Universität Ulm
Klinik für Neurologie
Prof. Dr. A. C. Ludolph

Untersuchung der potentiellen Biomarker Picalm, Interleukin-1β, Interleukin-6, Interleukin-8 und Tumor-Nekrose-Faktor α im Liquor von Alzheimerpatienten

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Stefanie Kirschmer
Laichingen
2012

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Christine A. F. von Arnim
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dietmar R. Thal
Tag der Promotion:	13.12.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1 Das Liquorsystem 1
1.2 Alzheimer-Demenz 4
1.2.1 Epidemiologie, Diagnostik und klinischer Verlauf 5
1.2.2 Pathologie 6
1.2.3 Konzentrationsänderungen von Aβ und Tau im Liquor 9
1.2.4 Genetische Assoziation 10
1.3 Picalm 12
1.4 Zytokine und Chemokine 15
1.4.1 Polymorphismen bei Zyto- und Chemokinen 15
1.4.2 Zyto- und Chemokine im Gehirn 16
1.5 Hypothesen und Ziele 19
1.5.1 Hypothesen und Ziele – Picalm 19
1.5.2 Hypothesen und Ziele – Zytokine und Chemokine 20

2 Material und Methoden 21

2.1 Material 21
2.1.1 Patientenmaterial: Liquor, Serum und humane Hirnlysate 21
2.1.2 Chemikalien 23
2.1.3 Puffer 24
2.1.4 Bakterien, Kulturmedien und Antibiotika 25
2.1.5 Zellen und Zellkulturmedium 26
2.1.6 Plasmidvektor und Konstrukt 27
2.1.7 Enzyme und Enzympuffer 27
2.1.8 Antikörper 28
2.1.9 Marker/Standards der molekularen Massen 28
2.1.10 Kits und Assays 29
2.1.11 Geräte und Programme/Software 30
2.1.12 Statistische Auswertung 31
2.2 Methoden 31
2.2.1 Umgang mit rekombinanten Bakterienzellen 31
2.2.2 Zellkultur 33
2.2.3 BCA Protein Assay Kit (Thermo) 35
2.2.4 Umgang mit Liquor 36
2.2.5 Western Blot 36
2.2.6 ProteoSeek™ Albumin/IgG Removal Kit (Thermo) 38
2.2.7 Acetonpräzipitation 38

2.2.8 Immunpräzipitation 39
2.2.9 Multiplex Assay zur Zyto- und Chemokinbestimmung 40
2.2.10 Festphasen-Enzymimmunoassay: Tau und Aβ 42

3 Ergebnisse 44

3.1 Picalm 44
3.1.1 Picalm in humanem Hirnlysat 44
3.1.2 Picalm in verschiedenen Hirnzellen 45
3.1.3 Liquoruntersuchung nach Picalm mittels Western Blot 46
3.2 Zyto- und Chemokinbestimmung im Liquor 65
3.2.1 Zyto- und Chemokine im Liquor von Alzheimerpatienten, Depressionspatienten und Kontrollpatienten 65
3.2.2 Zyto- und Chemokine im Serum von Alzheimerpatienten, Depressionspatienten und Kontrollpatienten 70
3.2.3 Korrelationen der Zyto- und Chemokine mit verschiedenen Parametern 72
3.2.4 Korrelationen der Zyto- und Chemokine zwischen den Liquor- und Serumwerten derselben Patienten 74
3.2.5 Korrelationen der Zyto- und Chemokine untereinander bei denselben Patienten 75

4 Diskussion 76

4.1 Picalm 76
4.1.1 Picalm in humanem Hirnlysat 76
4.1.2 Picalm in verschiedenen Hirnzellen 76
4.1.3 Picalm im Liquor 77
4.2 Zytokin- und Chemokinbestimmung im Liquor 82
4.2.1 Zytokin- und Chemokine im Liquor und im Serum von Alzheimerpatienten, Depressionspatienten und Kontrollpatienten 82
4.2.2 Korrelationen der Zyto- und Chemokine mit verschiedenen Parametern 93
4.2.3 Korrelationen der Zyto- und Chemokine zwischen den Liquor- und Serumwerten derselben Patienten 94
4.2.4 Korrelationen der Zyto- und Chemokine untereinander bei denselben Patienten 95
4.3 Wurde ein neuer Biomarker für die Alzheimer-Demenz gefunden? 97

5 Zusammenfassung 99

6 Literaturverzeichnis 100

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aβ	Amyloid β
AD	Alzheimer-Demenz
ADAS	Alzheimer's Disease Assessment Scale
APOE	Apolipoprotein E
AP	Acetonpräzipitation
APP	Amyloid-Precursor-Protein (engl.), Amyloid-Vorläuferprotein (dt.)
ANTH	AP180 N-Terminal Homology Domain
AUC	Area under the curve (engl.)
BACE	Beta-Site APP cleaving enzyme (engl.)
BCA	Bicinchoninic acid (engl.), Bicinchoninsäure (dt.)
BEX	Brain extraction buffer
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Kontrollegruppe/Kontrollperson
cDNA	complementary DNA (engl.), komplementäre DNS (dt.)
DC	Disease-Control (engl.), Krankheitskontrolle (dt.)
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
CI	Confidence interval (engl.), Konfidenzintervall (dt.)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid (engl.), Desoxyribonukleinsäure (dt.)
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (engl.)
FCS	Foetal Calf Serum (engl.)
GRP	Grün fluoreszierendes Protein
HALT	Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo)
HBS	HEPES Buffer Solution (engl.)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HRP	Horseradish Peroxidase (engl.), Meerrettichperoxidase (dt.)
ICD	Internationalen Klassifikation der Krankheiten
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IQR	Interquartile Range (engl.), Inter-Quartilsabstand (dt.)
LB	Lysogeny Broth
LDS	Lithium dodecyl sulfate (engl.)
MCI	Mild Cognitive Impairment (engl.), Leichte kognitive Beeinträchtigung (dt.)

MMST	Mini-Mental-Status-Test
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
n	Fallzahl
PCR	Polymerase Chain Reaction (engl.), Polymerase-Kettenreaktion (dt.)
PBS	Phosphate buffered saline (engl.)
PBST	Phosphate buffered saline tween (engl.)
PIP_2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
$Q_{.25}$/ $Q_{.75}$	25%-Quantile/75%-Quantile
RNAase	Ribonuklease
ROC	Receiver Operating Characteristic
Rpm	Revolutions per minute (engl.), Umdrehungen pro Minute (dt.)
RT	Raumtemperatur
sAPPα/β	secreted APPα/β (engl.), sezerniertes APPα/β (dt.)
SDS	Natriumdodecylsulfat
S.O.C.	Super Optimal Broth (S.O.B.) mit 20 mM Glucose zugesetzt
SNARE	*S*oluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor (engl.)
SNPs	Single Nucleotide Polymorphism (engl.), Einzelnukleotid-Polymorphismen (dt.)
Tab.	Tabelle
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor α
V	Volt
VAMPs	Vesicle associated membrane proteins (engl.)

1 Einleitung

1.1 Das Liquorsystem

Vor etwa 3000 Jahren wurden die flüssigkeitsgefüllten Hohlräume des menschlichen Gehirns zum ersten Mal beschrieben. Zeitweise wurden sie als Zentrum der Aktivität und des Denkens des Menschen angesehen. Galenos von Pergamon (131–201 n. Chr.) benannte die Flüssigkeit *liquor vitalis*, „Lebensgeist“, welche heute als „Nervenwasser“ bzw. Liquor cerebrospinalis (Liquor) bekannt ist. Der Liquor cerebrospinalis dient dem Stoffwechsel der Nervenzellen des Zentralnervensystems und erfüllt eine Schutzfunktion für das Gehirn, indem er im Subarachnoidalraum eine Art Wasserkissen um das Gehirn bildet und es damit gegen mechanische Einwirkungen von außen schützt (Hashimoto 1992). Außer im Subarachnoidalraum, dem äußeren Liquorraum, füllt der Liquor auch die Ventrikel, die inneren Liquorräume, aus (Abb. 1).

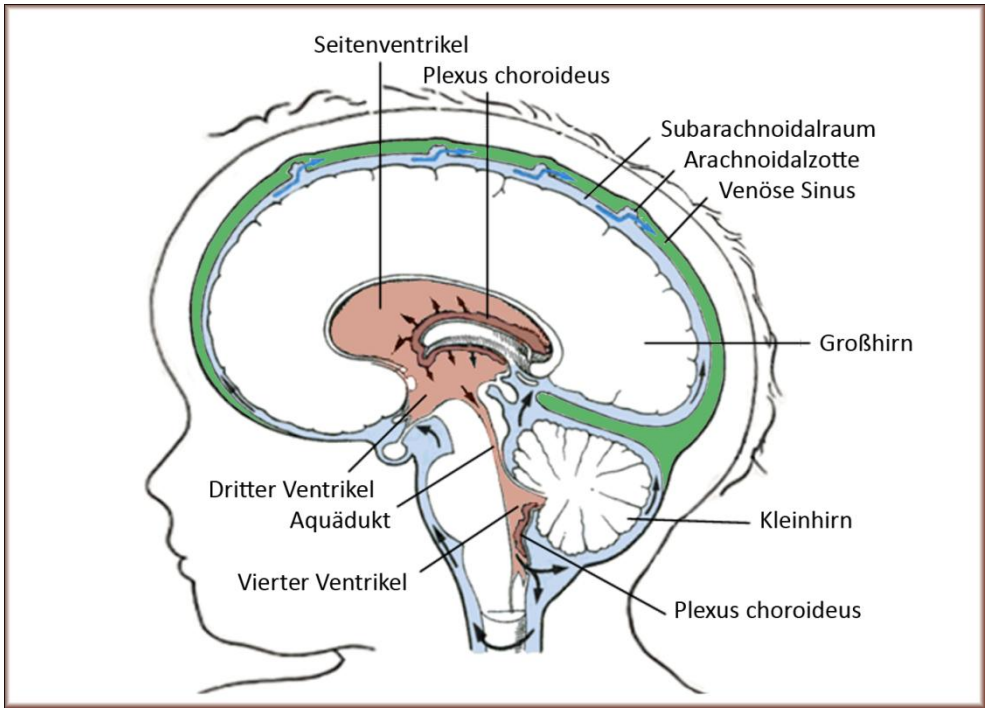

Abb. 1 ***Das Liquorsystem.*** *Liquor wird durch die Plexus choroidei (braun) synthetisiert, über die inneren Liquorräume (hellbraun) in die äußere Liquorräume (hellblau) bis in die venösen Sinus (grün) transportiert, wo der Liquor dem Blutkreislauf wieder zugeführt wird (modifiziert nach Reiber 2005).*

Durch fenestrierte Blutgefäße der Plexus choroidei werden etwa 80% der 500 bis 600 ml Liquor am Tag produziert. Die anderen Quellen sind Blutgefäße des Gehirns und des Subarachnoidalraumes, sowie das extrazelluläre Hirnparenchym. Die Zirkulation des Liquors erfolgt pulsatil und wird durch den arteriellen Blutfluss generiert. Um das physiologische Gleichgewicht des Liquors aufrecht zu erhalten, müssen nicht nur Bildung und Zirkulation, sondern auch die Resorption aufeinander abgestimmt sein. Die Resorption erfolgt größtenteils über Arachnoidalzotten, die vom Subarachnoidalraum in venöse Sinus reichen. Es handelt sich um einen unidirektionalen Fluss durch lediglich eine Endothelzellschicht, bei der ein Rückfluss durch einen Ventilmechanismus verhindert wird (Tumani et al. 2005).

Schrankensysteme wie die Blut-Liquor-, Hirn-Liquor- und die Blut-Hirn-Schranke sind für die strenge Regulation der Zusammensetzung des Liquors verantwortlich. Funktionen dieser Schrankensysteme sind die Protektion der Zellen des Nervensystems vor ausscheidungspflichtigen und toxischen Substanzen, die stabile Zusammensetzung der Extrazellulärflüssigkeit des Gehirns, sowie die Versorgung mit Substanzen für Signaltransduktionsprozesse. Beim Transport durch diese Schranken unterscheidet man den interzellulären Transport vom rezeptorvermittelten transzellulären Transport, welcher möglicherweise für den Transport von den in dieser Arbeit untersuchten Proteinen, relevant sein könnten.

Für den interzellulären Transport zwischen Endothelzellen bilden Tight junctions das morphologische Korrelat, weshalb hier die Durchlässigkeit nach molekularer Masse und molekularer Dimension streng reguliert und somit eher eine Funktion beim Transport von Ionen und nicht von Proteinen vermutet wird (Dejana et al. 1996, Reiber 1994). An den Plexus choroidei, der Hauptproduktionsstelle des Liquors, ist die Blut-Liquor-Schranke fenestriert. Diese Poren sind mit einer Diaphragmamembran verschlossen und mit einer anionischen, proteinabstoßenden Glykokalix bedeckt, weshalb davon auszugehen ist, dass die Ultrafiltration von Serumproteinen hier keine Rolle spielt (Rubin et al. 1999).

Bei den transzellulären Transportsystemen wird zwischen passivem Transport für z.B. Ionen oder Gase (O_2, CO_2) und erleichtertem Transport über Carrier-vermittelte Diffusion für z.B. Aminosäuren und Glukose unterschieden. Eine spezielle Form der Carrier-vermittelten Diffusion stellt der rezeptorvermittelte Mechanismus dar. Diese

substanzspezifischen Rezeptoren regulieren Endo- und Transzytose ganzer Proteine in Endothelzellen, sowie in zerebralen Zellen (Tumani et al. 2005). Die Existenz von sättigbaren Transportmechanismen (saturable transport mechanism), wahrscheinlich durch substanzspezifische Rezeptoren, wird für ein paar der in dieser Arbeit untersuchten Proteine vermutet (Banks et al. 1995) (siehe 4.2.3).

Die absoluten Proteinkonzentrationen im Liquor ergeben sich bei intakter Selektionsfunktion aus Serumangebot, Liquorproduktion, Liquorfluß und Liquor-resorption. Etwa 80% der Liquorproteine des gesunden Menschen stammen aus dem Blut, die restlichen 20% werden intrathekal, besonders in den Meningen, synthetisiert (Tumani et al. 2005).

Unter pathologischen Bedingungen kann die Durchlässigkeit aller Schranken verändert sein, weshalb Proteinkonzentrationen im Liquor verändert sein können. Beispielsweise bei der Alzheimer-Demenz finden sich im Liquor gegenüber der Norm veränderte Konzentrationen der Proteine Tau und Amyloid β (Andreasen et al. 2003).

1.2 Alzheimer-Demenz

Die Alzheimer-Demenz (AD) oder Morbus Alzheimer (lat.) ist eine neurodegenerative Erkrankung des höheren Lebensalters und mit etwa 50–75% aller Demenzerkrankungen die Bedeutendste (Prince 2011). Weltweit leiden etwa 36 Millionen Menschen an einer Demenzerkrankung. Diese Anzahl wird sich vermutlich alle 20 Jahre verdoppeln, was mit der stark steigenden Lebenserwartung zusammenhängt (Prince 2011).

Erstmalig wurde diese Erkrankung durch den Arzt Alois Alzheimer (1864–1915) bei der Patientin Auguste Deter (1850–1906) beschrieben (Maurer et al. 1997). Wie auch viele andere Patienten mit AD beantwortete Auguste Deter einfache Fragen entweder falsch oder ausweichend (Maurer et al. 1997). Beispielsweise auf die Frage „Wo sind wir hier?“ antwortete sie mit „Hier und überall, hier und jetzt, Sie dürfen mir nichts übel nehmen.“ (Gomann 2010)

Alois Alzheimer stellte fest, dass die Patienten keine Orientierung über Zeit und Ort haben, sich kaum an Einzelheiten aus ihrem Leben erinnern können und oft Antworten geben, die in keinerlei Bezug zur Frage stehen und auch sonst ohne Zusammenhang bleiben. Stimmungen wechseln rasch zwischen Angst, Misstrauen, Ablehnung und Weinerlichkeit (siehe 1.2.1). Nach dem Tod Auguste Deters stellte Alzheimer in ihrem Gehirn zugrunde gegangene Nervenzellen und Proteinablagerungen, sogenannte Plaques fest (siehe 1.2.2) (Maurer et al. 1997, Alzheimer 1907).

1.2.1 Epidemiologie, Diagnostik und klinischer Verlauf

Die Alzheimer-Demenz beginnt sehr selten vor dem 60. Lebensjahr und die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung steigt mit zunehmendem Lebensalter, wobei Frauen häufiger erkranken als Männer (Abb. 2).

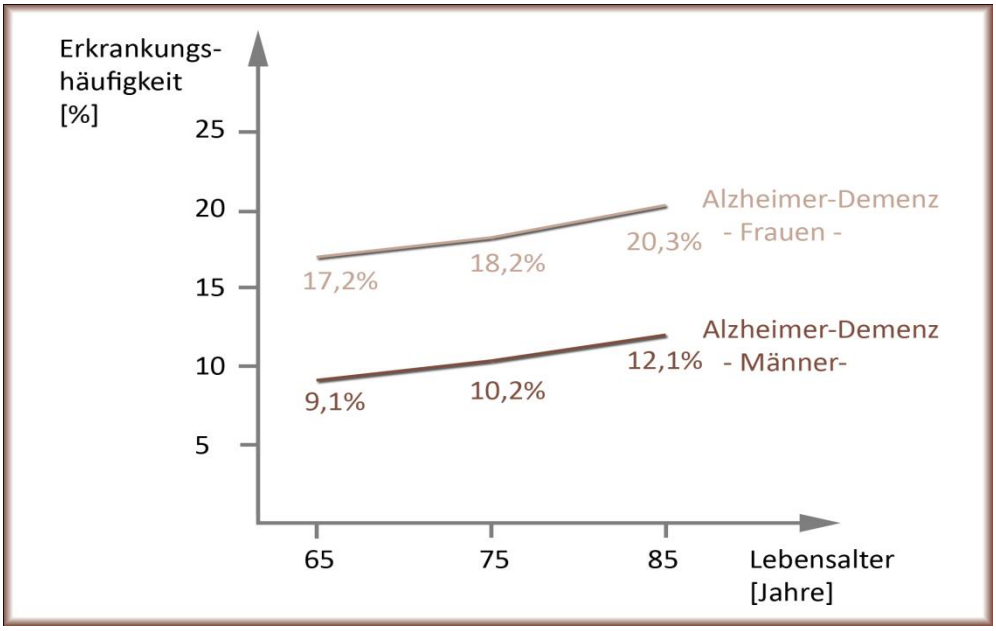

Abb. 2 Erkrankungshäufigkeit der Alzheimer-Demenz nach Lebensalter und Geschlecht. *Höheres Lebensalter und weibliches Geschlecht bedeuten ein erhöhtes Erkrankungsrisiko (Daten von Seshadri et al. 2006).*

Bereits Jahre vor einer sicheren Diagnosestellung treten oft Befindlichkeitsstörungen, wie Depression oder Teilnahmslosigkeit, auf und mit neuropsychologischen Tests lassen sich geringe Lernschwierigkeiten erkennen. Die Diagnose ist Grundlage der Therapie und Betreuung und dient zur syndromalen und ätiologischen Zuordnung der Demenz. Da die Erkrankung progredient verläuft und viele therapeutische und präventive Ansätze im Frühstadium der Erkrankung psychische Belastung und Pflegebedürftigkeit verzögern können, ist eine frühzeitige Diagnostik der AD sinnvoll. Gleichzeitig ist eine sorgfältige Diagnostik erforderlich, um falsch-positive Diagnosen zu vermeiden. Die Diagnose erfolgt einerseits anhand der Anamnese, einer körperlichen und psychopathologischen Untersuchung und gegebenenfalls einer Bildgebung, andererseits mittels kognitiven Kurztests, wie zum Beispiel der MMST (Mini-Mental-Status-Test) oder neuropsychologischen Tests beispielsweise der ADAS (Alzheimer's Disease Assessment

Scale). Durch diese Tests werden kognitive Leistungen wie Orientierung, Aufmerksamkeit, Gedächtnis, Benennen von Gegenständen, Befolgen von Anweisungen und viele weitere kognitive Fähigkeiten untersucht. Weiterhin können Blutuntersuchungen erfolgen, um stoffwechselbedingte Demenzsyndrome auszuschließen. Die Liquordiagnostik ist ein weiterer Schritt, um bei Vorliegen klinischer Hinweise einer Erkrankung die AD zu diagnostizieren oder auszuschließen. Insbesondere sollen andere Erkrankungen ausgeschlossen werden, beispielsweise Demenz bei Virusenzephalitiden und postviralen Enzephalitiden, Lues, Neuroborreliose, Vaskulitiden und multiple Sklerose. Im Liquor sind außerdem Korrelate der neuropathologischen Veränderungen, die die AD definieren, messbar (beschrieben in 1.2.3) (die hier beschriebene Diagnostik, wurde der S3-Leitlinie „Demenzen“ entnommen, Deuschl et al. 2009). Mit der Suche nach neuen Liquormarkern soll in dieser Arbeit die Diagnostik der AD weiter verbessert werden.

Die Erkrankung beginnt meist mit Defiziten der Lern- und Gedächtnisleistung und führt später zu Problemen der Feinmotorik und alltäglichen Verrichtungen, wie zum Beispiel das Bedienen von Haushaltsgeräten. Im weiteren Verlauf erkennen Patienten alltägliche Gegenstände und auch nahe stehende Personen nicht mehr wieder. Die Muskulatur baut kontinuierlich ab, was zu Harn- bzw. Stuhlinkontinenz, abnehmender Mobilität bis hin zur Bettlägerigkeit führt. Todesursache sind meist Infektionen, wie zum Beispiel Lungenentzündungen und nicht die Alzheimer-Demenz selbst (Forstl et al. 1999).

1.2.2 Pathologie

Amyloid Plaques und neurofibrilläre Bündel, bestehend aus spezifischen aggregierten Proteinen, sind neuropathologische Merkmale der Alzheimer-Demenz (Duyckaerts et al. 2008). Die extrazellulären amyloiden Plaques sind vorwiegend Amyloid β Peptide (Aβ) und die intrazellulären neurofibrillären Bündel (neurofibrillary tangles) bilden sich aus dem Mikrotubulus-assozierten Protein Tau (Selkoe 2001) (Abb. 3).

