ferritin (26). Fasano et al. und Tribl et al. fanden bei Analysen von NM Granula heraus, dass beide Proteine mit NM assoziiert sind (156) (37). Eine weitere Studie belegt die Anwesenheit von IgG Antikörpern auf dopaminergen Neuronen, die mit einer steigenden Anzahl reaktiver Mikroglia einhergeht (157).

Wenn NM tatsächlich für die Bildung von Antikörpern verantwortlich ist, könnte man einen Immunoassay für eine diagnostische Früherkennung entwickeln. Da eine menschliche SNpc nur etwa 1-2 mg NM (158) enthält, wurde für die Etablierung des Immunoassays das synthetische NM-Modellmelanin DAM benutzt (159), mit dem schon Anti-Melanin-IgG in Parkinson Seren nachgewiesen wurden (137). Dopamin autooxidiert unter physiologischen Bedingungen schnell zu DAM und ist so für Laborarbeiten in größeren Mengen verfügbar (136).

Um Anti-DAM-IgG für den vorgesehenen Immunoassay in dieser Arbeit zu erhalten, wurden von der Firma immunoGlobe Kaninchen mit DAM immunisiert. Den Tieren wurde zu Beginn, nach vier und zuletzt nach sechs Wochen Blut abgenommen. Für den Immunoassay sollte DAM auf einer 96-Lochplatte fixiert werden. Das *coat*en von DAM auf eine 96-Lochplatte gelang allerdings nicht. Double et al. benutzten für einen ähnlichen Versuch Reacti-Bind NeutrAvidin der Firma Pierce (137). Da das Reagenz nicht zur Verfügung stand, wurde versucht DAM auf eine 96-Lochplatte zu backen. Nosanchuk et al. fixierten mit dieser Methode das Melanin von *C.neoformans* auf einer 96-Lochplatte (160). Da das nicht gelang wurde der Assay mit Eppendorfgefäßen durchgeführt. Proteine, also auch Antikörper, können als elektrisch geladenes Molekül unspezifisch an unebenen Oberflächen binden. Damit das den Assay nicht stört, wurden alle möglichen unspezifischen Bindungsstellen an den Gefäßwänden der Eppendorftubes und der Oberfläche von DAM mit Proteinen aus FCS gesättigt, d.h. ü.N mit FCS geblockt. Ein großer Nachteil des Assays waren die vielen Zentrifugationsschritte, da DAM nicht an die Oberfläche der Eppendorfgefäße gebunden war. Aus diesem Grund ging beim Absaugen der Seren, der Antikörperverdünnungen und der Waschlösungen auch DAM verloren. Eine gültige Quantifizierung kann nur erfolgen, wenn gleiche Mengen DAM pro Reaktionsgefäß vorhanden sind. Trotzdem wäre bei einer erfolgreichen Immunisierung der Tiere innerhalb sechs Wochen ein hoher IgG-Titer zu erwarten, der auch mit einem ungenauen Test hätte detektiert werden können. Der Anstieg des IgG-Titers dürfte den prozentualen Fehler durch den Verlust von DAM aufwiegen. Jedoch ist der Test ohne echte Positivekontrolle mit DAM Antikörpern auch nicht auswertbar. Am Ende zeigten die Proben, vor (pre-immun) und sechs Wochen nach der Immunisierung (final), bei allen Verdünnungen annähernd die gleiche geringe Absorption (Abb. 6.2.2). Da DAM eine hohe Affinität zu Peptiden und Lipiden hat (39), lässt die geringe Absorption von DAM vermuten dass der sekundäre Anti-Rabbit Antikörper lediglich an wenige, von DAM

adsorbierte, unspezifische Antikörper aus den Kaninchenserum gebunden hat. Vor allem da auch DAM in den Kontrollserum einen Farbumschlag zeigt. Die Adsorption sinkt mit den Verdünnungen, da weniger unspezifische Antikörper vorhanden sind (Abb. 6.2.2). Aktivkohle wurde im Vergleich zu DAM, bezüglich seiner Adsorptionsstärke gegenüber Biomolekülen getestet. Aktivkohle zeigt ein noch höheres Adsorptionsvermögen als DAM. Aufgrund eines signifikanten Unterschiedes, (Abb. 6.2.2 Verdünnung 1/40) müssten Anti-Aktivkohle-IgG vorhanden sein. Da das nicht möglich ist, wird dadurch nur die Unzuverlässigkeit des Assays bestätigt.

Da der Nachweis von Anti-DAM-IgG über einen Adsorptions-Assay scheiterte, sollte mit einem Agglutinationstest die Anwesenheit von Anti-DAM-IgM überprüft werden. IgM Antikörper sind als Pionierantikörper kennzeichnend für eine akute Infektion. Durch ihre Fähigkeit Polymere zu bilden, können sie eine Vernetzung von Ag verursachen. Die Zugabe von DAM zu den Serum hätte bei einer erfolgreichen Immunisierung eine Verklumpung von DAM verursachen müssen (Abb. 6.2.1). Ein vergleichbarer Versuch wurde mit dem Melanin von *C.neoformans* und dem Serum von immunisierten Mäusen durchgeführt (160).

7.3 Neuromelanin als möglicher Auslöser einer Autoimmunität bei MP

Die Beteiligung einer angeborenen und/ oder adaptiven Immunantwort an der Pathogenese von Parkinson wurde in den letzten Jahren vielfach diskutiert. Neben der Aktivierung von Mikroglia (161) weist eine erhöhte Konzentrationen von Gamma/delta+ T-Zellen im ZNS von MP Patienten auf eine erste angeborene Immunreaktion hin (162). Die Rolle der Gamma/delta+ T-Zellen ist für *autoimmune encephalomyelitis* (EAE) gut untersucht. Sie sorgen als erste Immunzellen im ZNS für die Einwanderung weiterer Immunzellen und fungieren so als Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem (163).