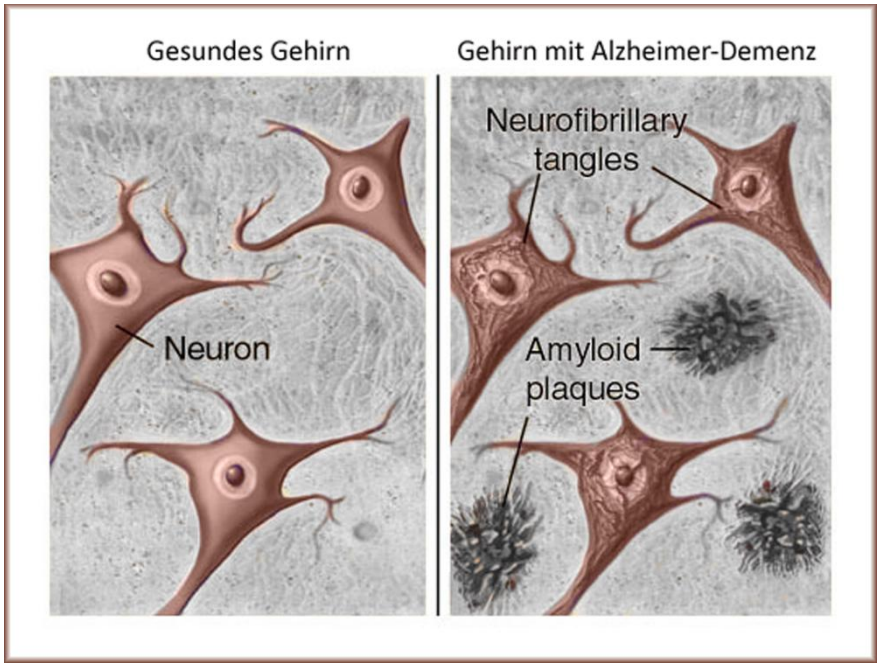

Abb. 3 Neuropathologie bei Alzheimer-Demenz im Vergleich zu einem gesunden Gehirn *(modifiziert nach American Health Assistance Foundation 2012).*

Die Rolle von Aβ in der Pathogenese von Alzheimer ist noch nicht vollständig geklärt, man geht jedoch davon aus, dass sich Aβ toxisch auf das Gehirn auswirkt (Kumar et al. 2011). Das Tau-Protein ist eine Komponente der Mikrotubuli und somit für den intrazellulären Transport, aber auch für die Entwicklung und das Wachstum von Neuriten verantwortlich. Pathophysiologisch kann das phosphorylierte Tau zu zytoskeletalen Abnormitäten führen (Duyckaerts et al. 2008, Galimberti et al. 2011). Für das hyperphosphorylierte Tau-Protein und auch für Amyloid β ist unklar, ob deren Aggregation und Ablagerung Ursache der Erkrankung ist oder sekundär entstehen.

1.2.2.1 Proteolytische Spaltung von Amyloid Precursor Protein

Amyloid-β wird mittels proteolytischer Prozessierung durch Sektretasen aus dem Amyloid-Vorläuferprotein (Amyloid Precursor Protein, APP) prozessiert (Abb. 4). Die eigentliche Funktion von APP konnte noch nicht eindeutig identifiziert werden. Studien haben jedoch gezeigt, dass APP bei der Vermittlung von Zell-Zell Kontakten und bei Zellmigration beteiligt ist (Selkoe 2001, Kang et al. 1987). Alternative Spleiß-Isoformen enthalten die Kunitz-Protease-Inhibitor-Domäne, wodurch eine weitere Funktion in der Homöostase vermutet wird (Selkoe 2001).

Bei der nichtamyloiden Prozessierung wird APP innerhalb der Aβ-Domäne durch die α-Sekretase geschnitten, wobei sAPPα und C83 entstehen und eine Bildung von Aβ verhindert wird (Steiner et al. 2000) (Abb. 4). Aβ entsteht bei der amyloiden Prozessierung durch die zwei Enzyme β-Sekretase oder BACE (beta-Site APP cleaving enzyme) und γ-Sekretase (Vassar et al. 2000) (Abb. 4). Es wird vermutet, dass die katalytische Aktivität der γ-Sekretase durch die Proteine Präsenilin I und Präsenilin II erfolgt (Steiner et al. 2000).

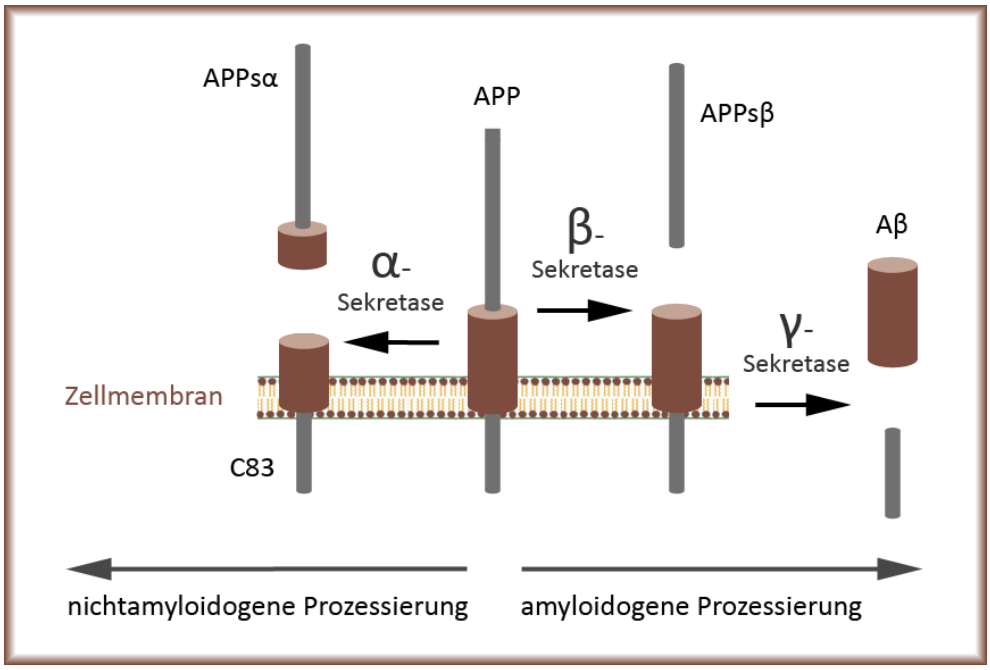

Abb. 4 Proteolytische Spaltung von Amyloid Precursor Protein (APP). *Durch die amyloidogene Prozessierung entsteht Amyloid β (Aβ).*

Unter physiologischen Umständen findet sowohl die amyloidogene Prozessierung als auch die nichtamyloidogene Prozessierung statt. Somit wird auch unter physiologischen Umständen Aβ gebildet, weshalb man bei der sporadischen Form von Alzheimer eher von einem verringerten Abtransport von Aβ als von einer verstärkten Produktion ausgeht (Kumar et al. 2007).

1.2.3 Konzentrationsänderungen von Aβ und Tau im Liquor

Die Proteine Aβ und Tau zeigen eine Akkumulation in Gehirnen von Patienten mit AD (beschrieben in 1.2.2). Im Liquor äußern sich diese Pathologien durch Konzentrationsänderungen der Proteine. Trotz der Steigerung von Aβ im Gehirn kommt es im Liquor zu einer Konzentrationsreduktion (Fagan et al. 2006). Diese gegenläufige Assoziation ergibt sich möglicherweise aus einer veränderten „Abflussfunktion“ des Gehirns und folglich einem neuen Gleichgewicht zwischen gelöstem Aβ im Liquor und abgelagertem Aβ im Gehirn. Andererseits könnte die Konzentrationsreduktion auch durch die neuronale Dysfunktion und somit einer verringerten Aβ Produktion bedingt sein (Fagan et al. 2006). Tau zeigt sowohl im Gehirn, als neurofibrilläre Bündel, als auch im Liquor (phosphoryliertes Tau, P-tau231P) gesteigerte Werte. Weiterhin bestehen signifikante Korrelationen zwischen P-tau231P im Liquor und neurofibrilläre Bündel bzw. hyperphosphoryliertem Tau in allen neokortikalen Regionen (Buerger et al. 2006).

Diese Konzentrationsänderungen sind bei fast allen Patienten mit Alzheimer-Demenz erkennbar, weshalb Aβ und Tau wichtige Biomarker und somit entscheidende Elemente der Diagnostik der AD sind. Mit der Kombination des Aβ- und Phospho-Tau-Werts gelingt eine Abgrenzung von Demenzkranken mit AD gegenüber gesunden Personen mit einer Sensitivität von 86–92% und einer Spezifität von 89% (Sunderland et al. 2003, Engelborghs et al. 2009).

1.2.4 Genetische Assoziation

Die meisten Fälle der Alzheimer-Erkrankung sind sporadisch, nur bei ca. 10% ist eine familiäre Beteiligung erkennbar. Die familiäre Form von Alzheimer kann durch diverse Mutationen in bereits bekannten Genloki bedingt sein. Beispielsweise Mutationen im Amyloid Precursor Protein, durch dessen Spaltung Amyloid-β entsteht, oder auch Mutationen in Genen für Präsenilin I und II, die vermutlich für das katalytische Zentrum der γ-Sekretase kodieren (Selkoe 2001).

Wie bei der familiären Form von Alzheimer sind bei der sehr viel häufigeren sporadischen AD genetische Assoziationen bekannt, jedoch ist die Genetik viel komplexer. Die wichtigste und bekannteste genetische Assoziation zur sporadischen AD ist das Allel ε4 des Apolipoprotein E (APOE ε4). Bei APOE ε4 heterozygoten Allelträgern ist das AD-Risiko 2–4fach, bei homozygoten 12fach erhöht (Farrer et al. 1997). Weitere genetische Veränderungen der sporadischen AD zeigen sich durch Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs, Einzelnukleotid-Polymorphismen) (Sachidanandam et al. 2001). Single Nucleotide Polymorphismen sind Variationen einzelner Basenpaare der DNA (Desoxyribonukleinsäure), die auch in der Alzheimerforschung durch genomweite Assoziationsstudien viele reproduzierbare Ergebnisse erzielten (Bertram et al. 2010) (Abb. 5).

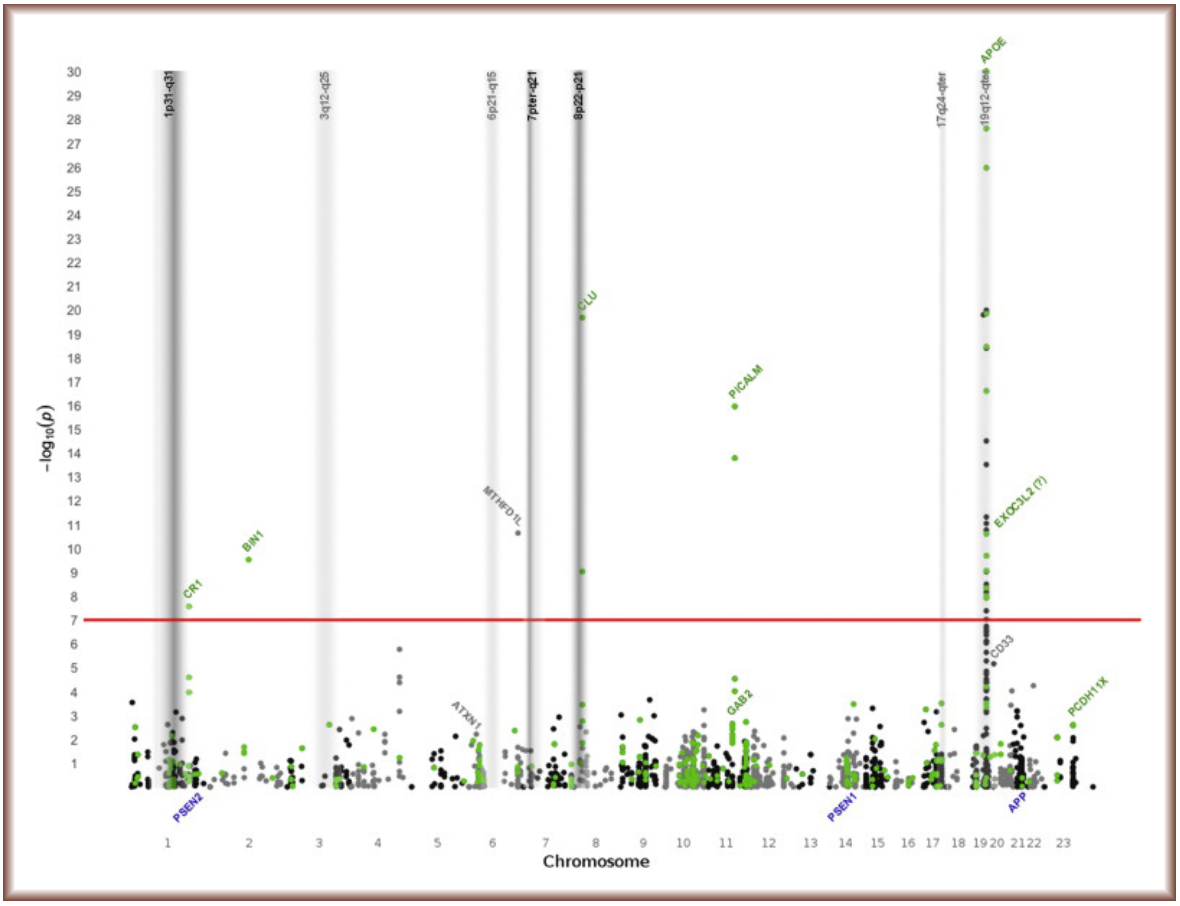

Abb. 5 ***Genomweite Assoziationsstudie****. Die Y-Achse zeigt die p-Werte (-log(10)) aller Polymorphismen (n=2033), die derzeit bei der AlzGene-Datenbank aufgelistet sind. Die X-Achse zeigt die den Genen zugehörigen Chromosomen. Grüne Punkte repräsentieren p-Werte, die von ≥4 unabhängigen Datenerhebungen stammen, schwarze/graue Punkte von einzelnen Studien oder von <4 unabhängigen Datenerhebungen. Genomweite Signifikanz (p=1x10^{-7}) trifft für Punkte über der roten Linie zu (Bertram et al. 2010).*

Wie auf der Abbildung (Abb. 5) erkennbar, zeigen nur wenige Gene eine genomweite Signifikanz der Assoziation der Gene mit AD (Bertram et al. 2010). Eines dieser Gene ist Picalm (phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein), bei welchem bereits mehrere SNPs mit AD assoziiert gefunden wurden: rs3851179 (p=1,9x10^{-8}), rs561655 (p=1x10^{-7}, Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle), rs592297 (p=2x10^{-7}, möglicher Einfluss auf Exon-Splicing Enhancer) und rs541458 (p=8x10^{-10}) (Harold et al. 2009). Das Picalm Risiko-(T)-Allel des SNP rs541458 zeigt zusätzlich eine signifikante Assoziation mit erniedrigten Aβ Level im Liquor (p=0,0023), welche typisch für AD sind (siehe 1.2.3). Der stärkste Effekt zeigte sich bei homozygoten Trägern des T-Allels gegenüber homozygoten Trägern des C-Allels von Picalm, die etwa 20% niedrigere Aβ Werte im Liquor zeigen. Diese Erkenntnisse könnten den ersten Schritt zum Verständnis des pathologischen Mechanismus der Assoziation zwischen AD und Picalm sein (Schjeide et al. 2011).

1.3 Picalm

Picalm (phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein) wurde als CALM (Clathrin assembly lymphoid-myeloid leukemia gene) durch eine seltene Translokation bei akuten lymphoiden und myeloiden Leukämien identifiziert (Dreyling et al. 1996). Picalm wird ubiquitär in allen Gewebetypen exprimiert, hauptsächlich jedoch in endothelialen Zellen (Baig et al. 2010). In Neuronen kommt Picalm sowohl an prä- als auch an postsynaptischen Strukturen vor (Yao et al. 2005), sowie in Astrozyten und Oligodendrozyten (Yao et al. 2003). Picalm zeigt sich häufig in Clustern oder in der Nähe von Picalm-Clustern angeordnet (Yao et al. 2005). Lokalisiert ist Picalm in allen Clathrin bedeckten Einbuchtungen der intrazellulären Zelloberfläche, so genannten coated pits. Zusätzlich zur Plasmamembran ist Picalm auch im Golgi-Apparat und im Zytosol lokalisiert (Tebar et al. 1999). Es existieren vier Isoformen von Picalm, full-length mit 652 Aminosäuren und drei kürzere Spleißvarianten mit 632, 610 und 551 Aminosäuren (Baig et al. 2010) (National Center for Biotechnology Information 2012).

Die N-terminale ANTH-Domäne bindet Membranlipide, speziell phosphorylierte Membraninositollipide (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP_2) (Mao et al. 2001). Die C-terminalen spezifischen Motive binden die schwere Kette von Clathrin und den Adaptorproteinkomplex 2 (Dell'Angelica 2001). Picalm ist somit möglicherweise ein Schlüsselelement bei der Clathrin vermittelten Endozytose. Die Clathrin vermittelte Endozytose dient rezeptorvermittelten Transportvorgängen über die Plasmamembran oder dem intrazellulären Transport von Makromolekülen mittels Clathrin coated vesicles (Marsh et al. 1999).

Clathrin coated vesicles werden an der Zytoplasmaseite der Plasmamembran oder am Trans-Golgi Netzwerk mithilfe von Adaptorproteine, wozu auch Picalm zählt, gebildet (Kim et al. 2001). Anschließend können diese wieder an der Plasmamembran recycelt werden, mit Lysosomen verschmelzen, was zum Abbau der Proteine führt oder mit Endosomen fusionieren, wodurch die internalisierten Targetproteine modifiziert werden (Marsh et al. 1999). Durch die Bindung an Clathrin ist Picalm beim Transport von Proteinen und Lipiden wie z.B. Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Neurotransmittern von großer Bedeutung (Yao et al. 2005, Tebar et al. 1999). Als mögliches Schlüsselelement

der Endozytose hat Picalm Einfluss auf die Form der Vesikel und kann daher die Größe der Endozytosevesikel verändern (Tebar et al. 1999). Dies könnte durch eine Interaktion von Picalm mit VAMPs (Vesicle associated membrane proteins) bedingt sein (Harel et al. 2008). VAMPs sind SNARE Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor), die für die Fusion von Vesikel z.B. an der Zellmembran verantwortlich sind. VAMPs (VAMP2, VAMP3 und VAMP8) interagieren mit der ANTH-Domäne von Picalm, was zur Bildung von Clathrin coated vesicles führt (Miller et al. 2011) (Abb. 6).

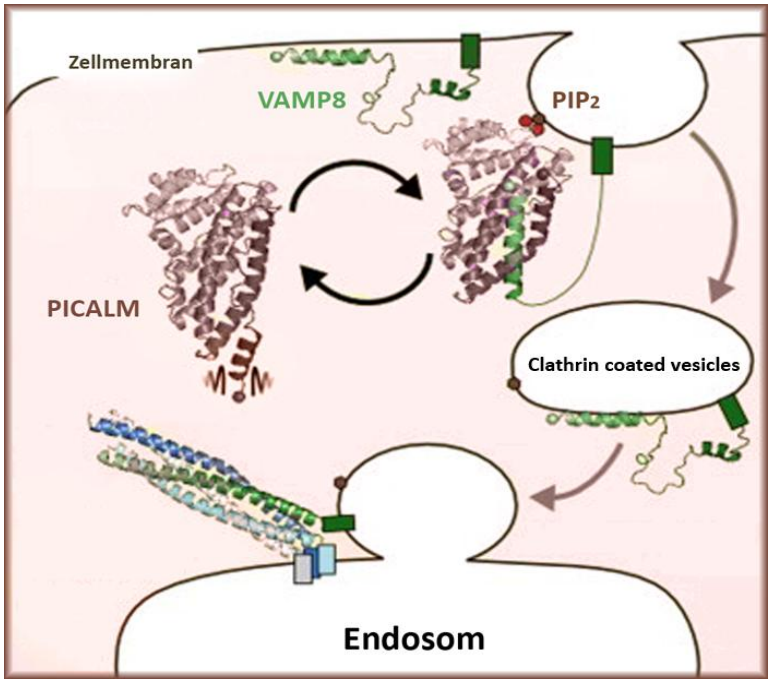

***Abb. 6 Schematische Darstellung der Bildung von Clathrin coated vesicles durch Picalm**, VAMP8 (Vesicle associated membrane protein 8) und PIP_2 (Phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate) (übersetzt und modifiziert nach Miller et al. 2011).*

Eine Überexpression von Picalm führt zur Reduktion von VAMP2, wodurch Endozytose verhindert wird (Harel et al. 2008). Zusätzlich bewirkt eine Überexpression von Picalm einen veränderten Transport von Trans-Golgi-Netzwerk-Endosomen (Tebar et al. 1999).
Aber auch bei verstärktem Abbau von Picalm, möglicherweise durch Calpain und Caspasen, deren Aktivität bei neurodegenerativen Erkrankungen erhöht ist, kann die Endozytose geblockt werden (Kim et al. 2001, Rudinskiy et al. 2009).

Die Fusion von synaptischen Vesikel an der Zellmembran ist eine entscheidende neuronale Funktion. Deren Verlust führt zur Dysfunktion der Synapsen, welche vermutlich bereits vor einer erkennbaren Degeneration besteht (Fitzjohn et al. 2001). Dieser Verlust von Synapsen würde gut zur klinischen Symptomatik, der kognitiven Defizite, von Alzheimerpatienten passen (Harold et al. 2009). Daher kann die Hypothese, dass Veränderungen in der Expression von Picalm zu Störungen der Synapsenfunktion beitragen, aufgestellt werden (Harold et al. 2009).

Alternativ könnte eine Überexpression von Picalm, durch endozytotische Veränderungen bei der Internalisierung von APP, an der Zelloberfläche zur veränderten APP Prozessierung und somit zu vermehrten Amyloidplaques führen (Xiao et al. 2012, Carey et al. 2005, Koo et al. 1994). Erhöhte Aβ-Werte könnten auch durch verringerten Abtransport, welcher möglicherweise von Picalm reguliert wird, entstehen (Koo et al. 1994).

Im Gegensatz hierzu zeigte sich Picalm in anderen experimentellen Versuchen neuroprotektiv, denn Picalm kann die Toxizität von löslichem Aβ in kortikalen Neuronen von Ratten reduzieren (Treusch et al. 2011).

Die Arbeitsgruppe Baig aus Bristol, England konnte zeigen, dass Picalm in humanem Hirngewebe des frontalen Kortex bei Alzheimerpatienten im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht ist. Am stärksten ließ sich Picalm in Endothelzellen nachweisen, weshalb die Arbeitsgruppe vermutet, dass Picalm für den Abtransport von Aβ zuständig ist (Baig et al. 2010). Aus den Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe stellt sich die Frage, ob Picalm auch im Liquor bei AD erhöht sein könnte (siehe 1.5.1).

1.4 Zytokine und Chemokine

Zu den bereits beschriebenen pathophysiologischen Mechanismen mit Amyloid β und hyperphosphoryliertem Tau kommen noch eine Vielzahl möglicherweise überlappende pathophysiologische Veränderungen, wie oxidativer Stress, Ionendysregulation, Cholesterinmethabolismus und Entzündung (Galimberti et al. 2011). Die chronische Entzündung im Gehirn spielt eine entscheidende Rolle bei der Alzheimer-Erkrankung (Griffin 2006, McGeer et al. 2002). Im Genom von Patienten mit AD wurden Veränderungen in Genen verschiedener Zyto- und Chemokine detektiert, welche diese Entzündungsreaktionen auslösen könnten (Galimberti et al. 2011). Vier dieser Zyto- und Chemokine werden in meiner Arbeit genauer betrachtet. Diese sind Interleukin-1β (IL-1β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNFα).

1.4.1 Polymorphismen bei Zyto- und Chemokinen

Ein Polymorphismus in beiden Allelen des Promotors von IL-1B, dem Gen für IL-1β, führt zu doppelt so hohem Erkrankungsrisiko für AD. Die Präsenz des Allel 2 (Genotyp 1/2 oder 2/2) im Gen IL-1A, welches IL-1α kodiert, erhöht ebenfalls das Risiko für AD. Homozygote für dieses Allel (2/2), in Verbindung mit der Homozygotie des Allel 2 von IL-1B, haben ein zehnfach erhöhtes Risiko Alzheimer zu entwickeln (Griffin et al. 2000). Das Allel 2 von IL-1A zusammen mit dem Genotyp T/T [-251] von IL-8 verdoppelt das Risiko ebenfalls. Zusätzlich wird eine Gen-Gen-Interaktion zwischen IL-1A und IL-8 vermutet (Infante et al. 2004). Eine weitere Gen-Gen-Interaktion, die zu erhöhtem Erkrankungsrisiko führt, wird zwischen IL-8 (Genotyp T/T [-251]) und Methylentetrahydrofolat-Reduktase (Genotyp T/T [677]) angenommen (Li et al. 2009).

Ein reduziertes Erkrankungsrisiko und einen verzögerten Krankheitsbeginn wurde mit dem C Allel von IL-6 assoziiert (Papassotiropoulos et al. 1999). Für TNFα sind drei Polymorphismen bei Alzheimererkrankten bekannt, welche zu erhöhter Sekretion von TNFα führen. Diese Polymorphismen führen zu einem Haplotyp 2-1-2, welcher signifikant mit AD assoziiert ist (Collins et al. 2000).

1.4.2 Zyto- und Chemokine im Gehirn

Die Präsenz einer Entzündung im Gehirn von Alzheimerpatienten zeigt sich unter anderem in einer erhöhten Konzentration der vier proinflammatorischen Zyto- und Chemokine IL-1β, IL-6, IL-8 und TNFα im Hirngewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sokolova et al. 2009). Diese gesteigerte Freisetzung könnte möglicherweise direkt durch Aβ ausgelöst werden (Lin et al. 2009, Gitter et al. 2000, Gitter et al. 1995). Die Zyto- und Chemokine beeinflussen sich auch gegenseitig: IL-1β und TNFα stimulieren Hirnzellen, hauptsächlich Astrozyten zur Synthese von IL-6 und IL-8 (Abb. 7) (Aloisi et al. 1992).

1.4.2.1 Interleukin-1β

In Gehirnen von Alzheimerpatienten ist die Interleukin-1β Expression um Amyloidplaques erhöht (Griffin et al. 1989). Unter physiologischen Bedingungen hat das Interleukin-1β verschiedene Funktionen, wie zum Beispiel das Steuern von Fieber, Appetit und Schlaf (Rothwell et al. 2000). Unter pathophysiologischen Bedingungen kann Interleukin-1β sowohl neurotoxisch als auch neuroprotektiv wirken. Einerseits kann IL-1β zu verstärkter APP-Sekretion und somit zur vermehrten Aβ Produktion, Ablagerung und Plaqueformation führen (Griffin et al. 2000). Zusätzlich wird diskutiert, ob IL-1β zu Überexpression und Phosphorylierung von Neurofilamentproteinen sowie Tau (Sheng et al. 2000) und möglicherweise auch durch Hochregulation der Acetylcholinesterase zur cholinergen Dysfunktion bei der Alzheimer-Erkrankung führt (Li et al. 2000).
Andererseits könnte IL-1β durch eine signifikante Hochregulation der α-Spaltung von APP und somit einer Reduktion von Aβ neuroprotektiv wirken, was eine Studie mit humanen Neuroblastomzellen zeigte (Tachida et al. 2008) (Abb. 7). Welche Funktion von IL-1β im Vordergrund steht, ist noch ungewiss, weshalb weitere Studien zur Erforschung der Funktion, Lage, Konzentration, usw. in unterschiedlichen Hirnregionen und im Liquor bei unterschiedlichen Krankheitsbildern notwendig sind.

1.4.2.2 Interleukin-6

Das Interleukin-6 wird im Gehirn hauptsächlich während der Entwicklung exprimiert und steuert beispielsweise metabolische Prozesse (Akiyama et al. 2000). Im gesunden erwachsenen Gehirn ist es nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden und wird streng reguliert (Vallieres et al. 1997). Mikroglia, Astrozyten, Neurone und endotheliale Zellen sind fähig IL-6 zu synthetisieren (Akiyama et al. 2000). Das IL-6 ist hauptsächlich aufgrund der destruktiven proinflammatorischen Eigenschaften, wie das Anregen von Akute Phase Proteinen, Antikörpersynthese, Erhöhen der vaskuläre Permeabilität und lymphogenen Aktivierung bekannt (Akiyama et al. 2000). Es wird jedoch auch vermutet, dass das Interleukin ebenfalls neuroprotektive, also antiinflammatorische, immunsuppressive Funktionen übernehmen kann. Dies erfolgt in der Regulation der Entwicklung, Differenzierung und Regeneration von Neuronen, sowie der indirekten Synthese von Kortikoiden (Gadient et al. 1997, Akira et al. 1993).
Weiterhin führt eine Überexpression von IL-6 in Gehirnen von APP-transgenen Mäusen zu massiver reaktiver Gliose, einer gesteigerten Anzahl an Mikroglia, die die Phagozytose von Aβ-Aggregaten durch Mikroglia indiziert und somit die Entfernung der Aβ-Plaques verbessert (Chakrabarty et al. 2010) (Abb. 7).

1.4.2.3 Interleukin-8

Chemokine, wie das IL-8, sind verantwortlich für Chemotaxis, Extravasation ins Gewebe und funktionelle Modulation von Leukozyten. Erhöhte IL-8 Konzentrationen zeigten sich bei mit Aβ stimulierten humanen Mikroglia (postmortem) und humanen Astrozyten (U-373 MG astrocytoma cells) (Gitter et al. 2000, Walker et al. 2001). Es wird vermutet, dass das IL-8 für die Rekrutierung und Akkumulation von Astrozyten und Mikroglia in senilen Plaques verantwortlich ist (Akiyama et al. 2000) (Abb. 7).

1.4.2.4 Tumor-Nekrose-Faktor α

TNFα besitzt ebenfalls sowohl neurotoxische als auch neuroprotektive Eigenschaften. Einerseits führt TNFα zum Absterben von humanen kortikalen Neuronen, andererseits ist publiziert, dass TNFα vor Glutamat, freien Radikalen und der Toxizität von Aβ in primären

Neuronen schützt (Akiyama et al. 2000). TNFα ist verantwortlich für Überleben, Differenzierung, Proliferation und Wachstum von Hirnzellen, kann aber auch zu Neuroinflammation und Neurodegeneration führen. Wann welche Funktionen von TNFα im Vordergrund stehen ist ungeklärt, wobei der Aktivierungszustand der TNFα-Rezeptoren diskutiert wird (Sriram et al. 2007). In Kombination mit Interferon γ stimuliert TNFα zusätzlich die Produktion von Aβ-Peptiden in Neuroblastomzellen und in nichtneuronalen Zellen der primären Zellkultur (Blasko et al. 1999) (Abb. 7).

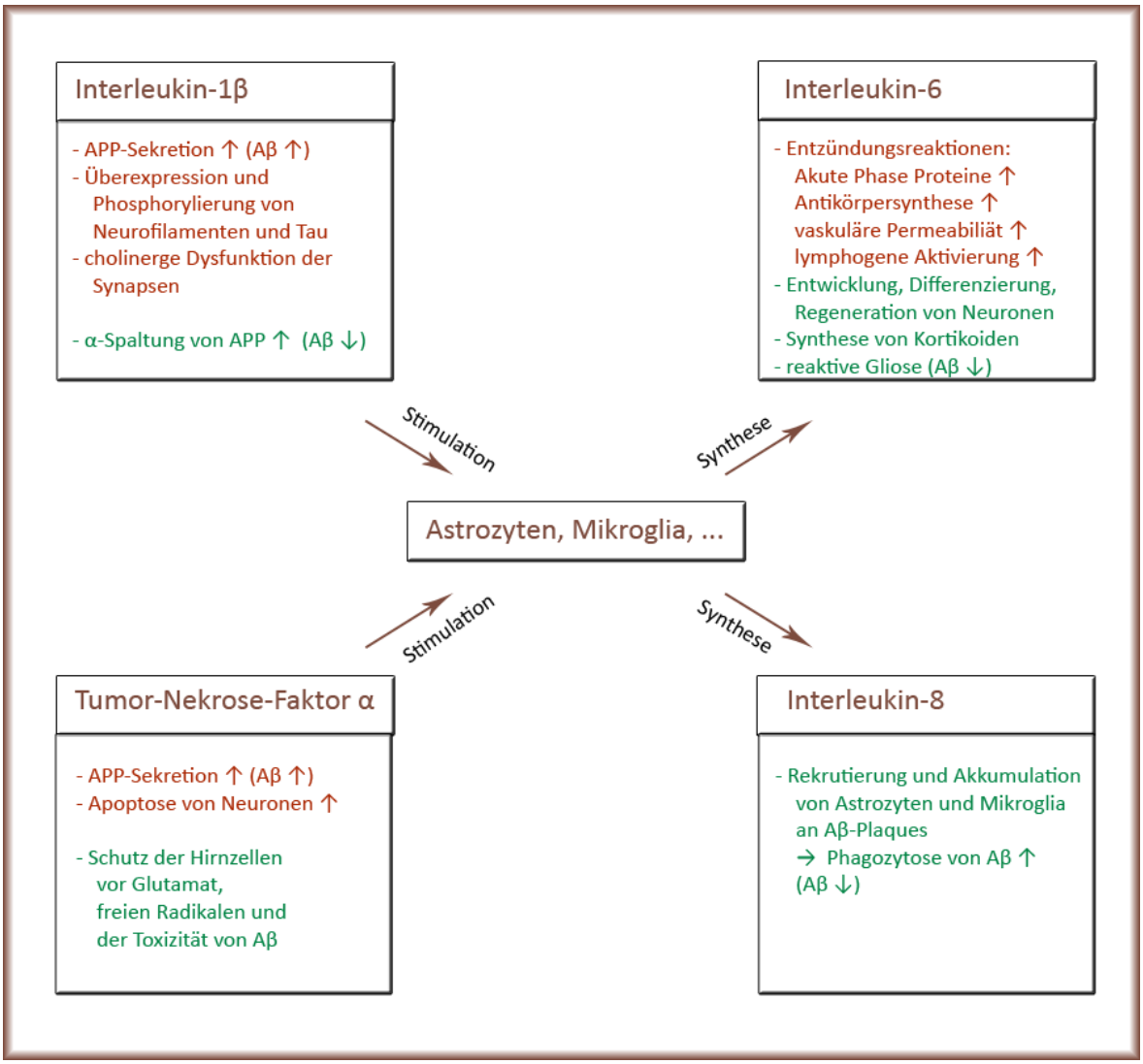

Abb. 7 Zusammenhang der Zyto- und Chemokine, sowie deren neurotoxische (rot) und neuroprotektive (grün) Funktionen: *Interleukin-1β, Interleukin-6, Interleukin-8 und Tumor-Nekrose-Faktor α. Amyloid Precursor Protein (APP), Amyloid β (Aβ).*

1.5 Hypothesen und Ziele

1.5.1 Hypothesen und Ziele - Picalm

Da die Konzentration von Picalm in humanem Hirngewebe des frontalen Kortex bei Alzheimerpatienten im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht gefunden wurde (Baig et al. 2010), stellt sich die Frage, ob Picalm möglicherweise auch im Liquor bei Alzheimerpatienten im Vergleich zu Kontrollpatienten erhöht ist. Sollte dies der Fall sein, so wäre Picalm eventuell als neuer Biomarker für die Diagnostik der AD vorstellbar. Bisher sind noch keine Daten zu Picalm im Liquor publiziert, woraus sich die Aufgabe stellt mit einen Western Blot Picalm im Liquor nachzuweisen und mögliche Unterschiede zwischen Kontrollpatienten, Patienten mit AD und Patienten mit Depression aufzuzeigen. Liquor-Proben von Depressionspatienten sollen erste Hinweise liefern, ob Veränderungen nur bei AD existieren und somit möglicherweise spezifisch für AD wären oder ob Veränderungen in beiden neurologischen Erkrankungen zu finden sind. Andere neurologische und demenzielle Erkrankungen könnten in zukünftigen Studien untersucht werden.

Die aktuellen Biomarker der AD, Amyloid β und Phospho-Tau, erzielen eine Sensitivität von 86–92% und eine Spezifität von 89%, also Werte die möglicherweise durch neue Biomarker, beziehungsweise durch Kombination mit neuen Biomarkern, verbessert werden könnten. Weiterhin ist die differenzialdiagnostische Trennschärfe der bisherigen Liquorbiomarker zwischen verschiedenen Demenzformen noch unzureichend und allgemeingültige exakte Grenzwerte für die einzelnen Parameter fehlen noch (Sunderland et al. 2003, Engelborghs et al. 2009). Liquorbiomarker, die als Verlaufsparameter der Alzheimer-Demenz fungieren könnten, wurden bisher noch nicht publiziert. Ziel der Arbeit ist es neue Biomarker im Liquor zu detektieren, die möglicherweise bessere Eigenschaften, zum Beispiel eine höhere Sensitivität und/oder Spezifität, aufweisen und somit zukünftig bei der diagnostischen Abklärung einer AD eingesetzt werden könnten.

1.5.1 Hypothesen und Ziele – Zytokine und Chemokine

Auch bei den proinflammatorischen Zyto- und Chemokinen IL-1β, IL-6, IL-8 und TNFα zeigten sich bei Alzheimerpatienten erhöhte Konzentrationen im Hirngewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sokolova et al. 2009). Daher ist es sinnvoll, auch im Liquor die Konzentrationen dieser Zyto- und Chemokine zu bestimmen, mit dem Ziel neue Biomarker zu detektieren. Liquoruntersuchungen von depressiven Patienten sollen erneut zeigen, ob Veränderungen auch bei anderen neuronalen Erkrankungen zu finden sind. Einerseits könnten Gemeinsamkeiten der Erkrankungen erkannt werden, andererseits könnten unterschiedliche Ergebnisse für eine spezifische Veränderung, z.B. bei Alzheimer-Demenz, sprechen. Um die wichtigsten Eigenschaften eines Biomarkers, die Sensitivität und Spezifität für AD zu ermitteln, werden für alle Zyto- und Chemokine ROC-Kurven (Receiver Operating Characteristic) erstellt. Aus diesen Erkenntnissen können Rückschlüsse gezogen werden, ob das jeweilige Zyto- oder Chemokin sich als Biomarker eignen würde.

Um den Zusammenhang der Entzündungsprozesse mit der Erkrankung Alzheimer-Demenz genauer verstehen zu können, werden Korrelationen der Zyto- und Chemokine zu krankheitsspezifischen Parametern der Patienten, unter anderem Aβ und Tau, errechnet. Weiterhin können durch Korrelation der Zyto- und Chemokinkonzentrationen im Liquor und Serum derselben Patienten Rückschlüsse über die Passierbarkeit der Proteine über die Blut-Liquor-Schranke gestellt werden. Vorteile der Verwendung eines Human ProInflammatory II 4-Plex Assays sind einerseits die Untersuchung von vier Zyto- und Chemokinen gleichzeitig und somit eine höhere Chance, mögliche Biomarker zu detektieren. Andererseits kann untersucht werden, wie sich die Zyto- und Chemokine untereinander beeinflussen, um mehr Erkenntnisse über den Entzündungsprozess im Gehirn von Alzheimerpatienten zu erlangen.

Diese Arbeit dient einerseits der Suche nach neuen Biomarkern für die Diagnose der Alzheimer-Demenz, andererseits sollen weitere Erkenntnisse über die Alzheimer-Demenz dazu beitragen, die Bedeutung der chronischen Entzündung bei AD nicht zu unterschätzen, um zukünftig neue therapeutische Ansätze, wie eine antiinflammatorische Therapie bei AD, zu entwickeln.

2 Material und Methoden

2. 1 Material

2.1.1 Patientenmaterial: Liquor, Serum und humane Hirnlysate

Liquor- und Serumproben stammen aus dem Liquorlabor der neurologischen Universitätsklinik im RKU (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm) in Ulm (Probenentnahme 2001–2010). Die experimentellen Versuche mit dem Liquor fanden im Einverständnis der Ethikkommission der Universität Ulm (EC Nummer: 67-2001) statt. Die Patienten willigten nach Aufklärung schriftlich in die naturwissenschaftliche Nutzung der Proben ein. Das humane Hirngewebe wurde von der Hirnbank der Universitätsklinik Ulm erhalten und durch Dr. rer. nat. Björn von Einem lysiert und eingefroren (Wir danken einerseits der Sektion Neuropathologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dietmar Thal und andererseits Dr. rer. nat. Björn von Einem (von Einem 2010)). Die klinische Diagnose basiert sowohl auf den Kriterien des Diagnostischen und Statistischen Handbuchs Psychischer Störungen (DSM IV, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), als auch auf der Internationalen Klassifikation der Krankheiten ICD-10 und den Biomarkern Aβ und Tau im Liquor. Kontrollpatienten und Depressionspatienten zeigten unauffällige Liquorbefunde, insbesondere bezüglich Zellzahl, Gesamtprotein, Laktat, Blut-Liquor-Schrankenstörungen und den Biomarkern Aβ und Tau. Andere Diagnosen der depressiven Patienten und Kontrollpatienten, welche keine pathologischen Liquorveränderung bewirkten, wurden nicht weiter berücksichtigt (Galimberti et al. 2006).

2.1.1.1 Liquor-Proben für die Immunpräzipitation (3.1.3.7)

Tab. 1 Liquor-Proben für die Immunpräzipitation um Picalm im Liquor zu detektieren.
Liquor-Proben entstammen der neurologischen Universitätsklinik Ulm (2001–2010). Alzheimer-Demenz (AD), Mini-Mental-Status-Test (MMST), Apolipoprotein E (ApoE).

Liquor Lane	Alter [Jahren]	Geschlecht M=männlich W=weiblich	Diagnose	MMST	ApoE im Blut	Tau im Liquor [pg/ml]	Amyloid β im Liquor [pg/ml]	Gesamtprotein im Liquor [mg/l]
1	66	W	AD	14	4/4	1174	507	589
4	67	M	AD	18	4/4	1447	498	515
7	69	W	AD	18	3/4	1009	376	573
2	58	M	Depression	29	3/4	176	949	613
5	68	M	Depression	27	3/3	124	763	513
8	77	M	Depression	26	3/3	309	727	664
3	73	W	Kontrolle			293	668	343
6	75	M	Kontrolle			316	593	457
9	74	W	Kontrolle			148	689	555

Der Mini-Mental-Status-Test und das Apolipoprotein E wurden bei den Kontrollpatienten (Kontrolle) nicht erhoben.

Tab. 2 Normwerte von gesunden Patienten.

Parameter der Patienten	Normwerte
Mini-Mental-Status-Test	≥ 26
Tau	< 300 pg/ml
Amyloid β	> 550 pg/ml
Gesamtprotein	200–600 mg/l

Bei der Wahl der Liquor-Proben für die Immunpräzipitation (3.1.3.7) wurde sowohl auf die Biomarker geachtet, als auch auf eine relativ hohe Proteinkonzentration, um mit den bestmöglichen Voraussetzungen den Versuch zu beginnen. Die Proteinmenge wurde entsprechend hoch gewählt, dass falls Picalm in sehr geringer Konzentration im Liquor vorhanden sein sollte, das Experiment mit einer möglichst großen Menge an Picalm begonnen werden konnte.

2.1.1.2 Liquor-Proben für die Zyto- und Chemokinbestimmung mit Liquor

Tab. 3 ***Demographische Datentabelle der Patientenproben*** *der Zyto- und Chemokinbestimmungen mit Liquor bei Patienten mit Alzheimer-Demenz (AD), Depression und Kontrollpatienten (Kontrollen). Liquor-Proben entstammen der neurologischen Universitätsklinik Ulm (2001–2010). Interquartile range (IQR), Mini-Mental-Status-Test (MMST), Fallzahl (n).*

	AD	Depression	Kontrollen
Fallzahl (n)	54	34	41
Alter [Jahren] Median (IQR)	73 (78–68)	58 (64–52)	71 (76–68)
Geschlecht männlich/weiblich	15/39	19/15	15/26
MMST Median (IQR)	22 (24–19) n = 50	28 (30–26) n = 33	
Tau [pg/ml] Median (IQR)	610 (966–412)	196 (280–124)	252 (353–177)
Amyloid β [pg/ml] Median (IQR)	427 (479–342)	892 (1242–779)	639 (804–484)
Gesamtprotein [mg/l] Median (IQR)	454 (544–346)	408 (483–350)	388 (527–329)

Der MMST wurde bei den Kontrollpatienten nicht erhoben.

2.1.2 Chemikalien

Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, D), Roth (Karlsruhe, D), Serva (Heidelberg, D), Merck (Darmstadt, D), ThermoFischer Scientific (Rockford, USA) AppliChem (Darmstadt, D) und Amersham Biosciences (Freiburg, D) erhalten. Material für die Zellkultur wurde von Gibco (Invitrogen) (Karlsruhe, D), PAA (Pasching, A) oder Seromed Biochrom AG (Berlin, D) und die Plastikmaterialien von Greiner Labortechnik GmbH (Solingen, D), Eppendorf (Hamburg, D), MatTek Corporation (Ashland, USA) oder Nunc (Wiesbaden, D) erworben.