Ein Kennzeichen der adaptiven Immunantwort ist die Einwanderung von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten. Eine signifikant höhere Konzentration von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten wurde in *post mortem* Proben von Parkinson Patienten und in einem MPTP Maus Modell für Parkinson, unmittelbar vor neuronaler Degeneration, nachgewiesen. Die TZ-Populationen waren dabei sehr spezifisch auf die betroffenen Regionen beschränkt (164). Eine erhöhte Konzentration von CD25 exprimierenden T-Zellen in der Zerebrospinalflüssigkeit von Parkinson Erkrankten, könnte sogar auf die Entstehung einer Autoimmunität hinweisen (165). CD25+ *regulatory T cells* (Tregs) sorgen durch die Kommunikation mit unreifen, Selbstantigen-beladenen DZ (*steady state DC*) für die Entstehung von Immuntoleranz. Interessanterweise können unreife DZ die Bildung von CD25+ TZ induzieren. Wenn DZ chronisch aktiviert werden, kann Autoimmunität entstehen (166). Sie können die Proliferation von CD4+ und CD8+ TZ und somit eine Immunantwort unterdrücken (174) (167). In einem

MPTP Maus Modell für Parkinson konnten verabreichte Tregs das nigrostriatale System vor Zelldegeneration schützen (168).

Der Komplementfaktor C1q kann während einer angeborenen oder auch durch eine adaptive Immunantwort aktiviert werden. Das Glycoprotein C1q aktiviert dabei eine Komplementkaskade über den klassischen Weg. Das Komplementsystem besteht aus einer Reihe von Proteinen, die Antigen unspezifisch für phagozytierende Zellen markieren, um eine Beseitigung zu beschleunigen. C1q erkennt und bindet unter anderem bakterielle Porine, LPS, virale Hüllproteine, Phospholipide und eine Vielzahl von anderen Eigen- und Fremdproteinen (169). Im Gehirn von post mortem MP ist extrazelluläres NM mit C1q opsonisiert (144). C1q kann einerseits direkt an NM binden, oder nach einer adaptiven Immunantwort an einen IgG- bzw. IgM-Antigen (z.B. NM) Immunkomplex (146).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass mDZ extrazelluläres NM als Immunstimulator erkennen, und dadurch reifen. Der Effekt von NM ist beachtenswert, weil die Reifung von DZ eine wichtige Bedingung für die Entstehung einer adaptiven Immunantwort ist (170). DZ sind darauf spezialisiert naive TZ zu primen (69). Allerdings sind mit Antigen (Ag) beladene DZ auch in der Lage eine Autoimmunität auszulösen (58) (171). Dieses Szenario könnte in der parkinsonschen Pathogenese geschehen, indem sich Autoantikörper gegen eines der mit NM assoziierten Proteine (α -Synuclein, Ferritin) richten (26) (172). Auch oxidativ veränderte Lipide können von T- und B-Zellen erkannt werden und zu einer adaptiven Immunantwort führen (74). Es wurden vermehrt IgG gegen pigmentierte dopaminerge Neuronen in unmittelbarer Nähe zu Lewy Bodies, deren Hauptbestandteil α -Synuclein ist, in *post mortem* MP entdeckt (157). *In vivo* ist es denkbar, dass auch unbekannte, nicht mit NM assoziierte potentielle Antigene bei der Phagozytose von DZ aufgenommen werden.

Damit NM über DZ autoimmun wirksam sein kann, müssen DZ ins ZNS gelangen, da NM als unlösliches Molekül nicht aus der SNpc diffundieren kann. Dies könnte durch eine Infektion, eine Verletzung oder eine Entzündung geschehen. DZ können unter Umständen sogar aus Mikroglia differenzieren (70) (173) (174). Im ZNS können DZ enzephalogene TZ aktivieren und so zur Gewebeschädigung beitragen (175) (176). Parkinsonsche Symptome als Folge einer viralen Infektion wurden für HIV (20) und für das postenzephalitische parkinsonsche Syndrom (PEP) beschrieben (177). Versuche, die DZ in der SN von MP Patienten aufzuspüren, könnten aufschlussreich sein.

Extrazelluläres NM könnte sekundär der Auslöser für eine angeborene bzw. adaptive Immunantwort sein. Als Initiation für die Freisetzung von NM wird oxidativer Stress für die wahrscheinlichste Ursache angesehen (178). Die Unlöslichkeit von NM, und damit die Unfähigkeit in andere Gewebe zu diffundieren, kann auch erklären, warum der Schaden auf die pigmentierten Zellen der SNpc beschränkt bleibt. Zytotoxische Substanzen von aktivierten Mikroglia (angeborenen Immunantwort) oder von CD8+ Lymphozyten (adaptive

Immunantwort) könnten dopaminerge Zellen in unmittelbarer Nähe von extrazellulärem NM töten. Zusätzlich könnte die Bildung von Antikörpern gegen NM den degenerativen Effekt, der durch eine gesteigerte Opsonisierung und vermehrte Aktivierung von Mikroglia hervorgerufen wird, verstärken.

7.4 Der *in vitro* Abbau von A β durch hIDE

7.4.1 Die Erzeugung einer Zelllinie mit stabiler Expression von hAPP wt, sw

Für die Erzeugung einer transgene Zelllinie, die das Protein hAPP stabil exprimiert, wurde ein etabliertes foamyvirales Vektorsystem gewählt. Die cds von hAPPwt und hAPPsw wurden in das Plasmid BF014 kloniert. Es besitzt wie pAAV ein EGFP-Gen als Fluoreszenzmarker und wird mit den Helferplasmiden gag, env und pol in 293T Zellen transfiziert um foamyvirale Partikel zu erhalten. Für die Klonierung von hAPP cds in BF014 wurden Restriktionsenzyme gewählt, die Schnittstellen mit entgegengesetzten Überhängen erzeugten, um die Wahrscheinlichkeit einer Rückligation zu reduzieren. Die Aufreinigung des BF014 Plasmids musste über Diatomeenerde erfolgen, da es für die im Labor gebräuchlichen Reinigungs-Kits mit 12 kb zu groß ist. Für die PCR von hAPPwt und hAPPsw wurde Pwo Polymerase von Promega verwendet. Nachdem die Plasmide kloniert und überprüft waren, wurden sie im Rahmen der Diplomarbeit Johannes Alexander in 293T Zellen zusammen mit packaging-Plasmiden exprimiert. Mit den geernteten Foamyviren wurden HT1080 Zellen transduziert, im FACS nach EGFP sortiert und weiter kultiviert. Als die neu erzeugte Zelllinie sich stabilisiert hatte, wurde die Expression von hAPP geprüft und die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren (Diplomarbeit Johannes Alexander).