2.1.3 Puffer

Tab. 4 Verwendete Puffer. *Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Bovines Serumalbumin (BSA), Ribonuklease (RNAase), Lithium dodecyl sulfate (LDS), Dithiothreitol (DTT), 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS), Phosphate buffered saline (PBS), Natriumdodecylsulfat (SDS), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES).*

Puffer	Zusammensetzung
Brain extraction buffer (BEX)	25 mM Tris pH 8.0, 20 mM NaCl, 0.6% w/v Deoxycholate, 0.6% w/v Nonidet P-40
Cell lysis buffer (Miltenyi) TritonR X-100 lysis buffer	150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM Tris HCl (pH 8.0)
Easy Prep lysis buffer (-20 °C)	10 mM Tris, 1 mM EDTA, 15% w/v Sucrose, 0.2% w/v Lysozym, 0.01% w/v BSA, 0.04% w/v RNAase
TE (Tris, EDTA) Puffer	1 mM Tris, 1 mM EDTA
TAE (TrisAcetat, EDTA) Puffer	0.04 M TrisAcetat; 1 mM EDTA (pH 8,0)
NuPage LDS Sample Buffer	NuPAGE® LDS Sample Preparation Buffer (pH 8.4)
NuPage Reducing Agent	500 mM dithiothreitol (DTT)
MOPS SDS Running Buffer	50 mM MOPS, 50 mM Tris Base, 0.1% SDS, 1 mM EDTA (pH 7.7)
Transfer buffer pH 8.0	25 mM Tris, 25 mM Bicin, 10% Methanol
Blocking buffer	1x RotiBlock (Roth)
Washing buffer (Western Blot)	1x PBS, 0.1% v/v Tween-20
Washing buffer (ELISA)	1x PBS, 0.05% v/v Tween-20
Lösung 2 (ELISA)	1x PBS, 1% BSA
Lower Tris buffer (pH 8,8) - 1	1,5 M Tris-HCl, 0,4% w/v SDS
Lower Tris buffer (pH 8,8) - 2	1,5 M Tris-HCl, 4% w/v SDS
Upper Tris buffer (pH 6,8) - 1	0,5 M Tris-HCl, 0,4% w/v SDS
Upper Tris buffer (pH 6,8) - 2	0,5 M Tris-HCl, 4% w/v SDS
HEPES buffer	4 mM HEPE, 20% v/v Glycerin, 4% w/v SDS
Lower Tris buffer (pH 8,8) mit Glycerin und DTT – 1	1,5 M Tris-HCl, 4% w/v SDS, 20% v/v Glycerin, 200 mM DTT
Lower Tris buffer (pH 8,8) mit Glycerin und DTT – 2	1,5 M Tris-HCl, 4% w/v SDS, 20% v/v Glycerin, 400 mM DTT
Upper Tris buffer (pH 6,8) mit Glycerin und DTT	1,5 M Tris-HCl, 4% w/v SDS, 20% v/v Glycerin, 400 mM DTT
Standard-Zelllysepuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris-HCL, 2 M Thiourea, 7 M Urea, 4% w/v Chaps, 1% w/v DTT
Standard-Zelllysepuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris-HCL, 2 M Thiourea, 7 M Urea, 4% w/v Chaps, 1% w/v DTT
Upper Tris buffer (pH 6,8) – 3	0,5 M Tris-HCl, 10% w/v SDS

Upper Tris buffer (pH 6,8) – 4	0,5 M Tris-HCl, 20% w/v SDS
Upper Tris buffer (pH 6,8) – 5	0,5 M Tris-HCl, 4% w/v SDS; 10% v/v β-Mercaptoethanol
Upper Tris buffer (pH 6,8) – 6	0,5 M Tris-HCl, 50% w/v SDS
Upper Tris buffer (pH 6,8) – 7	0,5 M Tris-HCl, 80% w/v SDS

2.1.4 Bakterien, Kulturmedien und Antibiotika

2.1.4.1 Bakterienstamm

Tab. 5 Verwendeter Bakterienstamm zur Vervielfältigung des Picalm cDNA Konstrukts.

Bakterienstamm
Escherichia coli DH5α (F- end A1 hsd R17 (rk-, mk+) sup E44 thi-1 λ - rec A1 gyr A96 rel A1 Δ(arg F- lac ZYA) U 169 ϕ80d lacZΔM15)

2.1.4.2 Kulturmedium der Bakterien

Tab. 6 Verwendete Kulturmedien für den Bakterienstamm *(Tab. 5).*

Kulturmedium	Katalognummer	Zusammensetzung	Hersteller
Lysogeny-Broth (LB) medium	X968.1	10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Yeast extract, 10 g/l NaCl	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Lysogeny-Broth (LB) agar	X969.2	10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Yeast extract, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar	Carl Roth, Karlsruhe (D)
S.O.C. Medium (Super Optimal Broth mit 20 mM Glucose)	15544-034	2% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Glucose	Invitrogen, Karlsruhe (D)

LB-Medium und Agar wurden in destilliertem Wasser gelöst und nach den Instruktionen des Herstellers autoklaviert und Antibiotika hinzugefügt.

2.1.4.3 Antibiotika

Tab. 7 Verwendete Antibiotika für die Bakterienkultur.

Antibiotikum	Arbeitskonzentration	Katalognummer	Hersteller
Ampicillin	50 µg/ml	11593-027	Invitrogen, Karlsruhe (D)
Penicillin/Streptomycin (100x)	320 µg/ml / 100 µg/ml	15070-063	Invitrogen, Paisley (UK)

2.1.5 Zellen und Zellkulturmedium

2.1.5.1 Zelllinien

Tab. 8 Verwendete Zelllinien als Positivkontolle um Picalm im Liquor zu detektieren.

Zelllinie
Neuro-2A mouse neuroblastoma cells (DSMZ no.: ACC 148)
HEK293 human embryonal kidney (DSMZ no.: ACC 305)
SH-SY5Y human neuroblastoma cells (DSMZ no.: ACC 209)

2.1.5.2 Zellkulturmedium

Tab. 9 Verwendetes Zellkulturmedium.

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	DMEM 1x (4.5 g/L Glucose, L-Glutamine, Pyruvate) (Gibco) 10% FCS 1x Penicillin/Streptomycin Mix (Gibco)	Invitrogen, Karlsruhe (D) PAA, Pasching (A) Invitrogen, Karlsruhe (D)

2.1.5.3 Primäre Zellen

Tab. 10 Primäre Zellen (Maus) zum Nachweis von Picalm in verschiedenen Hirnzellen.
Die primären Zellen wurden dankenswerterweise von Anke Hellrung (Hellrung 2010) und der Arbeitsgruppe unter der Leitung von Dr. rer. nat. Anke Witting (Ferger et al. 2010) zur Verfügung gestellt.

Primäre Zellen	Entwicklung
Hippokampale Neurone	Entwicklungszeitpunkt E18
Astrozyten	postnatal
Mikroglia	postnatal

2.1.6 Plasmidvektor und Konstrukt

***Tab. 11 Plasmidvektor des Picalm Konstrukts** (Abb. 8).*

Vektor	Resistenz	Hersteller
pCMV6-XL4	Ampicillin	OriGene, Rockville (USA)

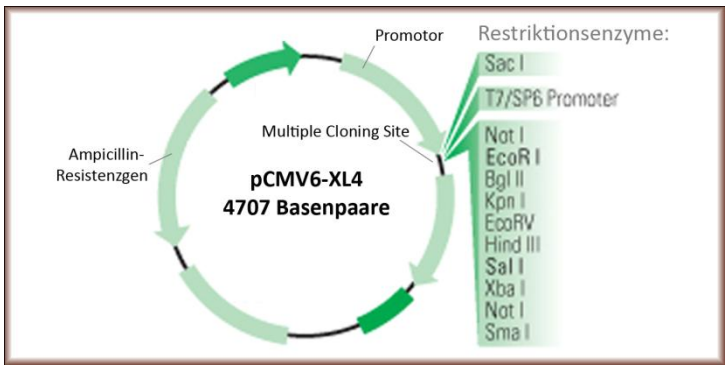

***Abb. 8 Plasmidvektor (pCMV6-XL4) des Picalm Konstrukts** (übersetzt und modifiziert nach OriGene 2013).*

Tab. 12 Picalm cDNA Kontrukt.

Konstrukt	Spezies	Cat.No.	Ref.ID	Vektor
Picalm	human	SC127391	NM_007166	pCMV6-XL4

2.1.7 Enzyme und Enzympuffer

Tab. 13 Verwendetes Enzym zur Restriktion des Plasmidvektors.

Enzyme	Hersteller
Restrikionsenzym Hind III	New England Biolabs, Ipswich (USA)

***Tab. 14 Enzympuffer zum Enzym Hind III** (Tab. 13).*

Enzympuffer	Hersteller
Enzympuffer 2	New England Biolabs, Ipswich (USA)

2.1.8 Antikörper

Tab. 15 ***Verwendete Erstantikörper.*** *Grün fluoreszierendes Protein (GFP).*

Erstantikörper	polyklonal/ monoklonal	Spezies	Arbeits-konzentration	Hersteller
Anti-Picalm (sc-6433)	polyklonal	Goat	1:1000 1:500	Santa Cruz (USA)
Anti-β-Actin	monoklonal	Mouse	1:7500	Sigma, St. Louis (USA)
Anti-GFP N-terminal	monoklonal	Rabbit	1:2500	Sigma, St. Louis (USA)
Anti-c-Myc (9E10) (M4439)	monoklonal	Mouse	1:5000	Sigma, St. Louis (USA)
Anti-Ubiquitin (u5379-1vl)	polyklonal	Rabbit	1:100	Sigma, St. Louis (USA)

Tab. 16 ***Verwendete Zweitantikörper.*** *Meerrettichperoxidase (HRP).*

Zweitantikörper	polyklonal/ monoklonal	Spezies	Arbeits-konzentration	Hersteller
HRP Anti-Goat	monoklonal	Rabbit	1:10000 1:5000	Invitrogen, Karlsruhe (D)
HRP Anti-Mouse	monoklonal	Goat	1:5000	Invitrogen, Karlsruhe (D)
HRP Anti-Rabbit	monoklonal	Goat	1:5000	Intitrogen, Karlsruhe (D)
Clean-Blot IP Detection Reagent (HRP) (21230)			1:1000	Thermo Scientific, Rockford (USA)

2.1.9 Marker/Standards der molekularen Masse

Tab. 17 ***Marker und Standards*** *für Agarose und SDS (Natriumdodecylsulfat) Polyacrylamid Gelelektrophorese.*

Marker	Cat.No	Hersteller
MassRuler™ Express DNA Ladder Mix (supplied with 6x Loading Dye)	SM1293	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Novex® Sharp PreStained Protein Standard	LC5800	Invitrogen, Paisley (UK)
MagicMark™ XP Western Protein Standard	LC5602	Invitrogen, Paisley (UK)

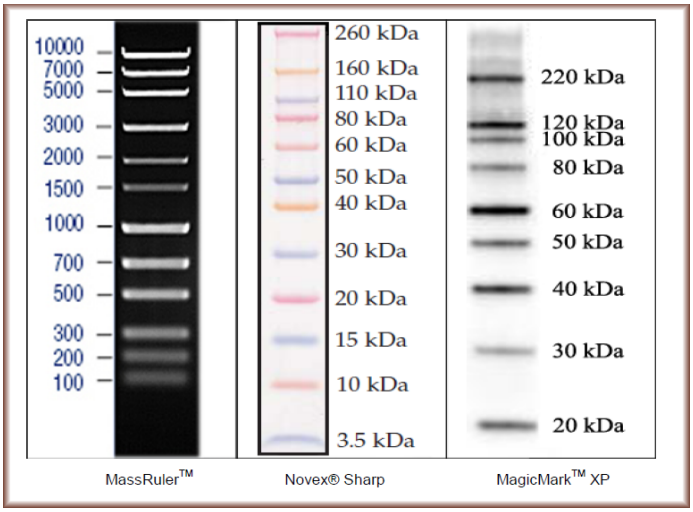

Abb. 9 Marker und Standards (Tab. 17) der molekularen Masse [kDa].

2.1.10 Kits und Assays

Tab. 18 Kits und Assays.

Name	Cat.No	Hersteller
BCA (Bicinchoninsäure) protein Assay Reagent Kit	23227	Thermo Scientific, Rockford (USA)
MemCode™ Reversible Protein Stain Kit – for PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membranes	24585	Thermo Scientific, Rockford (USA)
SYPRO® Ruby Protein Blot Stain	S-11791	Invitrogen, Paisley (UK)
ProteoSeek™ Albumin/IgG Removal Kit	89875	Thermo Scientific, Rockford (USA)
µMACS™ Protein A/G MicroBeads MultiMACS™ Protein A/G Kit	130-071-101	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit	K2100-10	Invitrogen, Paisley (UK)
EndoFree Plasmid Maxi Kit	12362	Qiagen, Hilden (D)
MSD® 96-well Multi-Spot® Human ProInflammatory II 4-Plex Assay Ultra-Sensitive Kit; IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α	K15025C	Meso Scale Discovery (MSD), Gaithersburg (USA)
INNOTEST hTAU Ag	80323	INNOGENETICS N.V., Gent (B)
INNOTEST β-AMYLOID(1-42)	80324	INNOGENETICS N.V., Gent (B)

2.1.11 Geräte und Programme/Software

Tab. 19 Geräte und Programme/Software.

Gerät/Programm	Hersteller/URL
CCD-Camera (LAS1000 Intelligent dark box)	FujiFilm GmbH, Düsseldorf (D)
Cell culture incubator (Biosafe eco)	Heraeus, Hanau (D)
Centrifuges: Mini centrifuge (Minispin plus (F 45-12-11 rotor)), Refrigerated centrifuges (Centrifuge 5417R (F 45-24-11 rotor), Megafuge 1.0R)	Eppendorf, Hamburg (D) Heraeus, Hanau (D)
Confocal Microscope (LSM 510 Meta)	Carl Zeiss, Jena (D)
Gel electrophoresis chamber (Sub-Cell GT)	Biorad, München (D)
Incubator 37 °C (Certomat® R, H)	B. Braun Biotech International, Melsungen (D)
Laminar flow (Herasafe)	Heraeus, Hanau (D)
Microplate scanning spectrophotometer (PowerWave200)	BIO-TEK Instruments, Bad Friedrichshall (D)
Pipettes (Research, Research 12-channel, Multipette plus dispenser)	Eppendorf, Hamburg (D)
Power supply (Power Pac 200)	Biorad, München (D)
Rotary Shaker (Rotamax 120)	Heidolph, Schwabach (D)
Scales (Adventurer, Scout)	Ohaus, Pine Brook, NJ (USA)
SDS (Natriumdodecylsulfat) Polyacrylamid Gelelektrophorese chamber (Criterion)	Biorad, München (D)
Semidry blotter (Trans-Blot SD)	Biorad, München (D)
Spectrophotometer (Nanodrop1000 v. 3.7.1)	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Thermomixer (Thermomixer comfort) Vortexer (Reax top)	Eppendorf, Hamburg (D) Heidolph, Schwabach (D)
SECTOR Imager 2400	Meso Scale Discovery (USA)
Image Quant TL	GE Healthcare Life Sciences (USA)
Sigma Stat 3.5	SYSTAT, Erkrath (D)
R 2.14.0	http://www.r-project.org/index.html
Basic Local Alignment Search Tool	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
UniProt	http://www.uniprot.org/

2.1.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Sigma Stat 3.5. und den Funktionen „ANOVA on ranks“ und „Describe Data…“. Die angewandten Tests waren der Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks und der Mann-Whitney Rank Sum Test zur Analyse der Zyto- und Chemokindaten. Korrelationen wurden mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman bestimmt. Die ROC-Kurven wurden mit dem Programm R (Version 2.14.0) erstellt. Signifikant wurden Daten bei p-Werten von $p<0,05$. Western Blots wurden mit ImageQuant TL von GE Healthcare ausgemessen. Die statistische Auswertung erfolgte nach ausführlicher Beratung der Mitarbeiter des Instituts für Epidemiologie und Medizinische Biometrie und des Instituts für Neuroinformatik der Universität Ulm.

2.2 Methoden

2.2.1 Umgang mit rekombinanten Bakterienzellen

2.2.1.1 Erstellen chemisch kompetente Escherichia Coli

Für Z-kompetente DH5α E. coli wurde das Z-Competent *E. coli* Transformation Buffer Set™ nach Instruktionen des Herstellers verwendet. Die Zellen wuchsen in LB (Lysogeny Broth) Medium mit Nalidixinsäure (15 µg/ml) bis 0.4–0.6 OD600 nm. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in kompetentem Puffer resuspendiert, in Eppendorf Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.2 Transformation von Bakterienzellen

Nach Anleitung des Herstellers wurde das gekaufte cDNA Konstrukt der Isoform I von Picalm auf eine Konzentration von 100 ng/µl verdünnt, 10 Minuten auf Eis inkubiert und bei -20 °C gelagert (Abb. 8).

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 2 µl Plasmid hinzugefügt und kurz geschüttelt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis wurden 250 µl erwärmtes S.O.C. (Super Optimal Broth mit 20 mM Glucose) Medium (37 °C) dazugegeben und für eine Stunde auf dem Schüttler (700 rpm) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50–200 µl dieser Kultur auf

eine vorgewärmte LB Agar Platte, welche bereits die richtige Konzentration Antibiotikum enthielt gegeben und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen konnten die Klone gepickt und eine Easyprep oder Miniprep begonnen werden, um anschließend mit einer Mini- oder Maxiprep Plasmid-DNA für eine Transfektion extrahieren zu können.

2.2.1.3 Plasmidisolation mittels Easyprep

Die Easyprep Methode wird angewandt um positive Klone zu selektieren. Der Verschluss eines 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß wurde drei Mal mit einer Nadel durchstochen um eine ausreichende Belüftung zu ermöglichen. Es wurden nun 1 ml LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthält, in das Gefäß gegeben. Anschließend wurden Klone gepickt und über Nacht auf dem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Proben für 30 s bei 14 000 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 50 µl Easyprep Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten auf dem Schüttler (600 rpm) bei 37 °C wurden die Proben bei 100 °C für 30 s aufgekocht und anschließend eine Minute auf Eis inkubiert. Als letzter Schritt wurden die Proben bei Raumtemperatur (RT) für 20 Minuten bei 14 000 x g zentrifugiert und 3–5 µl des Überstandes für Restriktionsanalysen verwendet.

2.2.1.4 Restriktion (Verdau) der Plasmid-DNA

Mit einem Verdau können DNA-Fragmente generiert werden, welche anschließend mittels einer Agarose Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt werden können. Der Verdau der Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym (Hind III, Tab. 13, Abb. 8) und geeignetem 1x Enzympuffer (Enzympuffer 2, Tab. 14) wurde nach den Instruktionen des Herstellers (New England Biolabs) durchgeführt.

2.2.1.5 Agarose Gelelektrophorese

Die Agarose Gelelektrophorese ist eine Methode um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. Dies wird durch Bewegung der negativ geladenen Nukleinsäuren durch eine Agarosematrix, über der ein elektrisches Feld liegt, möglich, wobei sich kleine Moleküle schneller und weiter bewegen als größere (Elektrophorese).

Agarosegele bestehen aus 0,8% bis 4,0% Agarose in einem 1x TAE-Puffer (0.04 M TrisAcetat; 1 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), pH 8.0), das in einer Mikrowelle aufgekocht wurde und nach einer Zugabe von Ethidiumbromid in eine Gelkammer gegeben wurde. Das Ethidiumbromid interagiert mit DNA und fluoresziert unter ultraviolettem Licht orange. Der Gelkamm wurde in das noch heiße, flüssige Gel eingefügt, um Taschen für die Proben zu erzeugen und nach dem erkalten des Gels wieder entfernt. Anschließend wurde das Gel in die Gelelektrophoresekammer überführt und mit 1x TAE-Puffer überdeckt. Zu den DNA-Proben wurde Loading Dye (Fermentas) gegeben, vermischt und in die Taschen des Gels gefüllt. Um die Größe, der DNA-Fragmente abschätzen zu können wurde in eine weitere Tasche der MassRuler™ Express DNA Ladder Mix (Fermentas) gegeben (Abb. 9). Nach Auftrennen durch Elektrophorese wurde das Gel ultraviolettem Licht ausgesetzt und die dadurch sichtbaren DNA-Fragmente mittels Dunkelkammer und Software von Biorad fotografiert.

2.2.1.6 Plasmid-DNA Extraktion

Für Transfektionen wurde Plasmid-DNA mittels Miniprep oder Maxiprep Kit nach den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Hierfür wurden 3 ml (Miniprep) oder 150 ml (Maxiprep) LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einem E. coli Klon angeimpft und über Nacht auf einem Schüttler (160 rpm) bei 37 °C inkubiert. Die Extraktion der DNA erfolgte am folgenden Tag.

2.2.1.7 Messung der DNA-Konzentration

Um die DNA-Konzentration zu bestimmen, wurde ein Nanodrop-Spektrometer verwendet.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden in DMEM Medium (1x DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 10% FCS (Foetal Calf Serum), 1x Penicillin/Streptomycin) in T-75 Flaschen unter Standardbedingungen (37 °C, 5% CO_2) kultiviert. Neuro-2A Zellen wurden bei voller

Konfluenz jeden dritten bis vierten Tag in einem Verhältnis von 1:20 gesplittet. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1x phosphate buffered saline (PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{3+}) gewaschen und 2 ml Trypsin/EDTA Lösung hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen, um sie vom Boden der Flasche abzulösen, für 2–3 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nun wurden 5–6 ml erwärmtes DMEM Medium hinzugegeben und die Zellen in ein 15 ml Tube überführt. Nachdem die Zellen für 3 Minuten bei 900 x g unter RT abzentrifugiert wurden, wurde das Pellet in 5 ml frischem DMEM resuspendiert und 500 µl der resuspendierten Zellen in die T-75 Flasche, welche 12 ml DMEM Medium enthält, gegeben um die Zellkultur beizubehalten. Um Zellen für eine Transfektion vorzubereiten, wurden sie in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und je nach Format der Platten die entsprechende Anzahl ausgesät.

2.2.2.2 Transfektion von Zellen

Um spezielle Proteine in Zellen der Zellkultur überexprimieren zu können, wurden Vektoren (Abb. 8), die die entsprechende cDNA des gewünschten Proteins beinhalten, mittels Transient Transfektion in die Zellen gebracht. Nach dem Aussäen der Zellen auf 35 mm, 60 mm, 100 mm oder 24-well Zellkulturplatten inkubierten die Zellen bei 37 °C und 5% CO_2 bis sie eine Konfluenz von 70–90% erreicht hatten.