7.4.2 Die Klonierung eines pAAV-hIDE-Plasmids

Als viralen Vektor für hIDE sollte das *AAV helper-free system* (3.6), das schon für siRNA-Experimente benutzt wurde, dienen. rAAV sind besonders für die Transduktion von sich nicht teilenden Zellen (Neuronen) geeignet (179). Ein großer Nachteil ist dabei allerdings die geringe Verpackungskapazität von maximal 5 kb. Da hIDE mit 3 kb zu groß für das Standard pAAV-hrGFP-Plasmid gewesen wäre um komplett verpackt zu werden, wurde versucht das pAAV-LacZ-Plasmid (*AAV helper-free manual*) bis auf die nötigsten Elemente zu reduzieren und LacZ durch hIDE zu ersetzen (Abb. 6.3.2.1). Es gelang, eine pAAV-hIDE Plasmid zu klonieren (Diplomarbeit Patrick Neuhöfer). Obwohl der hIDE-Sequenz keine Kozaksequenz vorgeschaltet ist, wurde hIDE von pAAV-hIDE gut exprimiert. Ein Anteil von 3-10 % des IDE-

Proteins wurden mittels Western Blot im überstehenden Medium detektiert (Diplomarbeit Rhoda Busch). Dies stimmt mit der *in vivo* extrazellulär vorkommenden Konzentration von IDE überein (180). Eine hIDE-Expression ließ sich mit rAAV-hIDE auch in transduzierten Zellen nachweisen. Es wurde erfolglos versucht die Transportsignalsequenz die Hemming et al. 2007 für Nephilidrin verwendet haben vor die hIDE cds zu klonieren, um für einen späteren Vektor, hinsichtlich seiner therapeutischen Wirksamkeit, die Sezernierung von IDE zu erhöhen. Jedoch könnte ein hIDE-Vektor auch ohne diese auskommen, da hIDE *in vivo* auch ohne die Hilfe der üblichen Signalsequenzen sezerniert wird (107). Außerdem degradiert IDE nur monomeres A β und es gibt Hinweise, dass A β durch membrabgebundenes IDE abgebaut wird (181). Somit wäre die natürliche IDE-Sequenz für eine wirkungsvolle Sezernierung ausreichend. Leider konnte kein Marker mehr in dem erzeugten Plasmid untergebracht werden, da die Verpackungskapazität von AAV zu gering ist. Deswegen wurde die Klonierung mit einem FLAG-Tag hinter der hIDE cds wiederholt. Die FLAG-Sequenz ist nur wenige Basen lang und erlaubt eine quantitative Kontrolle des exprimierten hIDE-Proteins mittels Western Blot. Der erhaltene Klon hatte leider eine Mutation in der hIDE cds. Parallel dazu wurde die Sequenz für das rot fluoreszierende mRFP erfolgreich vor die hIDE cds kloniert. Allerdings gelang die Verpackung von pAAV-mRFP-hIDE, trotz in der Literatur bekannter Beispiele für die Überwindung einer beschränkten Verpackungskapazität von AAV durch Rekombination, nicht (182).

7.4.3 Die Klonierung von hIDE-Sequenz in das foamyvirale Plasmid BF014

Eine Alternative zu dem AAV-System stellte das foamyvirale System mit BF014, gag, env, pol dar. Zwar ist dieser Vektor für die Infektion von Neuronen eher ungeeignet (134), d.h. im Rahmen einer Therapie nur für einen kurzen Zeitraum möglich (130), aber man könnte den Abbau von A β durch IDE *in vitro* gut studieren.

Allerdings gelang die Klonierung der hIDE cds in BF014 aus unbekanntem Gründen nicht. Die Amplifikation von hIDE war zwar schon bei den Klonierungsversuchen mit AAV problematisch, funktionierte aber zuletzt gut. Auch die Klonierung von BF014 und hAPP lieferte rasch Ergebnisse und die Verfahrensweise wurde für hIDE schließlich übernommen. Trotzdem verlief die Aufreinigung des verdauten BF014 Plasmids auch hier nicht immer problemlos und die Ausbeute mit der Diatomeenmethode war oft zu gering.

8. Literaturverzeichnis

1. Le Couteur, D. G., Muller, M., Yang, M. C., Mellick, G. D., and McLean, A. J. (2002) *Rev Environ Health* **17**, 51-64
2. Meara, J., Bhowmick, B. K., and Hobson, P. (1999) *Age Ageing* **28**, 99-102
3. Dawson, T. M., and Dawson, V. L. (2003) *Science* **302**, 819-822
4. Elizan, T. S., and Casals, J. (1983) *J Neural Transm Suppl* **19**, 75-88
5. Burns, R. S., Chiueh, C. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Jacobowitz, D. M., and Kopin, I. J. (1983) *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4546-4550
6. Ezrin-Waters, C., Resch, L., and Lang, A. E. (1985) *Can J Neurol Sci* **12**, 272-273
7. Lorincz, M. T. *Ann N Y Acad Sci* **1184**, 173-187
8. Hirsch, E., Graybiel, A. M., and Agid, Y. A. (1988) *Nature* **334**, 345-348
9. Kastner, A., Hirsch, E. C., Lejeune, O., Javoy-Agid, F., Rascol, O., and Agid, Y. (1992) *J Neurochem* **59**, 1080-1089
10. Bertrand, E., Lechowicz, W., Szpak, G. M., and Dymecki, J. (1997) *Neurol Neurochir Pol* **31**, 295-302
11. Galvin, J. E. (2006) *Acta Neuropathol* **112**, 115-126
12. Lennox, G., Lowe, J., Byrne, E. J., Landon, M., Mayer, R. J., and Godwin-Austen, R. B. (1989) *Lancet* **1**, 323-324
13. Ishihara, K., Nonaka, A., Fukui, T., Kawamura, M., Shiota, J., and Nakano, I. (2002) *J Neurol Sci* **198**, 97-100
14. Mizuno, Y. (2004) *Rinsho Shinkeigaku* **44**, 741-750
15. Hattori, N., Shimura, H., Kubo, S., Wang, M., Shimizu, N., Tanaka, K., and Mizuno, Y. (2000) *J Neural Transm Suppl*, 101-116
16. Kahle, P. J., Haass, C., Kretschmar, H. A., and Neumann, M. (2002) *J Neurochem* **82**, 449-457
17. Hasegawa, T., Matsuzaki-Kobayashi, M., Takeda, A., Sugeno, N., Kikuchi, A., Furukawa, K., Perry, G., Smith, M. A., and Itoyama, Y. (2006) *FEBS Lett* **580**, 2147-2152
18. Wood-Kaczmar, A., Gandhi, S., and Wood, N. W. (2006) *Trends Mol Med* **12**, 521-528
19. McNaught, K. S., Olanow, C. W., Halliwell, B., Isacson, O., and Jenner, P. (2001) *Nat Rev Neurosci* **2**, 589-594
20. Koutsilieri, E., Sopper, S., Scheller, C., ter Meulen, V., and Riederer, P. (2002) *J Neural Transm* **109**, 767-775
21. Halliwell, B. (2006) *J Neurochem* **97**, 1634-1658
22. Berg, D., Gerlach, M., Youdim, M. B., Double, K. L., Zecca, L., Riederer, P., and Becker, G. (2001) *J Neurochem* **79**, 225-236
23. Mouatt-Prigent, A., Karlsson, J. O., Agid, Y., and Hirsch, E. C. (1996) *Neuroscience* **73**, 979-987
24. Onyango, I. G. (2008) *Neurochem Res* **33**, 589-597
25. McGeer, P. L., and McGeer, E. G. (2008) *Mov Disord* **23**, 474-483
26. Papachroni, K. K., Ninkina, N., Papapanagiotou, A., Hadjigeorgiou, G. M., Xiromerisiou, G., Papadimitriou, A., Kalofoutis, A., and Buchman, V. L. (2007) *J Neurochem* **101**, 749-756
27. Boka, G., Anglade, P., Wallach, D., Javoy-Agid, F., Agid, Y., and Hirsch, E. C. (1994) *Neurosci Lett* **172**, 151-154
28. Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., and Togari, A. (2000) *J Neural Transm Suppl*, 277-290

29. Loeffler, D. A., Camp, D. M., and Conant, S. B. (2006) *J Neuroinflammation* **3**, 29
30. Braak, H., Del Tredici, K., Bratzke, H., Hamm-Clement, J., Sandmann-Keil, D., and Rub, U. (2002) *J Neurol* **249 Suppl 3**, III/1-5
31. Whitton, P. S. (2007) *Br J Pharmacol* **150**, 963-976
32. Graham, D. G. (1978) *Mol Pharmacol* **14**, 633-643
33. Bogerts, B. (1981) *J Comp Neurol* **197**, 63-80
34. Foley, J. M., and Baxter, D. (1958) *J Neuropathol Exp Neurol* **17**, 586-598
35. Fedorow, H., Tribl, F., Halliday, G., Gerlach, M., Riederer, P., and Double, K. L. (2005) *Prog Neurobiol* **75**, 109-124
36. Wakamatsu, K., Ito, S., and Nagatsu, T. (1991) *Neurosci Lett* **131**, 57-60
37. Tribl, F., Marcus, K., Meyer, H. E., Bringmann, G., Gerlach, M., and Riederer, P. (2006) *J Neural Transm* **113**, 741-749
38. Tribl, F., Asan, E., Arzberger, T., Tatschner, T., Langenfeld, E., Meyer, H. E., Bringmann, G., Riederer, P., Gerlach, M., and Marcus, K. (2009) *Mol Cell Proteomics* **8**, 1832-1838
39. Zecca, L., Costi, P., Mecacci, C., Ito, S., Terreni, M., and Sonnino, S. (2000) *J Neurochem* **74**, 1758-1765
40. Moses, H. L., Ganote, C. E., Beaver, D. L., and Schuffman, S. S. (1966) *Anat Rec* **155**, 167-183
41. Gaspar, P., Berger, B., Gay, M., Hamon, M., Cesselin, F., Vigny, A., Javoy-Agid, F., and Agid, Y. (1983) *J Neurol Sci* **58**, 247-267
42. Ikemoto, K., Nagatsu, I., Ito, S., King, R. A., Nishimura, A., and Nagatsu, T. (1998) *Neurosci Lett* **253**, 198-200
43. Zeise, L., Addison, R. B., and Chedekel, M. R. (1992) *Pigment Cell Res Suppl* **2**, 48-53
44. Sulzer, D., Bogulavsky, J., Larsen, K. E., Behr, G., Karatekin, E., Kleinman, M. H., Turro, N., Krantz, D., Edwards, R. H., Greene, L. A., and Zecca, L. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11869-11874
45. Conway, K. A., Rochet, J. C., Bieganski, R. M., and Lansbury, P. T., Jr. (2001) *Science* **294**, 1346-1349
46. Xu, Y., Stokes, A. H., Roskoski, R., Jr., and Vrana, K. E. (1998) *J Neurosci Res* **54**, 691-697
47. Whitehead, R. E., Ferrer, J. V., Javitch, J. A., and Justice, J. B. (2001) *J Neurochem* **76**, 1242-1251
48. Zecca, L., and Swartz, H. M. (1993) *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* **5**, 203-213
49. Zecca, L., Pietra, R., Goj, C., Mecacci, C., Radice, D., and Sabbioni, E. (1994) *J Neurochem* **62**, 1097-1101
50. Fasano, M., Bergamasco, B., and Lopiano, L. (2006) *J Neurochem* **96**, 909-916
51. Zecca, L., Tampellini, D., Gerlach, M., Riederer, P., Fariello, R. G., and Sulzer, D. (2001) *Mol Pathol* **54**, 414-418
52. Zecca, L., Shima, T., Stroppolo, A., Goj, C., Battiston, G. A., Gerbasi, R., Sarna, T., and Swartz, H. M. (1996) *Neuroscience* **73**, 407-415
53. Zecca, L., Wilms, H., Geick, S., Claasen, J. H., Brandenburg, L. O., Holzknecht, C., Panizza, M. L., Zucca, F. A., Deuschl, G., Sievers, J., and Lucius, R. (2008) *Acta Neuropathol* **116**, 47-55
54. Rice, M. E. (2000) *Trends Neurosci* **23**, 209-216
55. D'Amato, R. J., Alexander, G. M., Schwartzman, R. J., Kitt, C. A., Price, D. L., and Snyder, S. H. (1987) *Life Sci* **40**, 705-712
56. Tousi, N. S., Buck, D. J., Zecca, L., and Davis, R. L. *Neurosci Lett* **486**, 47-50
57. Bandmann, O., and Wood, N. W. (2002) *Neuropediatrics* **33**, 1-5