2.2.2.2.1 Transfektion mit SatisFection

Für eine Transfektion von Neuro-2A Zellen wurde das Transfektionsreagenz SatisFection (Stratagene) verwendet. Nach den Anleitungen des Herstellers wurde serum- und antibiotikumfreies DMEM Medium mit der DNA vermischt. In einem separaten Eppendorf Reaktionsgefäß wurde die gleiche Menge des Mediums mit SatisFection vermischt und tropfenweise in das Medium-DNA-Gemisch pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei RT wurde das Gemisch auf die Zellen gegeben und durch schwenken vorsichtig verteilt. Für eine adäquate Expression wurden die Zellen für 24–48 Stunden bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert, bevor sie lysiert werden konnten.

2.2.2.2.2 Transfektion mit der Calciumphosphat-Methode

Um HEK293 Zellen zu transfizieren, wurden die Zellen am Tag zuvor auf einer 100 mm Schale ausgesät. Am nächsten Morgen wurden 30 µg Plasmid-DNA mit 500 µl 1x HBS

(HEPES Buffer Solution) (20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM Dextrose, 50 mM KCl, 140 mM $Na_2HPO_4(7H_2O)$; pH 7,1) in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden 30 µl 2.5 M $CaCl_2$ hinzugegeben, vorsichtig gemischt und 20 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde das Gemisch tropfenweise auf die Zellen gegeben, durch schwenken vorsichtig verteilt und für 24–48 Stunden bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert, bevor sie lysiert werden konnten.

2.2.2.3 Zellen lysieren

Um überexprimierte oder endogene Proteine in einem Western Blot nachweisen zu können, müssen die Zellen nach der Transfektion lysiert werden. Zuerst wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen. Je nach Größe der Zellkulturplatte wurde die entsprechende Menge von brain extraction buffer BEX (Bai et al. 2008) oder der Lysepuffer von Miltenyi mit zugesetztem HALT (protease/phosphatase inhibitor cocktail (Thermo)) auf die Zellen gegeben und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von den Platten mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nachdem das Lysat für 10 Minuten bei 14 000 x g bei 4 °C zentrifugiert wurde, wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Wurde das Zelllysat nicht sofort benötigt, konnte es bei -20 °C eingefroren werden.

2.2.3 BCA Protein Assay Kit (Thermo)

Um die Proteinkonzentration eines Lysats zu bestimmen, damit bei einem Western Blot gleiche Mengen an Protein aufgetragen werden können, wurde das BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay Kit (Thermo) eingesetzt. Es wurden auf eine 96-Well Platte je 20 µl der acht verschiedenen BSA (Bovines Serumalbumin)-Standardlösungen in einer Doppelbestimmung aufgetragen (0 µg/µl, 0.125 µg/µl, 0.25 µg/µl, 0.50 µg/µl, 0.75 µg/µl, 1.0 µg/µl, 1.5 µg/µl and 2.0 µg/µl), um eine Standardkurve zu bestimmen. Auch die zu detektierenden Proben wurden doppelt oder dreifach aufgetragen. Von den Proben wurden 5–10 µl zu einem Endvolumen von 20 µl mit Lysepuffer aufgefüllt und aufgetragen. Anschließend wurden pro Well 200 µl des BSA Assay Mix (Reagent A zu

Reagent B Verhältnis 1:50) hinzugegeben und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Absorption wurde bei 562 nm mit PowerWave 200™ microplate scanning Spectrophotometer (Bio-Tek) bestimmt und mit der Software KC4 v3.1 (Bio-Tek) analysiert.

2.2.4 Umgang mit Liquor

Der Liquor wurde durch Lumbalpunktion entnommen und nach Bestimmung der Zellzahl für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, im Kühlschrank bei 4 °C gelagert und innerhalb von 2–4 Tagen bei -80 °C eingefroren. Das Auftauen erfolgte stets auf Eis.

2.2.5 Western Blot

2.2.5.1 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Sodium-dodecyl-sulfat polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page) ist eine Methode um Proteine in einem elektrischen Feld abhängig von ihrer Größe aufzutrennen. Hierfür wurden das Gel NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12% gradient gels (Invitrogen) und MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure) Laufpuffer nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Liquor und Zelllysate wurden mit NuPage LDS (Lithium dodecyl sulfate) sample buffer und NuPage reducing agent (500 mM dithiothreitol (DTT) (Invitrogen)) für 10 Minuten bei 70 °C aufgekocht, auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Bei 150 V wurden die Proteine über 90 Minuten aufgetrennt. Als molekularer Größenstandard dienten MagicMark® XP (Invitrogen) und Novex® Sharp (Invitrogen) (Abb. 9).

2.2.5.2 Semidry Westernblot

Zum Nachweis der Proteine wurden diese vom SDS-Page Gel auf eine polyvinylidene fluoride Membran (PVDF-Membran) transformiert. Hierfür wurde die Membran in 100% Methanol einige Sekunden aktiviert und kurz in 1x Transferpuffer gewaschen. Die Membran und das Gel wurden zwischen zwei Filterpapiere auf die Anode des Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Biorad) gelegt. Luftblasen wurden entfernt und die Kathode

aufgelegt. Nun wurden die Proteine bei 25 V für 35 Minuten auf die Membran transformiert.

2.2.5.3 Proteinfärbung

2.2.5.3.1 MemCode™ Reversible Protein Stain Kit – für PVDF Membran

Zu Beginn wurde die PVDF Membran mit destilliertem Wasser gewaschen, mit dem MemCode™ Sensitizer zwei Minuten auf dem Schüttler bei RT inkubiert und der Sensitizer wieder entfernt. Anschließend wurde die Membran für eine Minute mit MemCode™ Stain auf dem Schüttler gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit MemCode™ Destain, weiterem Entfärben mit einer 1:1 Lösung aus Methanol und MemCode™ Destain (5 Minuten) auf dem Schüttler und viermaligem Waschen mit destilliertem Wasser, konnte die Membran mit den gefärbten Proteinbanden betrachtet und beispielsweise eingescannt werden. Mit einer 1:1 Lösung aus Methanol und MemCode™ Eraser werden die Proteinbanden für 10 Minuten auf dem Schüttler wieder entfärbt.

2.2.5.3.2 SYPRO® Ruby Protein Blot Stain

Eine weitere Methode, um Proteine auf einer PVDF Membran sichtbar zu machen, ist die Proteinfärbung mittels SYPRO® Ruby Protein Blot Stain. Im ersten Schritt wurde die Membran 15 Minuten bei RT auf dem Schüttler mit Fixationspuffer inkubiert (7% Essigsäure, 10% Methanol). Anschließend wurde die Membran vier Mal je 5 Minuten mit deionisiertem Wasser gewaschen und für weitere 15 Minuten mit SYPRO Ruby Blot Stain auf dem Schüttler inkubiert. Nach weiteren 2–3 Waschschritten, je eine Minute mit deionisiertem Wasser, konnten die Proteinbanden mittels CCD Kamera und UV Illuminisierung sichtbar gemacht werden.

2.2.5.4 Blocking und Entwickeln

Nach einer Membranfärbung wurde die Membran auf dem Schüttler bei RT eine Stunde in Blocking-Puffer (1x Roti-Block) inkubiert, um freie Bindungsstellen zu sättigen und anschließend mit dem Erstantikörper über Nacht bei 8 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Antikörper entfernt und die Membran 3x 10 Minuten mit dem Waschpuffer PBST (1x PBS + 0.01% tween 20) gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit

einem horseradish peroxidase (HRP) konjugierten Zweitantikörper eine Stunde bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wurde die Membran mit ECL (Elektrochemilumineszenz) Substrat Femtoglow beschichtet und anschließend mit der CCD Kamera Intelligent DarkBox LAS-1000 (FujiFilm) entwickelt.

2.2.6 ProteoSeek™ Albumin/IgG Removal Kit (Thermo)

Um die häufigsten Proteine im Liquor, Albumin und Immunglobulin G (IgG), zu eliminieren und somit beim Western Blot die starken IgG-Banden zu entfernen, wurde das ProteoSeek™ Albumin/IgG Removal Kit (Thermo) angewandt.

Pro Probe wurde eine Zentrifugensäule (Spin Column) in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit je 170 µl homogenisiertem Immobilized Cibacron Blue/Protein A Gel aktiviert. Die Säule wurde nun mit dem Reaktionsgefäß eine Minute bei 10 000 x g zentrifugiert. Die Säule enthielt nun ein Gelbett, weshalb sie nun von unten durch ein Pfropf verschlossen wurde. Die Liquor-Proben wurden anschließend mit Waschpuffer auf 75 µl verdünnt und auf die Säulen gegeben, diese wurden verschlossen und kurz geschüttelt. Anschließend wurden die Säulen 10 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubiert und der Pfropf und der Deckel wieder entfernt. Die Säulen wurden nun in neue Reaktionsgefäße gestellt und wieder eine Minute bei 10 000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Filtrat erneut über die Säulen gegeben und nochmals 10 Minuten inkubiert und zentrifugiert. Auf die Säule wurde nun 75 µl Waschpuffer gegeben und mit dem gleichen Reaktionsgefäß nochmals zentrifugiert. Das Filtrat enthielt nun die Probe ohne Albumin und IgG.

2.2.7 Acetonpräzipitation

Um die Konzentration der Proteine im Liquor zu erhöhen, wurden 400 µl -20 °C kalten Acetons mit 100 µl Liquor gemischt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Morgen wurden die Proben bei 0 °C für 10 Minuten auf 15 000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet zwei Mal mit einer Aceton/Wasser Lösung (4:1) gewaschen. Zentrifugiert wurde bei jedem Waschschritt bei 15 000 x g bei 0 °C für 10 Minuten. Nach 30 Minuten Lufttrocknen bei RT und offenem Deckel wurde das Pellet wieder in entsprechendem Puffer gelöst (hier wurden verschiedene Puffer getestet, siehe

Tab. 4 und 3.1.3.6) (Protokoll angelehnt an das Pierce Protokoll von Thermo Scientific „Acetone precipitation of proteins“ (TR0049.1). Um eine bessere Fällung zu erzielen, wurden die Proteine des Liquors nicht nur eine Stunde, wie im Protokoll, sondern über Nacht gefällt).

2.2.8 Immunpräzipitation

2.2.8.1 Immunpräzipitation ohne pre-clearing

Um die Konzentration von Picalm im Liquor zu steigern, wurde eine Immunpräzipitation in Anlehnung an das Protokoll von Miltenyi eingesetzt (µMACS™ Protein A/G MicroBeads MultiMACS™ Protein A/G Kit). Als Positivkontrolle dienten Zelllysate, welche ebenfalls immunpräzipitiert wurden. Bei der Zelllyse wurden anstatt BEX als Lysepuffer der von Miltenyi empfohlene TritonR X-100 Lysis buffer verwendet. Für die Immunpräzipitation wurden zwei unterschiedliche Methoden getestet:

Z. Das Zelllysat (Z) (1 ml) wurde nach Protokoll mit dem Anti-Picalm Antikörper (10 µl) eine Stunde im Kühlraum inkubiert, anschließend die Protein G Beads (50 µl) hinzugegeben und eine weitere Stunde im Kühlraum inkubiert.

B. Im zweiten Versuch wurden zuerst die Protein G Beads (B) (50 µl) mit dem Anti-Picalm Antikörper (10 µl) eine Stunde im Kühlraum inkubiert um anschließend das Zelllysat (1 ml) bzw. den Liquor (1 ml) hinzuzugeben (über Nacht im Kühlraum). Das Ziel dieser Methode war, die Beads mit Anti-Picalm zu sättigen, damit das IgG des Liquors nicht an die Beads binden kann, bzw. der Anteil der gebundenen IgGs an die Beads geringer ist.

Die Fällung erfolgte bei beiden Methoden gleich: Die Säulen wurden an den Magnet Separator angebracht und mit 200 µl Lysepuffer aktiviert. Das vorbereitete Bead-Antikörper-Zelllysat/Liquor Gemisch wurde nun auf die Säulen gegeben, wobei das magnetisch markierte Picalm nun zurückgehalten wurde und alle weiteren Proteine, Zellbestandteile und Puffer die Säule passieren können. Anschließend wurden die Säulen vier Mal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Das Eluieren des Picalms erfolgte mit LDS Sample Buffer (1x) und DTT (1x). Dieser Elutionspuffer wurde zuvor auf 95 °C erhitzt. Zuerst wurden 20 µl des Elutionspuffers auf die Säulen gegeben, 5 Minuten inkubiert, der

auftretende Tropfen entfernt und erneut 50 µl des Elutionspuffers aufgetragen. Der Durchfluss enthielt das gewünschte Protein. Das Eluat konnte nun direkt auf ein BisTris Gel aufgetragen werden, ohne weiter aufgekocht zu werden.

2.2.8.2 Pre-clearing des Liquors

Um die Immunglobuline des Liquors vor der Immunpräzipitation zu entfernen und um somit deren Bindung an die Protein G Beads während der Immunpräzipitation zu vermeiden, wurde ein Pre-clearing versucht. Hierfür wurden drei Ansätze 50 µl, 100 µl und 150 µl Protein G Beads mit je 1 ml Liquor eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Säulen wurden mit 200 µl Lysepuffer aktiviert und anschließend wurde das Liquor-Bead Gemisch auf die Säulen gegeben. Der Durchfluss sollte nun aus dem Liquor, der frei war von Protein G Beads bindenden Proteinen, bestehen. Dieser Durchfluss wurde mit LDS und DTT aufgekocht (70 °C, 10 Minuten) und auf ein Gel aufgetragen.

2.2.9 Multiplex Assay zur Zyto- und Chemokinbestimmung

Zur Bestimmung der vier Zyto- und Chemokine (IL-8, IL-6, IL-1β und TNFα) im Liquor und im Serum wurde ein Multispot Assay (MSD 96-well MULTI-SPOT Human ProInflammatory II 4-Plex Assay: Ultra-Sensitive Kit, Meso Scale Discovery) nach Instruktionen des Herstellers angewandt. Der Assay nutzt Elektrochemilumineszenz zur Detektion mehrerer Proteine mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Hierfür sind spezifische Antikörper gegen die gewünschten Proteine in jedem der 96 Wells angebracht (Capture-Antibody, Abb. 10). Der Detektionsantikörper ist mit einer spezifischen Markierung versehen, die durch elektrochemische Stimulation Licht ausstrahlt (Labeled-Antibody, Abb. 10). Auf Rat der Scientific Support Group von Meso Scale Discovery wurde für Messungen von Liquor, anstatt der Lösung 2 (Diluent 2) des Kits, eine Lösung aus 1% BSA in 1x PBS verwendet, um eine Standardkurve zu erhalten, welche dem Proteingehalt vom Liquor näher kommt. Das Diluent 2 gleicht dem Proteingehalt im Serum/Plasma und wurde auch für die Proteinbestimmung im Serum verwendet. Um die Standardkurve vorzubereiten, wurde der 100x Calibrator stock in Diluent 2 (Serum) bzw. in der Lösung aus 1% BSA in 1x PBS (Liquor) zu einer 8-Punkt Standardkurve verdünnt.

Als erster Schritt wurden 25 µl Diluent 2 bzw. 1% BSA in 1x PBS pro Well pipettiert und bei RT für 30 Minuten auf dem Schüttler (300–1000 rpm) inkubiert. Nun wurden pro Well 25 µl Calibrator oder Probe in einer Doppelbestimmung aufgetragen und für 2 Stunden bei RT auf dem Schüttler (300–1000 rpm) inkubiert (Analyte, Abb. 10). Anschließend wurde drei Mal mit PBST gewaschen, 25 µl pro Well des Detection Antibody (75 µl Antibody Blend und 3675 µl Diluent 3) aufgetragen und erneut 2 Stunden inkubiert (Labeled-Antibody, Abb. 10). Nach weiteren 3 Waschschritten mit PBST konnten 150 µl pro Well 2x Read Buffer T (4x Read Buffer T zuvor auf 2x mit destilliertem Wasser verdünnt) aufgetragen werden und die Platte konnte mit dem SECTOR Imager 2400 analysiert werden.

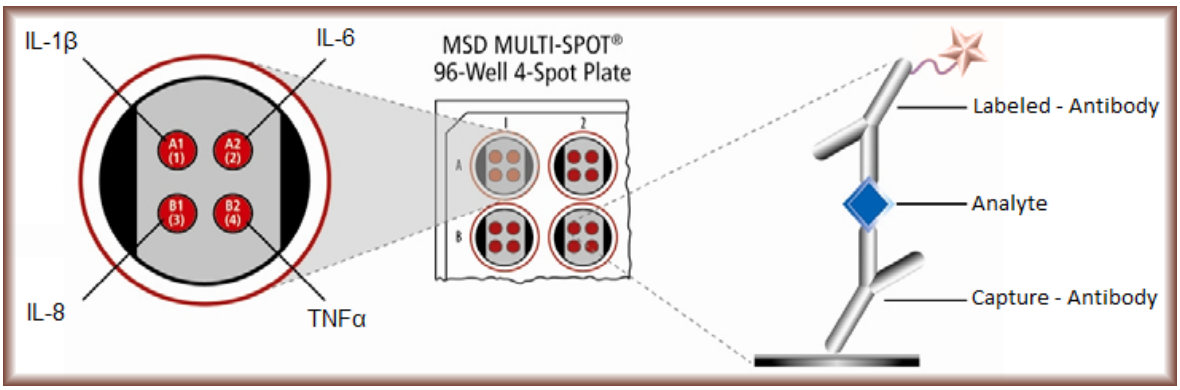

Abb. 10 MSD (Meso Scale Discovery) 96-well MULTI-SPOT Human ProInflammatory II 4-Plex Assay. *Gezeigt ist ein Ausschnitt der 96-Well Platte (mitte), die Anordnung der vier Zyto- und Chemokine (Interleukin-1ß (IL-1ß), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNFα)) in einem Well (links) und eine schematische Darstellung des Assays (rechts) (Meso Scale Discovery 2010).*

2.2.10 Festphasen-Enzymimmunoassay: Tau und Aβ

Um die Proteine Tau und Aβ im Liquor zu bestimmen, wurden die Enzymimmunoassay Kits von INNOGENETICS eingesetzt und nach Instruktionen des Herstellers angewandt.

Sowohl bei dem INNOTEST® hTAU Ag, als auch bei INNOTEST® ß-AMYLOID(1-42), handelt es sich um einen Festphasen-Enzymimmunoassay, bei denen das humane Tau-Protein bzw. das Amyloidpeptid oder Fragmente derselben von den ersten monoklonalen Antikörpern, AT120 (Tau) (Abb. 11) bzw. 21F12 (Aβ) (Abb. 12), erfasst werden. Humane Liquor-Proben werden hinzugefügt und mit zwei biotinylierten Antikörpern, HT7bio und BT2bio (Abb. 11), bei der Tau-Messung, sowie mit dem biotinylierten Antikörper 3D6bio (Abb. 12) bei der Aβ-Messung inkubiert. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wird anschließend durch ein peroxidasemarkiertes (HRP) Streptavidin (SV, Abb. 11 und Abb. 12) nachgewiesen. Nach Zugabe einer Substratarbeitslösung verfärben sich die Proben. Die Farbintensität ist ein Maß für die Menge an humanem Gesamt-Tau-Protein bzw. humanem Gesamt-ß-Amyloid(1-42)-Protein in der Probe.

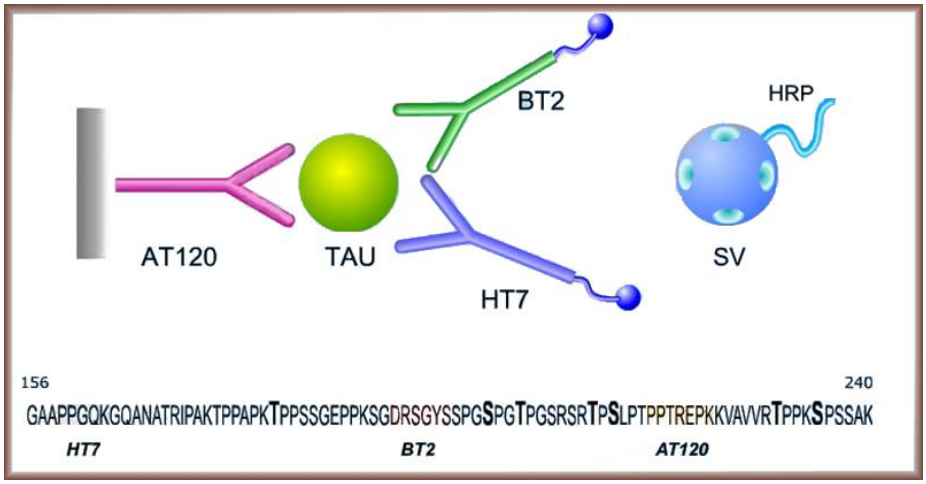

***Abb. 11 Enzymimmunoassay Tau**. Platte mit fixiertem monoklonalen Antikörper (AT120) (links), Tau des Liquors (mitte) und den biotinylierten Antikörpern (BT2 und HT7) (mitte-rechts). Der Nachweis der Menge an Tau erfolgt mit peroxidasemarkiertem (HRP) Streptavidin (SV) (rechts) (modifiziert nach Innogenetics 2010).*

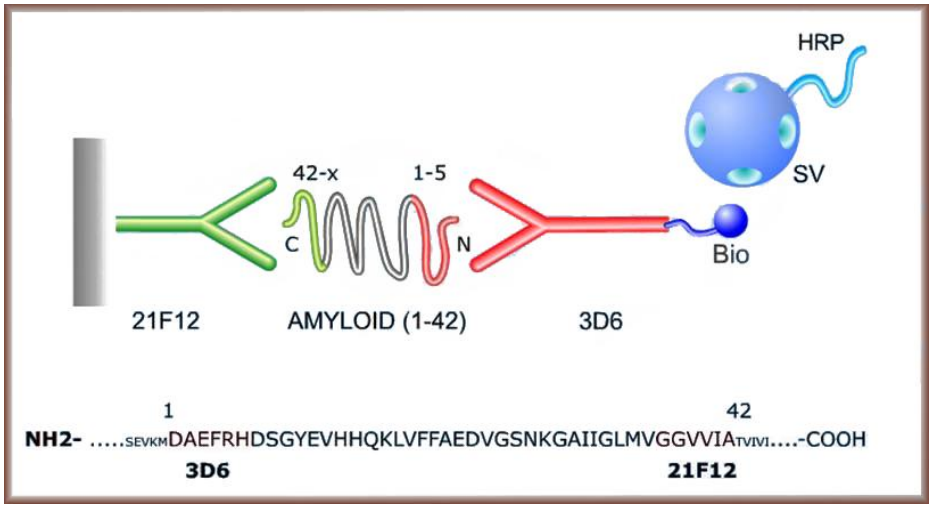

Abb. 12 Enzymimmunoassay Amyloid ß. *Platte mit fixiertem monoklonalen Antikörper (21F12) (links), Amyloid ß (Aß) des Liquors (mitte) und dem biotinylierten Antikörper (3D6) (mitte-rechts). Der Nachweis der Menge an Aß erfolgt mit peroxidasemarkiertem (HRP) Streptavidin (SV) (rechts) (modifiziert nach Innogenetics 2010).*

3 Ergebnisse

3.1 Picalm

3.1.1 Picalm in humanem Hirnlysat

Picalm wurde im Hirnlysat (Universitätsklinik Bonn) von zwei verschiedenen Personen in zwei unterschiedlichen Hirnregionen (okzipital und zerebellär) detektiert. Drei der vier Isoformen des Picalm lassen sich trotz ihrer ähnlichen Größe in den Hirnproben klar unterscheiden (Lane 1.1–2.2, Abb. 13). Aufgrund der mit Image Quant TL gemessenen Größen, handelt es sich vermutlich um die Isoformen I–III (Tab. 20). HEK293 Zellen dienen hier als Positivkontrolle, da der Anti-Picalm Antikörper an diesen Zellen von Santa Cruz Biotechnology als Positivkontrolle beschrieben wurde. Bei den HEK293 Zellen sind vermutlich nur zwei der kürzeren Isoformen vorhanden (Lane 0, Abb. 13, Tab. 20).