58. Oyanagi, K., Tsuchiya, K., Yamazaki, M., and Ikeda, K. (2001) *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 393-402
59. Langston, J. W. (1988) *Trends Pharmacol Sci* **9**, 347-348
60. Schipper, H. M. (2004) *Ageing Res Rev* **3**, 265-301
61. Jellinger, K., Kienzl, E., Rumpelmair, G., Riederer, P., Stachelberger, H., Ben-Shachar, D., and Youdim, M. B. (1992) *J Neurochem* **59**, 1168-1171
62. Faucheux, B. A., Bonnet, A. M., Agid, Y., and Hirsch, E. C. (1999) *Lancet* **353**, 981-982
63. Faucheux, B. A., Martin, M. E., Beaumont, C., Hauw, J. J., Agid, Y., and Hirsch, E. C. (2003) *J Neurochem* **86**, 1142-1148
64. Ben-Shachar, D., Riederer, P., and Youdim, M. B. (1991) *J Neurochem* **57**, 1609-1614
65. Schipper, H. M. (1999) *Neurotox Res* **1**, 57-70
66. Wilms, H., Claasen, J., Rohl, C., Sievers, J., Deuschl, G., and Lucius, R. (2003) *Neurobiol Dis* **14**, 417-424
67. Shamoto-Nagai, M., Maruyama, W., Akao, Y., Osawa, T., Tribl, F., Gerlach, M., Zucca, F. A., Zecca, L., Riederer, P., and Naoi, M. (2004) *J Neural Transm* **111**, 1253-1265
68. Naoi, M., Maruyama, W., Yi, H., Yamaoka, Y., Shamoto-Nagai, M., Akao, Y., Gerlach, M., Tanaka, M., and Riederer, P. (2008) *J Neurochem* **105**, 2489-2500
69. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000) *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811
70. Zozulya, A. L., Clarkson, B. D., Ortler, S., Fabry, Z., and Wiendl, H. *J Mol Med* **88**, 535-544
71. Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998) *J Exp Med* **188**, 373-386
72. Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C. R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. (1998) *Eur J Immunol* **28**, 2760-2769
73. Yanagihara, S., Komura, E., Nagafune, J., Watarai, H., and Yamaguchi, Y. (1998) *J Immunol* **161**, 3096-3102
74. Coutant, F., Perrin-Cocon, L., Agaugue, S., Delair, T., Andre, P., and Lotteau, V. (2002) *J Immunol* **169**, 1688-1695
75. Joffre, O., Nolte, M. A., Sporri, R., and Reis e Sousa, C. (2009) *Immunol Rev* **227**, 234-247
76. Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M., and Schuler, G. (1994) *J Exp Med* **180**, 83-93
77. Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., and Schuler, G. (1999) *J Immunol Methods* **223**, 77-92
78. Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B. (1987) *Nature* **325**, 733-736
79. Lamb, B. T., Sisodia, S. S., Lawler, A. M., Slunt, H. H., Kitt, C. A., Kearns, W. G., Pearson, P. L., Price, D. L., and Gearhart, J. D. (1993) *Nat Genet* **5**, 22-30
80. Haass, C., Hung, A. Y., and Selkoe, D. J. (1991) *J Neurosci* **11**, 3783-3793
81. Butterfield, D. A., Hensley, K., Harris, M., Mattson, M., and Carney, J. (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **200**, 710-715
82. Mattson, M. P., Cheng, B., Culwell, A. R., Esch, F. S., Lieberburg, I., and Rydel, R. E. (1993) *Neuron* **10**, 243-254
83. Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H. A., and Herms, J. (2006) *J Neurosci* **26**, 7212-7221

84. Zou, K., Kim, D., Kakio, A., Byun, K., Gong, J. S., Kim, J., Kim, M., Sawamura, N., Nishimoto, S., Matsuzaki, K., Lee, B., Yanagisawa, K., and Michikawa, M. (2003) *J Neurochem* **87**, 609-619
85. Miners, J. S., Baig, S., Palmer, J., Palmer, L. E., Kehoe, P. G., and Love, S. (2008) *Brain Pathol* **18**, 240-252
86. Sinha, S., and Lieberburg, I. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11049-11053
87. Messier, C., and Teutenberg, K. (2005) *Neural Plast* **12**, 311-328
88. Beyreuther, K., and Masters, C. L. (1997) *Nature* **389**, 677-678
89. Jarrett, J. T., Berger, E. P., and Lansbury, P. T., Jr. (1993) *Biochemistry* **32**, 4693-4697
90. Barrow, C. J., Yasuda, A., Kenny, P. T., and Zagorski, M. G. (1992) *J Mol Biol* **225**, 1075-1093
91. Garzon-Rodriguez, W., Sepulveda-Becerra, M., Milton, S., and Glabe, C. G. (1997) *J Biol Chem* **272**, 21037-21044
92. Mattson, M. P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I., and Rydel, R. E. (1992) *J Neurosci* **12**, 376-389
93. Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A., and Klein, W. L. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6448-6453
94. Keil, U., Bonert, A., Marques, C. A., Scherping, I., Weyermann, J., Strosznajder, J. B., Muller-Spahn, F., Haass, C., Czech, C., Pradier, L., Muller, W. E., and Eckert, A. (2004) *J Biol Chem* **279**, 50310-50320
95. Marques, C. A., Keil, U., Bonert, A., Steiner, B., Haass, C., Muller, W. E., and Eckert, A. (2003) *J Biol Chem* **278**, 28294-28302
96. Huang, X., Atwood, C. S., Hartshorn, M. A., Multhaup, G., Goldstein, L. E., Scarpa, R. C., Cuajungco, M. P., Gray, D. N., Lim, J., Moir, R. D., Tanzi, R. E., and Bush, A. I. (1999) *Biochemistry* **38**, 7609-7616
97. Murakami, K., Irie, K., Ohigashi, H., Hara, H., Nagao, M., Shimizu, T., and Shirasawa, T. (2005) *J Am Chem Soc* **127**, 15168-15174
98. De Tullio, R., Cantoni, C., Broggio, C., Prato, C., Stifanese, R., Averna, M., Antolini, R., Pontremoli, S., and Melloni, E. (2009) *Biochim Biophys Acta* **1790**, 182-187
99. Kuo, W. L., Montag, A. G., and Rosner, M. R. (1993) *Endocrinology* **132**, 604-611
100. Bernstein, H. G., Ansorge, S., Riederer, P., Reiser, M., Frolich, L., and Bogerts, B. (1999) *Neurosci Lett* **263**, 161-164
101. Bora, R. P., Ozbil, M., and Prabhakar, R. *J Biol Inorg Chem* **15**, 485-495
102. Malito, E., Hulse, R. E., and Tang, W. J. (2008) *Cell Mol Life Sci* **65**, 2574-2585
103. Shen, Y., Joachimiak, A., Rosner, M. R., and Tang, W. J. (2006) *Nature* **443**, 870-874
104. Lynch, J. A., George, A. M., Eisenhauer, P. B., Conn, K., Gao, W., Carreras, I., Wells, J. M., McKee, A., Ullman, M. D., and Fine, R. E. (2006) *J Neurosci Res* **83**, 1262-1270
105. Tanzi, R. E., Moir, R. D., and Wagner, S. L. (2004) *Neuron* **43**, 605-608
106. Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E. A., Frosch, M. P., Eckman, C. B., Tanzi, R. E., Selkoe, D. J., and Guenette, S. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4162-4167
107. Zhao, J., Li, L., and Leissring, M. A. (2009) *Mol Neurodegener* **4**, 4
108. Miners, J. S., Baig, S., Tayler, H., Kehoe, P. G., and Love, S. (2009) *J Neuropathol Exp Neurol* **68**, 902-914
109. Gasparini, L., Gouras, G. K., Wang, R., Gross, R. S., Beal, M. F., Greengard, P., and Xu, H. (2001) *J Neurosci* **21**, 2561-2570
110. Caccamo, A., Oddo, S., Sugarman, M. C., Akbari, Y., and LaFerla, F. M. (2005) *Neurobiol Aging* **26**, 645-654