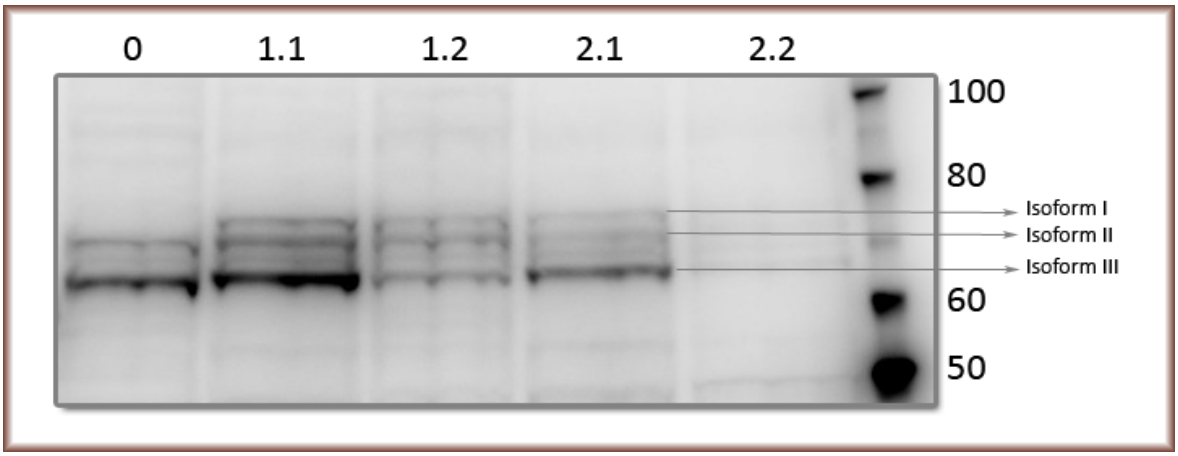

Abb. 13 Western Blot um die Isoformen I-III von Picalm im Hirnlysat darzustellen. *Es wurden okzipitale und zerebelläre Hirnlysate bei zwei verschiedenen Personen untersucht. In beiden Hirnregionen und bei beiden Patienten lässt sich Picalm nachweisen. Hirnlysat-Proben entstammen der Universitätsklinik Bonn. HEK293 Zellen (0) dienen als Positivkontrolle. Hirnlysat Person 1: okzipital (1.1) und zerebellär (1.2). Hirnlysat Person 2: okzipital (2.1) und zerebellär (2.2). (1. Antikörper: Anti-Picalm, 2. Antikörper: Anti-Goat)*

Tab. 20 Molekulare Masse der Picalm-Signale aus Abb. 13.

	HEK293-Zelllysat (0)	Hirnlysat (1.1–2.2)
Molekulare Masse [kDa]	ca. 62 kDa ca. 68 kDa	ca. 62 kDa ca. 68 kDa ca. 72 kDa

3.1.2 Picalm in verschiedenen Hirnzellen

Um nachzuweisen, welche Gehirn-spezifischen Zellen das Protein Picalm exprimieren, wurden sowohl Neurone, Astrozyten, Mikroglia und Neuroblastomzellen (Neuro-2A) der Maus, als auch humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) untersucht. Hierbei wurden pro Lane 30 µg Protein der Zelllysate aufgetragen. Da bei der Maus sechs verschiedene Isoformen mit ähnlicher molekularer Masse beschrieben sind, kann nicht exakt definiert werden, welche murinen Isoformen in den Neuro-2A Zellen nachweisbar sind (siehe 4.1.2). Murine Neurone scheinen eine größere Picalm-Isoform (ca. 74 kDa) zu exprimieren als die größten Isoformen der anderen murinen Hirnzellen (70–72 kDa, Tab. 21). Es konnte somit gezeigt werden, dass Picalm in allen untersuchten Hirnzellen der Maus und auch in humanen Neuroblastomzellen nachweisbar ist (Abb. 14, Tab. 21).

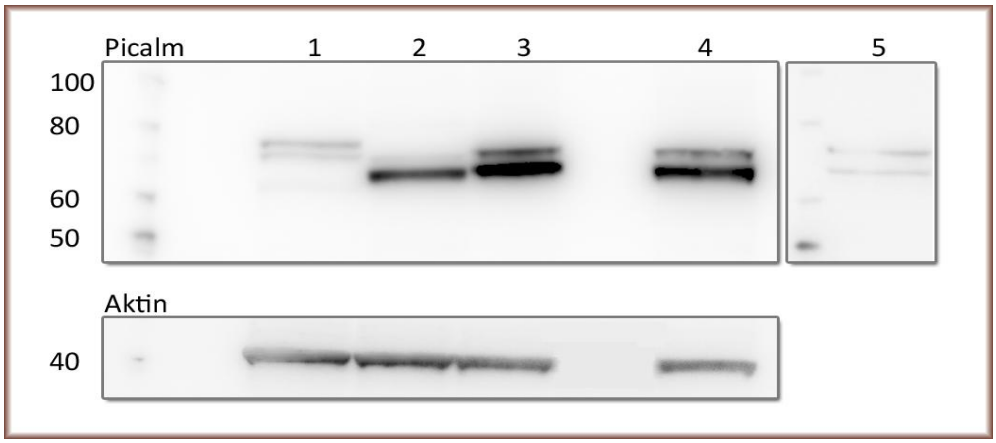

Abb. 14 Western Blot um Picalm in verschiedenen Gehirnspezifischen primären Zellen und Zelllinien darzustellen. *Picalm lässt sich in allen untersuchten Zellen nachweisen: Neuron (1), Astrozyt (2), Mikroglia (3), Neuro-2A (4), SH-SY5Y (5). Der Nachweis von Aktin soll zeigen, dass annähernd gleiche Proteinmengen auf das Gel (NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12% gradient gel, Invitrogen) aufgetragen wurden.*
Picalm (oben): 1. Antikörper: Anti-Picalm 2. Antikörper: Anti-Goat
Aktin (unten): 1. Antikörper: Anti-Aktin 2. Antikörper: Anti-Mouse

Tab. 21 Molekulare Masse der Picalm-Signale aus Abb. 14

	Neuron (1) (Maus)	Astrozyt (2) (Maus)	Mikroglia (3) (Maus)	Neuroblas-tomzellen (4) (Maus)	Neuroblas-tomzellen (5) (Human)
Masse [kDa]	ca. 74 kDa ca. 70 kDa ca. 61 kDa	ca. 70 kDa ca. 65 kDa	ca. 72 kDa ca. 67 kDa	ca. 72 kDa ca. 65 kDa	ca. 72 kDa ca. 68 kDa

3.1.3 Liquoruntersuchung nach Picalm mittels Western Blot

3.1.3.1 Western Blot nach Protokoll (beschrieben in 2.2.5)

Bei den ersten Liquoruntersuchungen nach Picalm, wurde das Protokoll des Western Blot unverändert durchgeführt (beschrieben in 2.2.5). Hierfür wurden 30 µl Liquor pro Lane verwendet. Die Liquor-Proben stammen von Patienten mit AD, von Patienten mit Depressionen und von Kontrollpatienten. Mit diesen Proben sollen einerseits Unterschiede der Picalmkonzentrationen zwischen gesunden und an AD erkrankten Personen festgestellt werden, andererseits wurden Proben von Depressionspatienten verwendet, um AD mit einer anderen neurologischen Erkrankung zu vergleichen. Die Liquor-Proben wurden auf Eis aufgetaut und ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt (beschrieben in 2.2.5). Der Erstantikörper Anti-Picalm (Santa Cruz Biotechnology, polyklonal, goat) wurde in einer Konzentration von 1:1000 in PBS (Phosphate buffered saline) und der Zweitantikörper Anti-Goat 1:10000 in PBS gelöst eingesetzt.

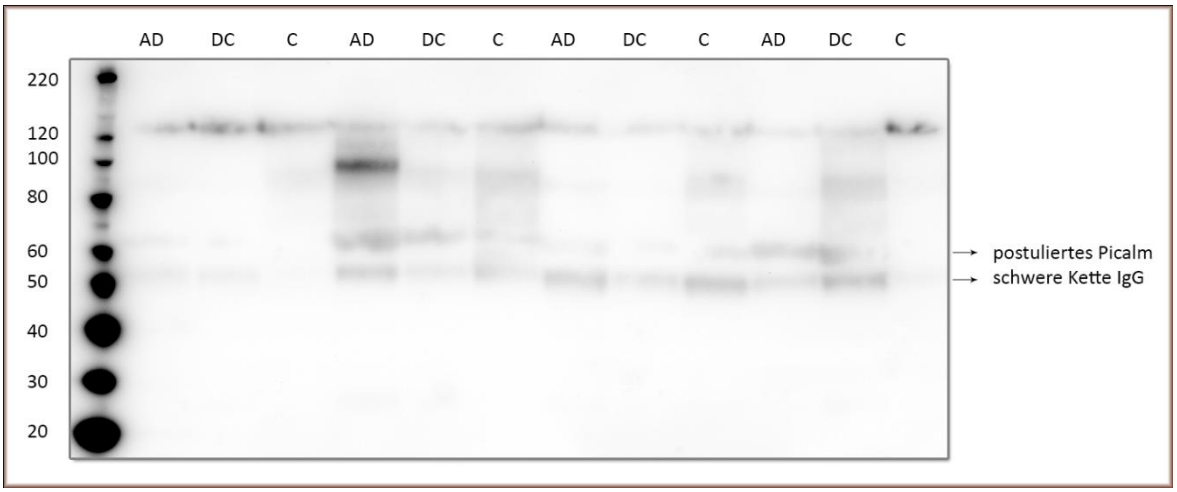

Abb. 15 Western Blot um Picalm im Liquor darzustellen. *Ein schwaches Picalm-Signal lässt sich zwischen 60 und 72 kDa erkennen. Liquor-Proben wurden nicht vorbehandelt und entstammen der neurologischen Universitätsklinik Ulm (2001–2010). Alzheimer-Demenz (AD), Krankheitskontrolle: Depression (DC), Kontrollen (C), Immunglobulin G (IgG). (1. Antikörper: Anti-Picalm 1:1000, 2. Antikörper: Anti-Goat 1:10000)*

Die drei Isoformen von Picalm liegen bei 62, 68 und 72 kDa. Da eine Bande zwischen 60 und 72 kDa erkennbar ist (Abb. 15), wurden im weiteren Versuch (3.1.3.2) höhere Konzentrationen der Erst- und Zweitantikörper getestet, mit dem Ziel dieses schwache Signal deutlicher darzustellen und ausmessen zu können. Ob es sich um Picalm handelt ist

fraglich, da diese schwache Bande zwischen 60 und 72 kDa bisher noch sehr undeutlich, fleckig und nicht in allen Liquor-Proben sichtbar ist.

Zusätzlich sind noch weitere Proteinbanden bei ca. 50, 100 und 120 kDa erkennbar. Diese könnten durch den Zweitantikörper erkannte Immunglobuline des Liquors sein.

3.1.3.2 Validierung veränderter Antikörperkonzentrationen für eine bessere Detektion des Picalm Proteins im Liquor

Bei höheren Antikörper-Konzentrationen (Anti-Picalm in PBS 1:500, Anti-Goat in PBS 1:5000), aber sonst gleichem Versuchsaufbau, verstärkte sich besonders die Proteinbande bei 50 kDa, welche vermutlich eine schwere Kette des Immunglobulin G (IgG) aus dem Liquor darstellt, die wahrscheinlich vom Zweitantikörper erkannt wird. Diese IgG-Bande weist nun ein so starkes Signal auf, dass eventuell andere Banden nun überstrahlt werden (Abb. 16). Die erneut sichtbare schwache Bande bei ca. 62 kDa könnte einerseits, wie bei den HEK293 Zellen die Isoform III sein, andererseits vielleicht auch die Isoform IV, welche aufgrund weniger Aminosäuren eine kleinere molekulare Masse aufweisen müsste (siehe 1.3). Bisher existieren keine Publikationen über Picalm im Liquor, weshalb nicht bekannt ist, welche Isoformen im Liquor vorkommen. Die bereits beschriebenen Proteinbanden bei ca. 100 und 120 kDa aus Versuch 3.1.3.1 sind erneut sichtbar.

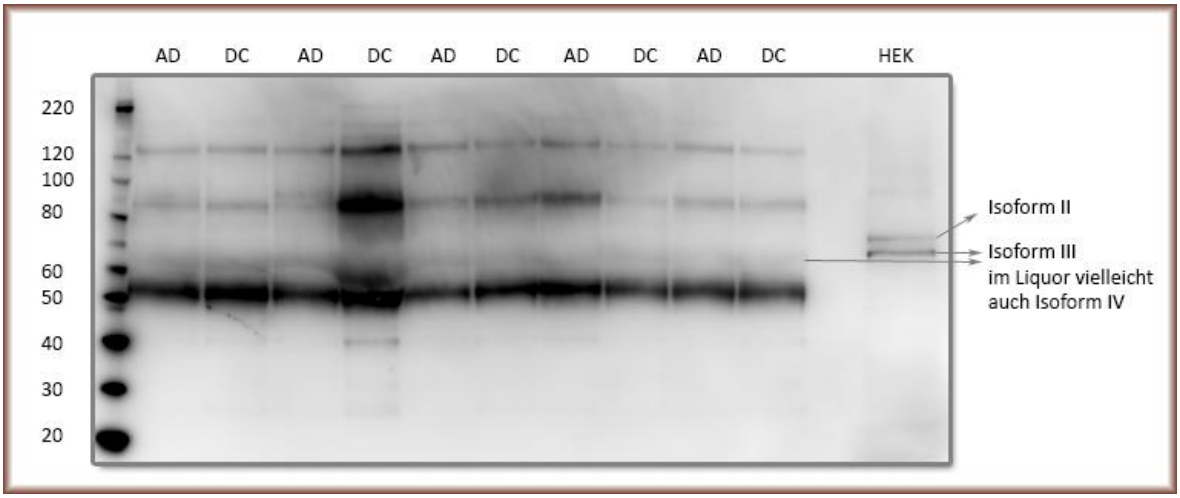

Abb. 16 Western Blot mit höheren Antikörperkonzentrationen, um Picalm im Liquor darzustellen. *Um ein stärkeres Picalm-Signal zu erhalten, wurden im Vergleich zum ersten Versuch höhere Antikörperkonzentrationen eingesetzt (siehe 3.1.3.1). Die HEK293 Zellen (HEK) dienen als Positivkontrolle. Liquor-Proben entstammen der neurologischen Universitätsklinik Ulm (2001–2010). Alzheimer-Demenz (AD), Krankheitskontrolle: Depression (DC). (1. Antikörper: Anti-Picalm 1:500, 2. Antikörper: Anti-Goat 1:5000)*

3.1.3.3 Albumin/IgG Entfernung aus dem Liquor

Um die starke Bande der schweren Kette von IgG (50 kDa), die eventuell andere Proteinbanden überlagern könnte, zu entfernen, wurde der Versuch unternommen, mit dem Albumin/IgG Removal Kit (Thermo) Liquor zu filtern und dadurch diese Bande der schweren Kette von IgG zu eliminieren. Die Entfernung von Albumin hat in dem Versuch keine Relevanz. Beim Entfernen von IgG und Albumin aus Liquor wurden vermutlich auch weitere Proteine entfernt, sodass in den Lanes „Liquor Albumin/IgG entfernt“ keine Proteinbanden mehr sichtbar sind (Abb. 17). Dies bedeutet, dass das Removal Kit funktioniert hat, die Bande der schweren Kette von IgG wurde eliminiert, aber falls Picalm im Liquor vorhanden sein sollte, dieses möglicherweise auch mit entfernt wurde.

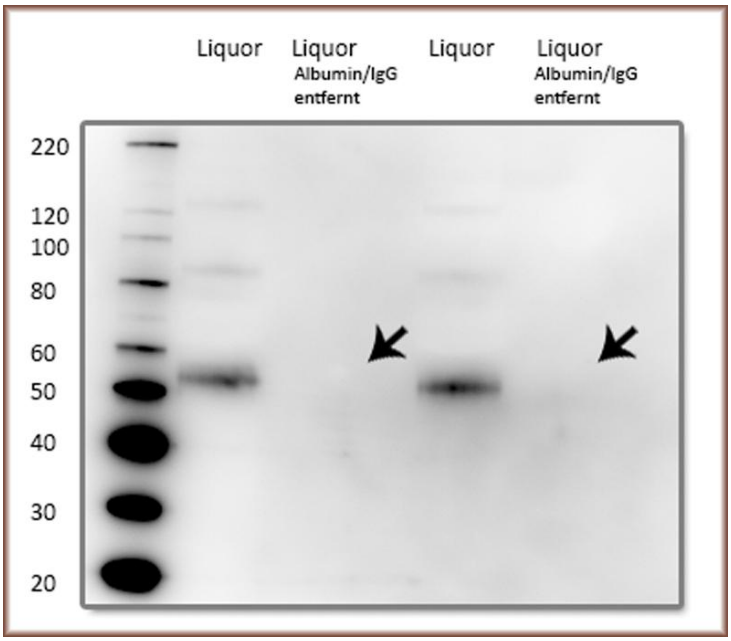

Abb. 17 Western Blot mit gefiltertem Liquor, um Picalm im Liquor darzustellen. *Liquor wurde mit dem Albumin/IgG Removal Kit filtriert, somit wurde die schwere Kette von Immunglobulin G (IgG) entfernt (Pfeil). Ein Picalm-Signal ist dennoch nicht erkennbar. Zum Vergleich dient derselbe, aber unbehandelter Liquor. Der Liquor entstammt der neurologischen Universitätsklinik Ulm (2001–2010).*
(1. Antikörper: Anti-Picalm, 2. Antikörper: Anti-Goat)

3.1.3.4 Acetonpräzipitation und Albumin/IgG Entfernung

Einerseits könnte Picalm durch das Filtern entfernt worden sein, andererseits könnte aber auch die Konzentration von Picalm zu gering sein, um Picalm detektieren zu können. Um die Konzentrationen der Proteine im Liquor zu erhöhen, wurde eine Acetonpräzipitation (AP) mit einer Menge von 100 µl Liquor durchgeführt (siehe 2.2.7). Durch die AP können Proteine aus 100 µl konzentriert und für den Western Blot verwendet werden, anstatt den 30 µl bei den vorherigen Versuchen. Das Ergebnis einer AP ist ein Proteinpellet, welches in Brain Extraction Buffer (BEX) gelöst und mit LDS (NuPage LDS Sample Buffer) und Dithiothreitol (DTT, NuPage Reducing Agent) aufgekocht wird, um inter- und intramolekulare Bindungen der Proteine zu spalten und diese für einen Western Blot vorzubereiten. Anschließend wird ein Western Blot wie in 3.1.3.3 durchgeführt. Doch auch nach Anwendung der Acetonpräzipitation und anschließend des Albumin/IgG Removal Kits war keine Detektion des Picalm mit Hilfe des Antikörpers sichtbar (Daten nicht gezeigt), weshalb im nächsten Versuch das Albumin/IgG Removal Kit nicht mehr eingesetzt wurde.

3.1.3.5 Acetonpräzipitation und Einsetzen des Clean-Blot IP Detection Reagent

Picalm konnte bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht klar dargestellt werden. Eine Möglichkeit wäre, dass das Protein in nur sehr geringen Konzentrationen vorhanden ist. Um dieses Problem zu lösen und die Proteinmenge des Liquors für den Western Blot zu erhöhen, wurde erneut die Acetonpräzipitation angewandt. Um das weitere Problem, das starke Signal der schweren Kette des IgG (siehe 3.1.3.2) zu unterbinden, wurde der Clean-Blot IP Detection Reagent (Thermo), ein Zweitantikörper, der die schwere Kette von IgG nicht erkennt, eingesetzt. Die Acetonpräzipitation wurde erneut mit 100 µl Liquor nach Protokoll (siehe 2.2.7) durchgeführt. Das Pellet wurde wieder in 30 µl BEX gelöst und für den Western Blot nach Protokoll mit LDS und DTT aufgekocht (siehe 2.2.5), ohne eine Albumin/IgG Entfernung durchgeführt zu haben. Bereits bei der Proteinfärbung der Membran zeigen sich keine klar abgrenzbaren Proteinbanden. Die Proteinbande bei ca. 55–60 kDa zeigt eine verwaschene Form, was auf ein schlechtes Laufverhalten der Proteine hindeuten könnte. Auch in der Positivkontrolle den HEK293 Zellen zeigen sich

nur sehr schwache Proteinbanden, was ebenfalls darauf hinweisen könnte, dass die Proteine sich nach der AP nicht richtig gelöst haben und daher nur schlecht durch das Gel (NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12% gradient gel, Invitrogen) wandern konnten (Abb. 18).

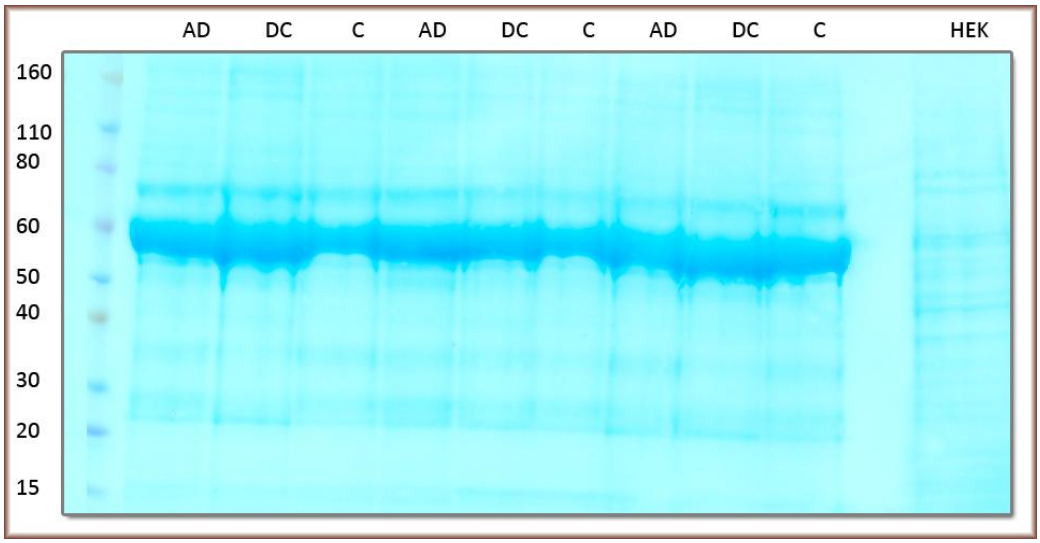

Abb. 18 Proteinfärbung der Membran (MemCode™, Thermo) mit aceton-präzipitierten Liquor-Proben, *um das Laufverhalten der Proteine durch das Gel (NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12% gradient gel, Invitrogen) beschreiben zu können. Die Proteine zeigen verschwommene Banden, was auf ein schlechtes Laufmuster schließen lässt. Zum Vergleich dienen HEK293 Zellen (HEK), welche ebenfalls acetonpräzipitiert und in den gleichen Puffern wie Liquor (siehe Text) gelöst wurden. Liquor-Proben entstammen der neurologischen Universitätsklinik Ulm (2001–2010).*
Alzheimer-Demenz (AD), Krankheitskontrolle: Depression (DC), Kontrollen (C).

Nach Inkubation mit dem Erstantikörper Anti-Picalm wurde nun als Zweitantikörper der Clean-Blot IP Detection Reagent (HRP) (Thermo) eingesetzt, der die schwere IgG Kette (bei ca. 50 kDa) aus dem Liquor nicht erkennen sollte, da der Clean-Blot IP Detection Reagent kein denaturiertes IgG, sondern nur native Antikörper erkennt. Da bei normaler Belichtungszeit überhaupt keine Banden sichtbar waren, wurde eine sehr lange Belichtungszeit gewählt, wobei sich folgendes Bild zeigte (Abb. 19):

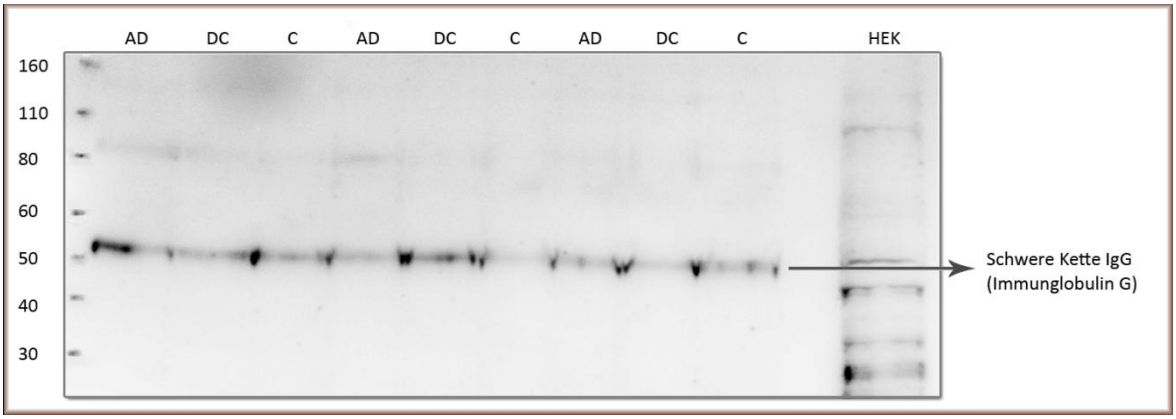

Abb. 19 Western Blot mit acetonpräzipitierten Liquor-Proben, um Picalm im Liquor darzustellen. *Als Positivkontolle dienen HEK293 Zellen (HEK), welche in diesem Versuch kein deutliches Picalm-Signal zeigen (siehe 3.1.3.6.2). Im Liquor zeigt sich eine fleckige Proteinbande bei ca. 50 kDa, vermutlich eine schwere Kette von Immunglobulin G (Pfeil), aber kein Picalm-Signal. Liquor-Proben entstammen der neurologischen Universitätsklinik Ulm (2001–2010). Alzheimer-Demenz (AD), Krankheitskontrolle: Depression (DC), Kontrolle (C).*
(1. Antikörper: Anti-Picalm 1:500, 2. Antikörper: Clean-Blot IP Detection Reagent 1:1000)

Obwohl der Clean-Blot IP Detection Reagent die schwere Bande von IgG nicht mehr erkennen sollte, zeigt sich nach langer Belichtungszeit eine fleckige Bande bei etwa 50 kDa, vermutlich eine schwere Kette des Immunglobulins G (IgG) aus dem Liquor.
Dieser Versuch wurde drei Mal wiederholt, jedoch immer mit dem gleichen Ergebnis. Der wahrscheinlichste Erklärungsversuch ist, dass sich nach der Acetonpräzipitation (AP) das Pellet, also die Proteine, nicht vollständig lösen und es dadurch zu fleckigen Banden kommt. Zusätzlich erkennt der native Antikörper wohl dennoch sehr gering diese schwere Kette von IgG. Um die Proteine bei der AP besser lösen zu können, wurden anstatt des Puffers BEX verschiedene andere Puffer (siehe 3.1.3.6) getestet.

3.1.3.6 Acetonpräzipitation: Lösung des Pellets in verschiedenen Puffern

3.1.3.6.1 Pufferversuch 1

Beim ersten Pufferversuch wurde die Acetonpräzipitation mit 9 Liquor-Proben je 100 µl Liquor des gleichen Patienten durchgeführt und anschließend das Pellet in acht verschiedenen Puffern (Tab. 22) gelöst und ohne weitere Lösungsmittel aufgekocht. Als

Vergleich dient die Probe 9 welche, wie im Versuch zuvor (siehe 3.1.3.5) in BEX gelöst und mit LDS und DTT aufgekocht wurde (Abb. 20, Abb. 21).

***Tab. 22 Verwendete Puffer im Pufferversuch 1**. 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES), Natriumdodecylsulfat (SDS), Dithiothreitol (DTT), Brain extraction buffer (BEX), Lithium dodecyl sulfate (LDS).*

Lane	Puffer
1	HEPES buffer
2	Lower Tris buffer (pH 8,8) - 0,4% w/v SDS
3	Lower Tris buffer (pH 8,8) - 4% w/v SDS
4	Upper Tris buffer (pH 6,8) - 0,4% w/v SDS
5	Upper Tris buffer (pH 6,8) - 4% w/v SDS
6	Lower Tris buffer (pH 8,8) mit Glycerin und 200mM DTT
7	Lower Tris buffer (pH 8,8) mit Glycerin und 400mM DTT
8	Upper Tris buffer (pH 6,8) mit Glycerin und 400mM DTT
9	30µl BEX, 10µl LDS, 4µl DTT

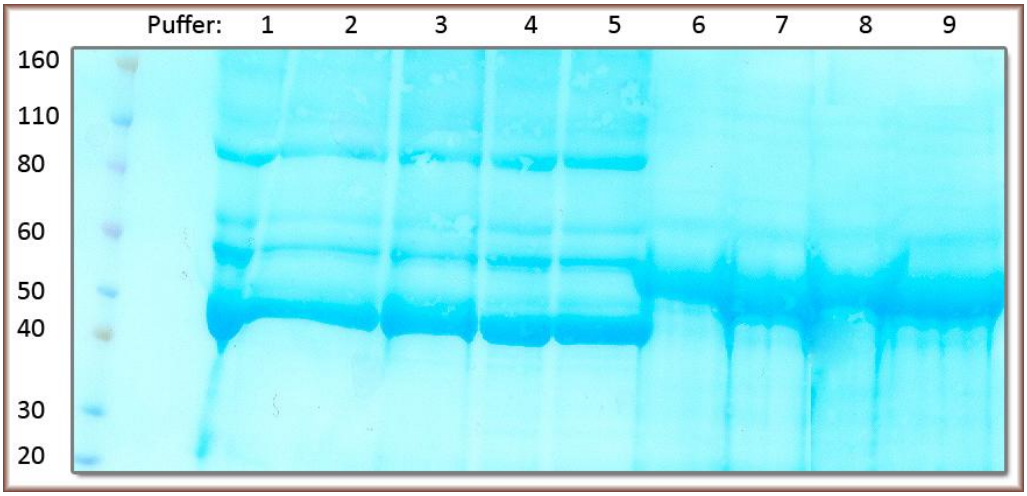

***Abb. 20 Proteinfärbung der Membran (MemCode™, Thermo) mit aceton-präzipitierten Liquor-Proben in verschiedenen Puffern gelöst (1–9, Tab. 22),** um das Laufverhalten der Proteine durch das Gel (NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12% gradient gel, Invitrogen) aufzeigen zu können. Die Puffer 2–5 zeigen schöne, abgrenzbare Proteinbanden, alle weiteren Puffer zeigen ein verschwommenes, schlechtes Laufmuster. Liquor-Proben entstammen der neurologischen Universitätsklinik Ulm (2001–2010).*

Die Antikörper wurden in gleichen Konzentrationen wie im vorherigen Versuch eingesetzt (Erstantikörper: Anti-Picalm 1:500; Zweitantikörper: Clean-Blot IP Detection Reagent 1:1000) (siehe 3.1.3.5).

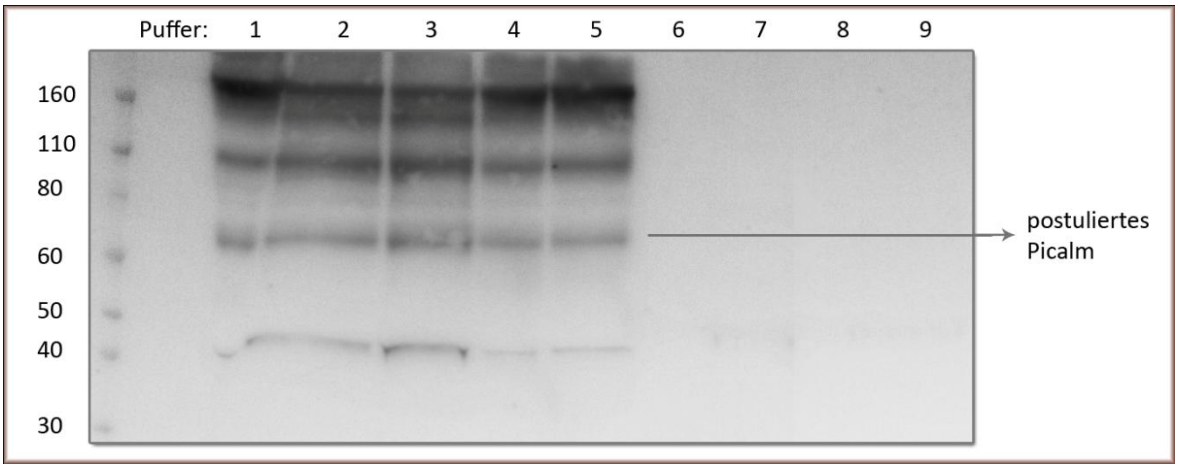

Abb. 21 Western Blot mit acetonpräzipitierten Liquor-Proben in verschiedenen Puffern (1–9, Tab. 22) gelöst, um Picalm im Liquor nachzuweisen. *Ein mögliches Picalm-Signal zeigt sich bei den Puffern 1–5 (Pfeil). Liquor-Proben entstammen der neurologischen Universitätsklinik Ulm (2001–2010).*
(1. Antikörper: Anti-Picalm, 2. Antikörper: Clean-Blot IP Detection Reagent)

Bei den vier Puffern (Puffer 2–5) zeigen sich sowohl bei der Proteinfärbung als auch beim entwickelten Blot klar abgrenzbare Proteinbanden. Neben der Proteinbande des Picalms (72 kDa) sind weitere unspezifische Proteinbanden (bei ca. 160 kDa, 110 kDa und 40 kDa) zu sehen. Die Puffer mit Glycerin und DTT (Puffer 6–8) und auch der Kontrollpuffer mit BEX, LDS und DTT (Puffer 9) zeigen bei der Proteinfärbung verwaschene nicht klar abgrenzbare Proteinbanden, was erneut durch ein schlechtes Laufverhalten der Proteine durch das Gel erklärt werden könnte.

Die längste Isoform von Picalm besitzt eine molekulare Masse von 72 kDa, welche exakt der markierten Bande der ersten vier Puffer entsprechen würde. Da in den Puffern 6–9 kein Signal zu sehen war, wurde eine noch längere Belichtungszeit gewählt und es zeigte sich folgendes Bild:

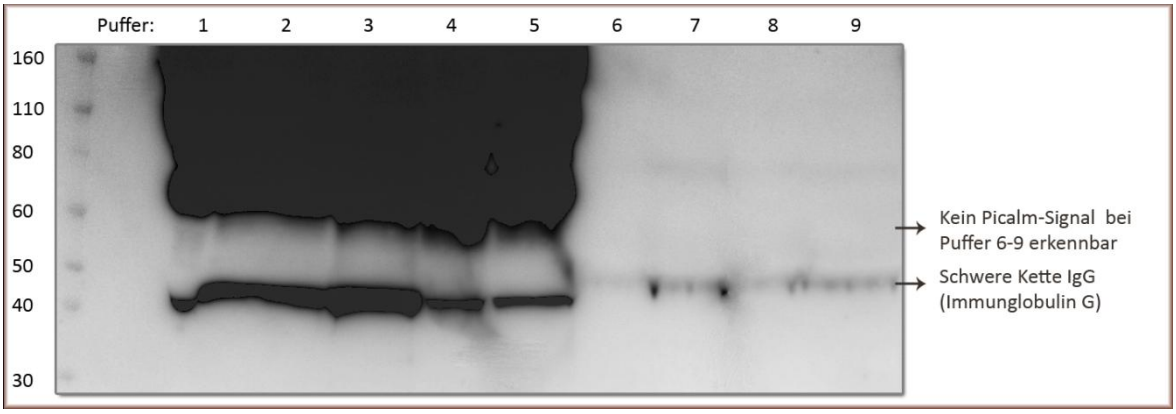

Abb. 22 Western Blot mit acetonpräzipitierten Liquor-Proben in verschiedenen Puffern gelöst (1–9, Tab. 22), um Picalm im Liquor nachzuweisen*. Identischer Western Blot (Abb. 21) bei längerer Belichtungszeit während der Entwicklung mit Intelligent DarkBox LAS-1000, um schwache Signale bei den Puffern 6–9 nicht zu übersehen. Wie im Versuch 3.1.3.5 zeigen sich fleckige Banden bei den Puffern 6–9, vermutlich schwere Ketten von Immunglobulin G. Bei den Puffern 6–9 zeigt sich jedoch kein Picalm-Signal.*
(1. Antikörper: Anti-Picalm, 2. Antikörper: Clean-Blot IP Detection Reagent)

Bei längerer Belichtungszeit traten die fleckigen, inkontinuierlichen Proteinbanden (Puffer 6–9) erneut zum Vorschein (Abb. 22). Da keine Picalm-Bande zu sehen ist, eignen sich diese Puffer nicht für weitere Versuche. Wie bereits erwähnt, zeigen sich bei den Puffern 2–5 definierte Banden entspechend der molekularen Masse von Picalm. In der Abbildung 21 sind zusätzlich weitere Banden (bei ca. 160 kDa, 110 kDa und 40 kDa) erkennbar, weshalb noch weitere Puffer getestet wurden.

3.1.3.6.2 Pufferversuch 2

Im ersten Pufferversuch waren einige unspezifischen Proteinbanden im Liquor (bei ca. 160 kDa, 110 kDa und 40 kDa) vorhanden, die möglicherweise Bindungen von Picalm mit anderen Proteinen sein könnten und dadurch andere molekulare Massen aufweisen würden. Dies würde bedeuten, dass die Proteine nach der Acetonpräzipitation (AP) nicht vollständig gelöst und denaturiert wurden, weshalb im Pufferversuch 2 weitere Puffer (Standard-Zelllysepuffer mit unterschiedlichen pH-Werten) mit und ohne AP (Tab. 23) getestet wurden. Es wurde erneut der gleiche Liquor und das gleiche Verfahren wie im Pufferversuch 1 angewandt, jedoch wurden die Proben nach der Acetonpräzipitation mit dem jeweiligen Puffer eine Stunde auf dem Schüttler bei RT inkubiert, um eine möglichst gute Lösung der Proteine zu ermöglichen. Außerdem zeigte sich in den vergangenen Versuchen die Positivkontrolle, endogene Expression von Picalm in Neuro-2A und HEK293

Zellen, deutlich schlechter (Abb. 19), als in den ersten Versuchen ohne Acetonpräzipitation der Zelllysate (Abb. 16), weshalb auch für Zelllysate unterschiedliche Puffer mit und ohne AP getestet wurden. Die Liquor-Proben und Zelllysate ohne Acetonpräzipitation dienten jeweils zum Vergleich der acetonpräzipitierten Liquor-Proben und Zelllysate.

Tab. 23 Verwendete Puffer im Pufferversuch 2. *Acetonpräzipitation (AP), Lithium dodecyl sulfate (LDS), Dithiothreitol (DTT).*

Lane	Liquor/Zellen	AP/ keine AP (-)	Puffer
1	Liquor	-	Standard-Zelllysepuffer (pH 6,8)
2	Liquor	-	10 µl LDS und 4 µl DTT (siehe 3.1.3.1)
3	Liquor	AP	Puffer 5 (siehe 3.1.3.6.1 Pufferversuch 1)
4	Liquor	AP	Standard-Zelllysepuffer (pH 8,8)
5	Liquor	AP	Standard-Zelllysepuffer (pH 6,8)
6	HEK293	-	10 µl LDS und 4 µl DTT (siehe 3.1.3.1)
7	HEK293	AP	Standard-Zelllysepuffer (pH 8,8)
8	Neuro-2A	-	10 µl LDS und 4 µl DTT (siehe 3.1.3.1)
9	Neuro-2A	AP	10 µl LDS und 4 µl DTT (siehe 3.1.3.1)
10	Neuro-2A	-	Standard-Zelllysepuffer (pH 8,8)
11	Neuro-2A	AP	Standard-Zelllysepuffer (pH 8,8)

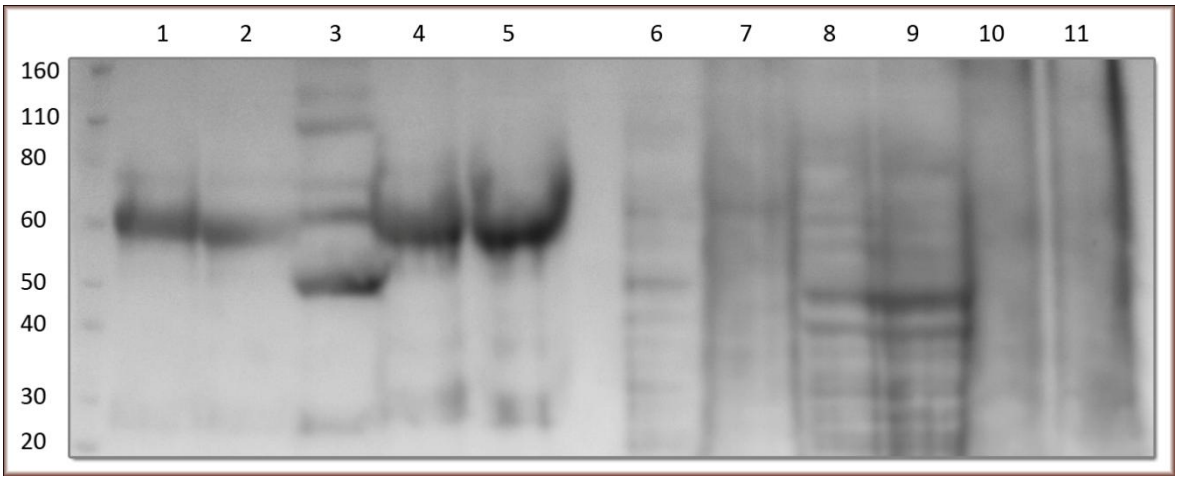

Abb. 23 Proteinfärbung der Membran (SYPRO® Ruby, Invitrogen) mit acetonpräzipitierten und unbehandelten Liquor-Proben (1–5), acetonpräzipitierte und unbehandelte Zelllysate (6–11) in verschiedenen Puffern gelöst (1–11, Tab. 23)*. Die Proteinfärbung wurde durchgeführt, um das Laufverhalten der Proteine durch das Gel (NuPAGE Novex Bis-Tris 4–12% gradient gel, Invitrogen) aufzeigen zu können. Nur Lane 3, 6, 8 und 9 zeigen abgrenzbare Proteinbanden, alle anderen zeigen ein verschwommenes Laufmuster. Liquor-Proben entstammen der neurologischen Universitätsklinik Ulm (2001–2010).*

Wie in der mit SYPRO® Ruby (Invitrogen) gefärbten Membran bereits erkennbar, eignet sich der Standard-Zelllysepuffer nicht für Liquor (Puffer 1, 4 und 5) und auch bei den Zelllysaten (Puffer 7, 10 und 11) lösen sich die Proteine sowohl von HEK293 als auch von Neuro-2A Zellen mit LDS und DTT besser (Abb. 23). Auch beim entwickelten Blot wird dies sichtbar, da sich keine oder nur sehr verwaschene Proteinbanden zeigen (Puffer 1, 4, 5, 7, 10 und 11, Abb. 24).