111. Zhao, Z., Xiang, Z., Haroutunian, V., Buxbaum, J. D., Stetka, B., and Pasinetti, G. M. (2007) *Neurobiol Aging* **28**, 824-830
112. Grasso, G., Pietropaolo, A., Spoto, G., Pappalardo, G., Tundo, G. R., Ciaccio, C., Coletta, M., and Rizzarelli, E. *Chemistry* **17**, 2752-2762
113. Ertekin-Taner, N., Allen, M., Fadale, D., Scanlin, L., Younkin, L., Petersen, R. C., Graff-Radford, N., and Younkin, S. G. (2004) *Hum Mutat* **23**, 334-342
114. Leissring, M. A., Lu, A., Condron, M. M., Teplow, D. B., Stein, R. L., Farris, W., and Selkoe, D. J. (2003) *J Biol Chem* **278**, 37314-37320
115. Haass, C. (2004) *EMBO J* **23**, 483-488
116. Peel, A. L., and Klein, R. L. (2000) *J Neurosci Methods* **98**, 95-104
117. Terzi, D., and Zachariou, V. (2008) *Biotechnol J* **3**, 1555-1563
118. Rapoza, N. P., and Atchinson, R. W. (1967) *Nature* **215**, 1186-1187
119. Samulski, R. J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J. D., Housman, D. E., Epstein, N., and Hunter, L. A. (1991) *EMBO J* **10**, 3941-3950
120. Kotin, R. M., Siniscalco, M., Samulski, R. J., Zhu, X. D., Hunter, L., Laughlin, C. A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M., and Berns, K. I. (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2211-2215
121. Cao, L., Liu, Y., During, M. J., and Xiao, W. (2000) *J Virol* **74**, 11456-11463
122. Qiao, C., Li, J., Skold, A., Zhang, X., and Xiao, X. (2002) *J Virol* **76**, 1904-1913
123. Leissring, M. A., Farris, W., Chang, A. Y., Walsh, D. M., Wu, X., Sun, X., Frosch, M. P., and Selkoe, D. J. (2003) *Neuron* **40**, 1087-1093
124. Russell, D. W., and Miller, A. D. (1996) *J Virol* **70**, 217-222
125. Liu, W., He, X., Cao, Z., Sheng, J., Liu, H., Li, Z., and Li, W. (2005) *Intervirology* **48**, 329-335
126. Gartner, K., Wiktorowicz, T., Park, J., Mergia, A., Rethwilm, A., and Scheller, C. (2009) *Retrovirology* **6**, 32
127. Hill, C. L., Bieniasz, P. D., and McClure, M. O. (1999) *J Gen Virol* **80** (Pt 8), 2003-2009
128. Delelis, O., Lehmann-Che, J., and Saib, A. (2004) *Curr Opin Microbiol* **7**, 400-406
129. Kiem, H. P., Allen, J., Trobridge, G., Olson, E., Keyser, K., Peterson, L., and Russell, D. W. (2007) *Blood* **109**, 65-70
130. Caprariello, A. V., Miller, R. H., and Selkirk, S. M. (2009) *Gene Ther* **16**, 448-452
131. Mergia, A., and Heinkelein, M. (2003) *Curr Top Microbiol Immunol* **277**, 131-159
132. Rethwilm, A. (2007) *Curr Gene Ther* **7**, 261-271
133. Trobridge, G. D., Miller, D. G., Jacobs, M. A., Allen, J. M., Kiem, H. P., Kaul, R., and Russell, D. W. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1498-1503
134. Patton, G. S., Erlwein, O., and McClure, M. O. (2004) *J Gen Virol* **85**, 2925-2930
135. Oberlander, U., Pletinckx, K., Dohler, A., Muller, N., Lutz, M. B., Arzberger, T., Riederer, P., Gerlach, M., Koutsilieri, E., and Scheller, C. *BMC Neurosci* **12**, 116
136. Double, K. L., Zecca, L., Costi, P., Mauer, M., Griesinger, C., Ito, S., Ben-Shachar, D., Bringmann, G., Fariello, R. G., Riederer, P., and Gerlach, M. (2000) *J Neurochem* **75**, 2583-2589
137. Double, K. L., Rowe, D. B., Carew-Jones, F. M., Hayes, M., Chan, D. K., Blackie, J., Corbett, A., Joffe, R., Fung, V. S., Morris, J., Riederer, P., Gerlach, M., and Halliday, G. M. (2009) *Exp Neurol* **217**, 297-301
138. Snijders, A., Kalinski, P., Hilkens, C. M., and Kapsenberg, M. L. (1998) *Int Immunol* **10**, 1593-1598
139. Verhasselt, V., Buelens, C., Willems, F., De Groote, D., Haeffner-Cavaillon, N., and Goldman, M. (1997) *J Immunol* **158**, 2919-2925
140. Yamaguchi, Y., Tsumura, H., Miwa, M., and Inaba, K. (1997) *Stem Cells* **15**, 144-153
141. Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994) *J Exp Med* **179**, 1109-1118

142. Offen, D., Ziv, I., Barzilai, A., Gorodin, S., Glater, E., Hochman, A., and Melamed, E. (1997) *Neurochem Int* **31**, 207-216
143. Li, J., Scheller, C., Koutsilieris, E., Griffiths, F., Beart, P. M., Mercer, L. D., Halliday, G., Kettle, E., Rowe, D., Riederer, P., Gerlach, M., Rodriguez, M., and Double, K. L. (2005) *J Neurochem* **95**, 599-608
144. Depboylu, C., Schafer, M. K., Arias-Carrion, O., Oertel, W. H., Weihe, E., and Höglinger, G. U. *J Neuropathol Exp Neurol* **70**, 125-132
145. Vermaelen, K., and Pauwels, R. (2004) *Cytometry A* **61**, 170-177
146. Janeway, C. (2005) *Immunobiology : the immune system in health and disease*, 6th ed., Garland Science, New York
147. Shamoto-Nagai, M., Maruyama, W., Yi, H., Akao, Y., Tribl, F., Gerlach, M., Osawa, T., Riederer, P., and Naoi, M. (2006) *J Neural Transm* **113**, 633-644
148. Hochrein, H., O'Keeffe, M., Luft, T., Vandenabeele, S., Grumont, R. J., Maraskovsky, E., and Shortman, K. (2000) *J Exp Med* **192**, 823-833
149. Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L. (1999) *Science* **285**, 221-227
150. Lechmann, M., Zinser, E., Golka, A., and Steinkasserer, A. (2002) *Int Arch Allergy Immunol* **129**, 113-118
151. Zhou, L. J., and Tedder, T. F. (1995) *Blood* **86**, 3295-3301
152. Cao, W., Lee, S. H., and Lu, J. (2005) *Biochem J* **385**, 85-93
153. Satthaporn, S., and Eremin, O. (2001) *J R Coll Surg Edinb* **46**, 9-19
154. Weissman, D., Li, Y., Ananworanich, J., Zhou, L. J., Adelsberger, J., Tedder, T. F., Baseler, M., and Fauci, A. S. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 826-830
155. Thomas, R., and Lipsky, P. E. (1994) *J Immunol* **153**, 4016-4028
156. Fasano, M., Giraud, S., Cocha, S., Bergamasco, B., and Lopiano, L. (2003) *Neurochem Int* **42**, 603-606
157. Orr, C. F., Rowe, D. B., Mizuno, Y., Mori, H., and Halliday, G. M. (2005) *Brain* **128**, 2665-2674
158. Aime, S., Bergamasco, B., Casu, M., Digilio, G., Fasano, M., Giraud, S., and Lopiano, L. (2000) *Mov Disord* **15**, 977-981
159. Ostergren, A., Svensson, A. L., Lindquist, N. G., and Brittebo, E. B. (2005) *Pigment Cell Res* **18**, 306-314
160. Nosanchuk, J. D., Rosas, A. L., and Casadevall, A. (1998) *J Immunol* **160**, 6026-6031
161. McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E., and McGeer, E. G. (1988) *Neurology* **38**, 1285-1291
162. Fiszer, U., Mix, E., Fredrikson, S., Kostulas, V., Olsson, T., and Link, H. (1994) *J Neurol Sci* **121**, 39-45
163. Wohler, J. E., Smith, S. S., and Barnum, S. R. *J Neurosci Res* **88**, 1-6
164. Brochard, V., Combadiere, B., Prigent, A., Laouar, Y., Perrin, A., Beray-Berthet, V., Bonduelle, O., Alvarez-Fischer, D., Callebert, J., Launay, J. M., Duyckaerts, C., Flavell, R. A., Hirsch, E. C., and Hunot, S. (2009) *J Clin Invest* **119**, 182-192
165. McGeer, P. L., Yasojima, K., and McGeer, E. G. (2001) *Adv Neurol* **86**, 83-89
166. Mahnke, K., Johnson, T. S., Ring, S., and Enk, A. H. (2007) *J Dermatol Sci* **46**, 159-167
167. Wang, S. H., Chen, G. H., Fan, Y., Van Antwerp, M., and Baker, J. R., Jr. (2009) *Endocrinology* **150**, 2000-2007
168. Reynolds, A. D., Banerjee, R., Liu, J., Gendelman, H. E., and Mosley, R. L. (2007) *J Leukoc Biol* **82**, 1083-1094
169. Kojouharova, M., Reid, K., and Gadjeva, M. *Mol Immunol* **47**, 2154-2160
170. Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998) *Nature* **392**, 245-252

171. Eriksson, U., Kurrer, M. O., Sonderegger, I., Iezzi, G., Tafuri, A., Hunziker, L., Suzuki, S., Bachmaier, K., Bingisser, R. M., Penninger, J. M., and Kopf, M. (2003) *J Exp Med* **197**, 323-331
172. Jellinger, K. A., Kienzl, E., Rumpelmaier, G., Paulus, W., Riederer, P., Stachelberger, H., Youdim, M. B., and Ben-Shachar, D. (1993) *Adv Neurol* **60**, 267-272
173. Fischer, H. G., and Reichmann, G. (2001) *J Immunol* **166**, 2717-2726
174. Bailey, T. W., Hermes, S. M., Andresen, M. C., and Aicher, S. A. (2006) *J Neurosci* **26**, 11893-11902
175. Greter, M., Heppner, F. L., Lemos, M. P., Odermatt, B. M., Goebels, N., Laufer, T., Noelle, R. J., and Becher, B. (2005) *Nat Med* **11**, 328-334
176. Heppner, F. L., Greter, M., Marino, D., Falsig, J., Raivich, G., Hovelmeyer, N., Waisman, A., Rulicke, T., Prinz, M., Priller, J., Becher, B., and Aguzzi, A. (2005) *Nat Med* **11**, 146-152
177. McCall, S., Vilensky, J. A., Gilman, S., and Taubenberger, J. K. (2008) *J Neurovirol* **14**, 177-185
178. Stone, D. K., Reynolds, A. D., Mosley, R. L., and Gendelman, H. E. (2009) *Antioxid Redox Signal* **11**, 2151-2166
179. Daya, S., and Berns, K. I. (2008) *Clin Microbiol Rev* **21**, 583-593
180. Duckworth, W. C., Bennett, R. G., and Hamel, F. G. (1998) *Endocr Rev* **19**, 608-624
181. Qiu, W. Q., Walsh, D. M., Ye, Z., Vekrellis, K., Zhang, J., Podlisny, M. B., Rosner, M. R., Safavi, A., Hersh, L. B., and Selkoe, D. J. (1998) *J Biol Chem* **273**, 32730-32738
182. Grieger, J. C., and Samulski, R. J. (2005) *J Virol* **79**, 9933-9944

9. Publikationen

Veröffentlichung

Neuromelanin is an immune stimulator for dendritic cells in vitro

BMC Neuroscience, 2011 Nov 15;12:116.

Uwe Oberländer, Katrien Pletinckx, Anja Döhler, Nora Müller, Manfred B Lutz, Thomas Arzberger, Peter Riederer, Manfred Gerlach, Eleni Koutsilieri and Carsten Scheller

Kongressbeitrag

Neuromelanin activates Dendritic Cells: Implications for Parkinson's Disease

Uwe Oberländer, Eva Gschmack, Katrien Pletinckx, Anja Döhler, Nora Müller, Manfred B Lutz, Thomas Arzberger, Peter Riederer, Manfred Gerlach, Eleni Koutsilieri and Carsten Scheller

10. Abkürzungsverzeichnis

AAV	adeno assoziierter virus
Abb.	Abbildung
AD	alzheimer disease
APP	amyloid precursor protein
APS	Ammoniumpersulfat
aq.	Aqua
ATV	antibiotic trypsin versen
BACE	Beta-site APP-cleaving enzyme
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
cds	coding sequence
ctrl.	control
DAM	Dopaminmelanin
DC	dendritic cell
dest.	destiliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DZ	dendritische Zelle
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
et al.	und andere
FACS	fluorescent activated cell scanning
FAD	familiar alzheimer disease
FCS	fetal calf serum
fmol	femtomol
FSC	forward scatter
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde(n)
hAPP	human amyloid precursor protein
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure-Natriumsalz
hIDE	human insulin degrading enzyme
HSC	hematopoietic stem cell
HRP	horseradish peroxidase
kb	Kilobasen
Knt	Kurznonntarget
Kt	Kurztarget
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
Lsg.	Lösung
LTR	long terminal repeat
M	Mol
mA	Milliamper
MEM	Modified Eagle Medium
min	Minute(n)
mio.	Millionen

mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
MPP+	1-methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
mRFP	monomeric red fluorescent protein
N.A.	Numerical Aperture
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NM	Neuromelanin
PBS	phosphate buffered saline
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PCR	polymerase chain reaction
PD	parkinson disease
PEI	polyethylenimine
pg	Picogramm
PreP	presequence peptidase
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SAD	sporadic alzheimer disease
sec.	Sekunde(n)
SDS	sodium dodecyl sulfat
SN	substantia nigra
SSC	side scatter
sw	swedish mutation
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	thermus aquaticus
TEMED	N, N-N, N-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TZ	T-Zelle
u.a.	unter anderem
ÜK	über Nacht Kultur
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	volume per volume
wt	Wildtyp
w/v	weight per volume
z.B	zum Beispiel
µg	Microgramm
µl	Microliter

11. Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.2.2.1:	Fentonreaktion	
Abb. 3.4.1:	Prozessierung von APP	
Abb. 3.6.1:	Herstellungsschema eines rAAV mit Hilfe des AAV <i>helper-free</i> Systems	
Abb. 5.3.7.1:	Lage der Lymphknoten in der Maus-Aus Vincenzo Covelli- Guide to the Necropsy of the Mouse	
Abb. 6.1.1.1:	E-Toxate zeigt kein LPS in einer DAM-Suspension	UO 014
Abb. 6.1.1.2:	LPS-Verunreinigung bei einer NM-Probe	UO 014
Abb. 6.1.1.3:	LAL-Test von DAM und NM ist negativ	UO 014
Abb. 6.1.2.1:	mDZ phagozytieren NM+	UO 011
Abb. 6.1.2.2:	hDZ phagozytieren DAM	UO 011
Abb. 6.1.2.3:	mDZ phagozytieren DAM	UO 011
Abb. 6.1.2.4:	mDZ phagozytieren NM	UO 011
Abb. 6.1.2.5:	DAM-Phagozytose von mDZ im FACS	UO 012
Abb. 6.1.3.1:	mDZ werden durch die Phagozytose von DAM nicht aktiviert	UO 012
Abb. 6.1.3.2:	mDZ werden durch Phagozytose von NM aktiviert	UO 012
Abb. 6.1.4.1:	Humane DZ ließen sich durch DAM nicht aktivieren	UO 021
Abb. 6.1.5.1:	NM regt die Ausschüttung des Zytokins TNF- α bei mDZ an	UO 025
Abb. 6.1.5.2:	NM und NM+ regt die Ausschüttung von IL-6 bei mDZ an	UO 026
Abb. 6.1.6.1:	Titration von murinen DZ für die MLR	UO 019
Abb. 6.1.6.2:	TZ zeigen in einer MLR nach 72 h die größte Proliferation	UO 019
Abb. 6.1.6.3:	Durch NM aktivierte mDZ regen die Proliferation von T-Zellen in einer MLR an	UO 019
Abb. 6.1.6.4:	Mit DAM behandelte hDZ aktivieren keine T-Zellen	UO 019
Abb. 6.1.6.5:	DAM hemmt die Proliferation von T-Zellen	UO 019
Abb. 6.1.6.6:	DAM inhibiert die hTZ-Proliferation durch LPS	UO 019
Abb. 6.2.1:	Der Nachweis von spezifischen Antikörper gegen DAM bei immunisierten Kaninchen gelang nicht	UO 005
Abb. 6.2.2:	Ein Agglutinationstest des Kaninchenserums fällt negativ aus	UO 004
Abb. 6.3.1.1:	Für die Herstellung einer hAPP exprimierenden Zelllinie wurde das Foamy-Virale Plasmide BF014-hAPP kloniert	UO 023
Abb. 6.3.2.1:	Aus dem Plasmid pAAV-LacZ wurde LacZ entfernt und durch eine MCS ersetzt	UO 014
Abb. 6.3.2.2:	In pAAV-hIDE wurde mRFP kloniert	UO 022