Zunächst wurde die Membran mit Anti-Picalm und dem Clean-Blot IP Detection Reagent inkubiert, worauf sich nur Proteinbanden im Liquor zeigten (identisch zu Abb. 24), die Zelllysate zeigten überhaupt kein Signal (Abbildung nicht gezeigt). Erst nachdem die Membran gestrippt und mit dem Zweitantikörper Anti-Goat inkubiert wurde, zeigten sich sowohl im Liquor als auch bei den Neuro-2A und HEK293 Zellen klare Picalm-Banden (Lane 6 HEK293: 62 und 68 kDa, Lane 8/9 Neuro-2A: 61 und 66 kDa, Abb. 24).

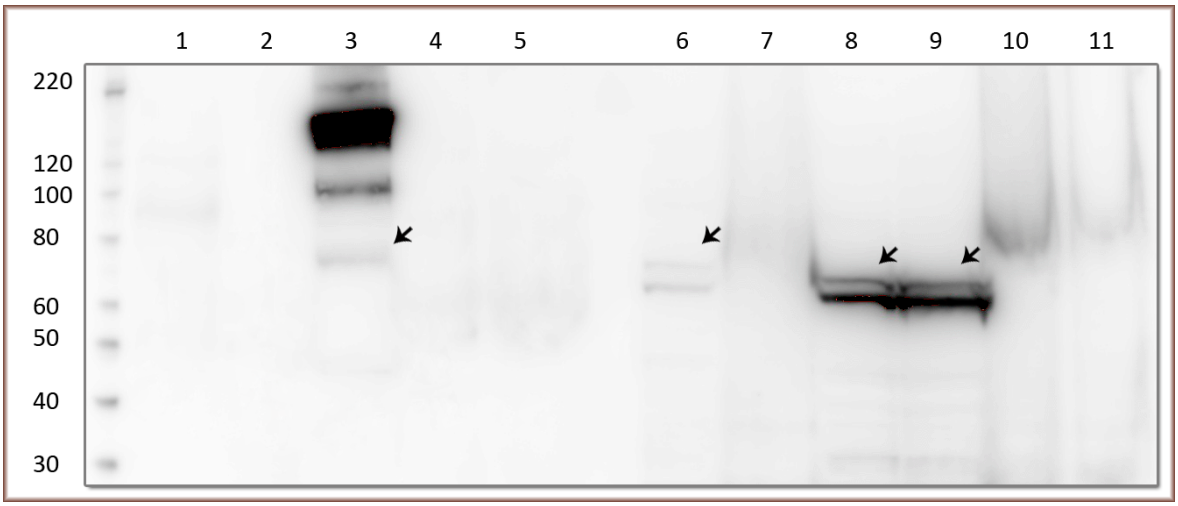

Abb. 24 Western Blot mit acetonpräzipitierten und unbehandelten Liquor-Proben (1–5), acetonpräzipitierte und unbehandelte Zelllysate (6–11) in verschiedenen Puffern gelöst (1–11, Tab. 23), um Picalm im Liquor nachzuweisen. *Mögliche Picalm-Signale sind erneut bei Puffer 5 (Lane 3), nichtacetonpräzipitierte HEK293 Zellen (6) und Neuro-2A Zellen (8, 9) sichtbar (Pfeile). Liquor-Proben entstammen der neurologischen Universitätsklinik Ulm (2001–2010). (1. Antikörper: Anti-Picalm, 2. Antikörper: Anti-Goat)*

Da die Western Blots mit Liquor unabhängig vom Zweitantikörper identisch sind, scheint der Clean-Blot IP Detection Reagent mit Liquor-Proben zu funktionieren, warum der Clean-Blot IP Detection Reagent jedoch kein Signal bei Zelllysaten zeigt, ist noch unklar. Der Anti-Goat Antikörper funktionierte sowohl bei Liquor, als auch bei Zelllysaten, weshalb dieser für weitere Versuche verwendet wurde. Das Ziel des zweiten Pufferversuchs, die unspezifischen Banden im Liquor (bei ca. 160 kDa, 110 kDa und

40 kDa) zu eliminieren, hat nicht zum gewünschten Ergebnis geführt, weshalb der Upper Tris buffer (pH 6,8) des ersten Pufferversuchs (Puffer 5, Tab. 22, Abb. 21) in weiteren Versuchen optimiert wurde.

3.1.3.6.3 Pufferversuch 3

SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein denaturierend wirkendes anionisches Detergenz, das nichtkovalente Bindungen in und zwischen Proteinen spaltet. In zwei weiteren Versuchen wurde nun die SDS-Konzentration des Upper Tris buffer (pH 6,8 – 4% w/v SDS) (Puffer 5, Tab. 22, Abb. 21) des ersten Pufferversuchs gesteigert (10%, 20%, 50% und 80% w/v SDS) um zu prüfen, ob das starke Signal bei ca. 160 kDa geringer wird, sich also die Proteine mehr lösen. Parallel hierzu wurde weiteren SDS-Puffern DTT bzw. β-Mercaptoethanol beigefügt, um Veränderungen durch Reagenzien, welche Disulfidbrücken spalten, beschreiben zu können (Tab. 24). Erneut wurde der gleiche Liquor, wie in den zwei vorhergehenden Pufferversuchen verwendet und mit dem gleichen Verfahren der Acetonpräzipitation wie in Pufferversuch 2 verfahren.

Tab. 24 Verwendete Puffer im Pufferversuch 3. *Acetonpräzipitation (AP), Natrium-dodecylsulfat (SDS), Lithium dodecyl sulfate (LDS), Dithiothreitol (DTT).*

Lane	Liquor/Zellen	AP/ keine AP (-)	Puffer
1	Liquor	AP	Puffer 5 (Upper Tris buffer (pH 6,8) – 4% w/v SDS
2	Liquor	AP	Upper Tris buffer (pH 6,8) – 10% w/v SDS
3	Liquor	AP	Upper Tris buffer (pH 6,8) – 10% w/v SDS
4	Liquor	AP	Upper Tris buffer (pH 6,8) – 20% w/v SDS
5	Liquor	AP	Upper Tris buffer (pH 6,8) – 20% w/v SDS
6	Liquor	AP	Upper Tris buffer (pH 6,8) – 10% w/v SDS; 1 µl DTT (NuPage Reducing Agent)
7	Liquor	AP	Upper Tris buffer (pH 6,8) – 10% w/v SDS; 1 µl DTT (NuPage Reducing Agent)
8	Liquor	AP	Upper Tris buffer (pH 6,8) – 4% w/v SDS; 10% v/v β-Mercaptoethanol
9	Liquor	AP	Upper Tris buffer (pH 6,8) – 4% w/v SDS; 10% v/v β-Mercaptoethanol
10	HEK293	-	10 µl LDS und 4 µl DTT (siehe 3.1.3.1)
11	Liquor	AP	Upper Tris buffer (pH 6,8) – 50% w/v SDS
12	Liquor	AP	Upper Tris buffer (pH 6,8) – 80% w/v SDS
13	Liquor	AP	LDS Sample Buffer (NuPAGE® LDS Sample Preparation Buffer (pH 8.4))

Aus den Bildern (Abb. 25 und Abb. 26) ist erkennbar, dass bei höherer SDS-Konzentration das Signal bei ca. 160 kDa schwächer und das Signal bei ca. 70 kDa stärker wird (Puffer 4/5). Wird DTT oder β-Mercaptoethanol (Puffer 6–9) hinzugegeben verschwinden die Banden zwischen 60 und 220 kDa allerdings fast vollständig. Sind die SDS-Konzentrationen jedoch zu hoch (Puffer 12), so ist der Puffer zu zähflüssig, was das exakte pipettieren erschwert und die Proteine können sich vermutlich nicht mehr richtig durch das Gel bewegen. Bei einem reinen LDS Puffer ohne DTT, welches Disulfidbrücken spaltet, (Puffer 13) werden die Proteine nicht richtig gelöst und denaturiert und bewegen sich daher ebenfalls sehr schlecht durch das Gel.

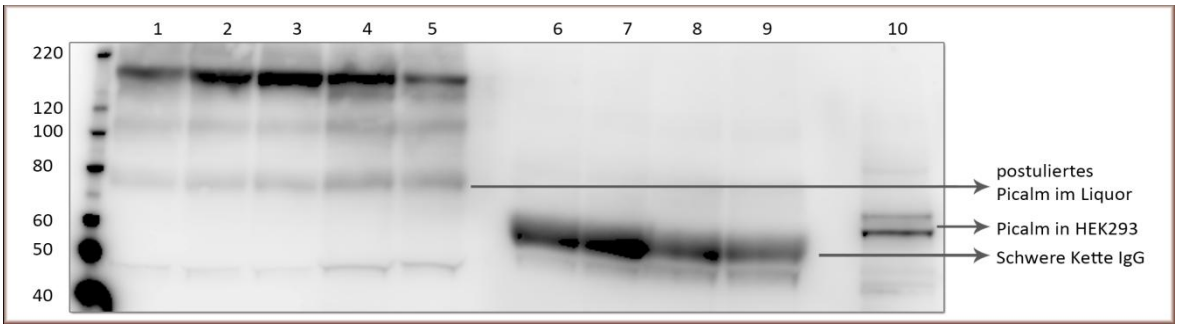

Abb. 25 Western Blot mit acetonpräzipitierten Liquor-Proben in verschiedenen Puffern gelöst (1–9, Tab. 24), um Picalm im Liquor nachzuweisen. *Bei höheren SDS-Konzentrationen (4, 5) zeigt sich ein stärkeres Picalm-Signal (Lane 4, 5 versus Lane 1, 2). Bei Zugabe von DTT (Dithiothreitol) oder β-Mercaptoethanol verschwindet das Picalm-Signal (6–9). Als Positivkontrolle dienen unbehandelte HEK293 Zellen (10). Liquor-Proben entstammen der neurologischen Universitätsklinik Ulm (2001–2010). Natriumdodecylsulfat (SDS), Immunglobulin G (IgG). (1. Antikörper: Anti-Picalm, 2. Antikörper: Anti-Goat)*

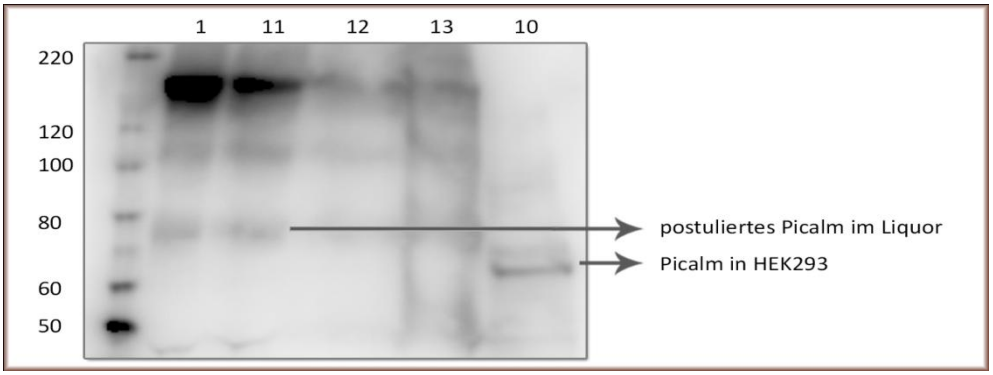

Abb. 26 Western Blot mit acetonpräzipitierten Liquor-Proben in verschiedenen Puffern gelöst (1, 11–13, Tab. 24), um Picalm im Liquor nachzuweisen. *Bei zu hohen SDS-Konzentrationen (12) und reinem LDS-Puffer (13) werden die Proteinbanden undeutlich. HEK293 Zellen (10), der Liquor und die Antikörper entsprechen der Abb. 25. Natriumdodecylsulfat (SDS), Lithium dodecyl sulfate (LDS).*

Das wichtigste Ergebnis dieses Versuchs ist, dass bei Zugabe von DTT bzw. β-Mercaptoethanol (Puffer 6–9, Abb. 25) die Proteinbanden bei ca. 160 kDa, 110 kDa und 72 kDa verschwinden. Die plausibelste Erklärung ist, dass das im Liquor zweithäufigste Protein, das Immunglobulin G (IgG) durch den SDS-Puffer (Upper Tris buffer, Puffer 1–5, Tab. 24) in seine einzelnen Komponenten aufgespalten, jedoch nicht vollständig denaturiert wurde. Diese Antikörper-Komponenten des Liquors werden vermutlich direkt durch den Zweitantikörper Anti-Goat bzw. den Clean-Blot IP Detection Reagent erkannt.

Ein weiteres Indiz für die Aufspaltung und Darstellung von IgG zeigt ein Western Blot, bei welchem als Erstantikörper Anti-Ubiquitin und als Zweitantikörpter Anti-Goat verwendet wurde (Abb. 27). Die Abbildung ist den Bildern mit einem Anti-Picalm Antikörper identisch, weshalb sich folgern lässt, dass der Erstantikörper für die Entstehung der Banden wahrscheinlich irrelevant ist. Da der Zweitantikörper bei beiden Western Blots derselbe ist, wird angenommen, dass dieser Zweitantikörper direkt die Komponenten des IgGs des Liquors bindet.

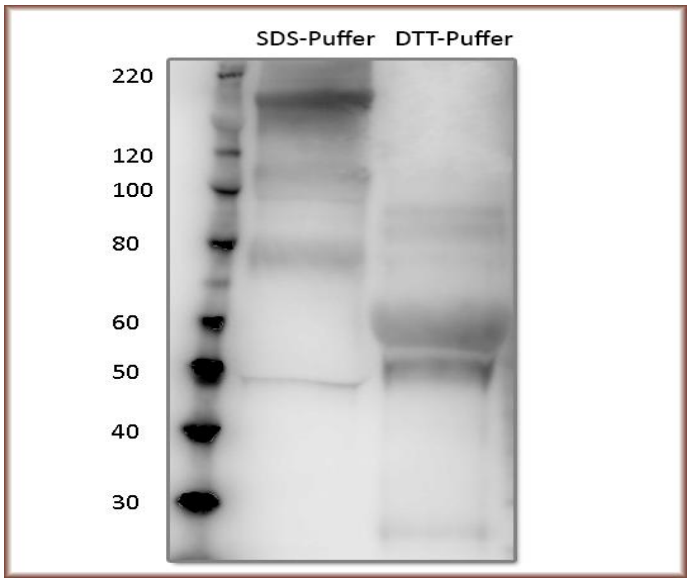

Abb. 27 Western Blot mit acetonpräzipitiertem Liquor in zwei Puffern gelöst und einem Anti-Ubiquitin Antikörper. *Die Signale mit diesem Antikörper sind nahezu identisch zum Anti-Picalm Antikörper (Abb. 25), was für die Darstellung von Immunglobulin G und nicht von Picalm spricht. Der Liquor entstammt der neurologischen Universitäts-klinik Ulm (2001–2010). Natriumdodecylsulfat (SDS), Dithiothreitol (DTT). (1. Antikörper: Anti-Ubiquitin, 2. Antikörper: Anti-Goat)*

Daraus lässt sich nun folgern, dass bis zu diesem Zeitpunkt noch kein Picalm-Signal im Liquor nachgewiesen werden konnte.

3.1.3.7 Immunpräzipitation

3.1.3.7.1 Zwei Methoden der Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation wird aus 1 ml Liquor das Protein Picalm, falls es auch nur in sehr kleinen Konzentrationen vorhanden ist, mittels Anti-Picalm Antikörper und Protein G Beads isoliert (Abb. 28) und kann anschließend mit einem Western Blot detektiert werden. Als Positivkontrolle für Picalm dienen erneut Zelllysate (Neuro-2A), die im TritonR X-100 Lysis buffer lysiert wurden.

Die Immunpräzipitation wurde mit Neuro-2A Zelllysaten auf zwei verschiedene Methoden getestet, um die bessere Methode für Liquor anwenden zu können.

Z. Inkubation des Zelllysats (Z) mit Anti-Picalm und anschließender Zugabe der Protein G Beads nach Protokoll des Herstellers (Abb. 28).

B. Inkubation der Protein G Beads (B) mit Anti-Picalm und danach Inkubation mit dem Zelllysat (Abb. 28), mit dem Ziel die Beads mit Anti-Picalm zu sättigen, dass das IgG des Liquors in folgenden Versuchen nicht an die Beads binden kann, bzw. der Anteil der gebundenen IgGs an die Beads geringer ist. Die Bindung zwischen IgG des Liquors und den Protein G Beads könnte dadurch bedingt sein, dass sowohl das IgG des Liquors als auch die Anti-Picalm Antikörper Immunglobuline sind und somit vermutlich über die gleichen Bindungsstellen verfügen.

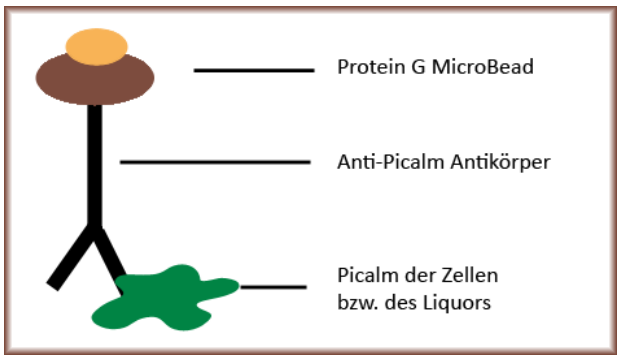

Abb. 28 Schematische Darstellung der Immunpräzipitation von Picalm aus Zellen und Liquor.

Wie im Material- und Methodenteil dieser Arbeit beschrieben, wurde 1 ml Zelllysat eingesetzt und die Immunpräzipitation durchgeführt (siehe 2.2.8). Die immunpräzipitierten Zellen (Lane 4–9, Abb. 29) zeigen ein deutlich stärkeres Picalm-Signal als die unbehandelten, nicht-immunpräzipitierten Neuro-2A Zellen (Lane 1–3, Abb. 29). Zwischen den zwei unterschiedlichen Methoden Z (Lane 4–6) und B (Lane 7–9) ist kein Unterschied zu erkennen, das Picalm wird entsprechend von beiden Methoden gleich gut aus den Zelllysaten herausgefiltert.

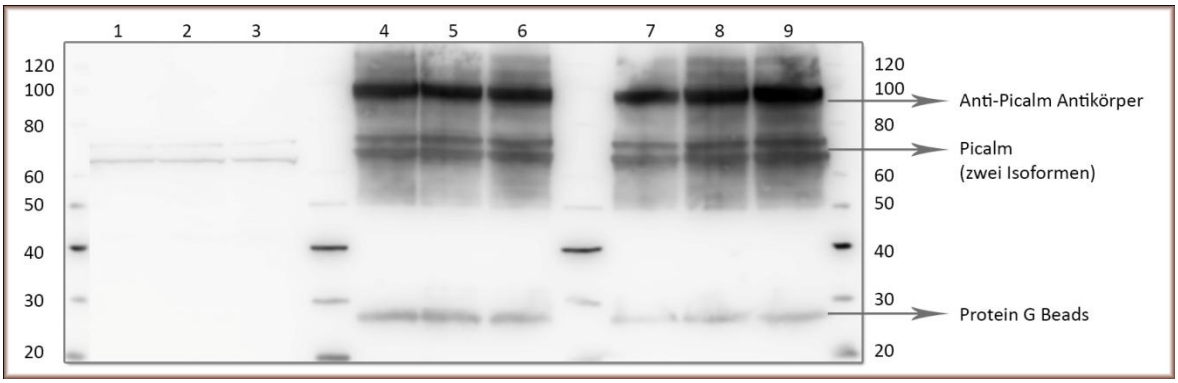

Abb. 29 Western Blot mit unbehandelten Neuro-2A Zellen (1–3), mit immunpräzipitierten Neuro-2A Zellen nach Methode Z (4–6) und mit immunpräzipitierten Neuro-2A Zellen nach Methode B (7–9). *Methode Z und B sind im Text erklärt. Das Picalm-Signal (62 und 70 kDa) der immunpräzipitierten Zellen ist deutlich stärker als die nicht immunpräzipitierten Zellen. Zwischen den Methoden Z und B ist kein Unterschied in der Stärke des Picalm-Signals erkennbar.*
(1. Antikörper: Anti-Picalm, 2. Antikörper: Anti-Goat)

Außer dem Picalm-Signal finden sich bei den immunpräzipitierten Zelllysaten noch weitere Proteinbanden (bei ca. 100 kDa und ca. 28 kDa), die in Abb. 29 beschrieben sind.

Ziel dieses Versuches war es festzustellen, ob beide Methoden Picalm gleich gut aufkonzentrieren, nicht jedoch ob das Prinzip der Methode B auch wirklich vorteilhaft für die Versuche mit Liquor sein wird (Methode B: Inkubation der Beads mit dem Anti-Picalm Antikörper, um die Beads mit Anti-Picalm abzusättigen und somit vor einer Bindung mit dem IgG des Liquors zu schützen). Da das Signal von Picalm für beide Methoden gleich stark ist, kann für Liquor die Methode B angewandt werden, mit dem Ziel, dass mehr Picalm und weniger IgG aus dem Liquor gewonnen wird.

3.1.3.7.2 Pre-clearing des Liquors

Eine weitere Überlegung das IgG des Liquors zu entfernen ist das Pre-clearing, welches im Protokoll des Herstellers (Miltenyi Biotec) erwähnt wird, jedoch laut Hersteller meistens nicht notwendig ist. Das Pre-clearing soll Substanzen aus den zu untersuchenden Materialien herausziehen, die anstelle des gewünschten Proteins an die Protein G Beads binden. Somit würden ungewünschte Substanzen, durch Sättigen der Bindungsstellen der Protein G Beads, das Aufkonzentrieren des gewünschten Proteins verhindern. Hier soll das im Überschuss vorhandene IgG des Liquors entfernt werden, um Picalm durch Immunpräzipitation möglichst gut konzentrieren zu können. Das Pre-clearing erwies sich jedoch in allen drei Ansätzen als unvorteilhaft. Für die drei Ansätze wurden verschiedene Mengen an Protein G Beads eingesetzt (beschrieben in 2.2.8.2). Bereits Liquor, welcher zwar das Pre-clearing durchlaufen hatte, jedoch noch nicht immunpräzipitiert wurde, zeigte ein verwaschenes Laufmuster. Umso mehr Beads hinzugefügt wurden, umso mehr zusätzliche Banden und Streifen entstanden (z.B. bei ca. 200 kDa, 120 kDa, 80 kDa). Die Bande der schweren Kette von IgG müsste nach dem Pre-clearing geringer oder verschwunden sein, doch die Bande blieb weiterhin bestehen (Abb. 30). Warum es zu diesen verwaschenen Proteinbanden kam und warum die schwere Kette von IgG weiterhin bestand ist unklar. Möglicherweise interagieren die Protein G Beads mit dem Liquor. Schlussfolgern lässt sich jedoch, dass das Pre-clearing nicht den gewünschten Effekt erzielt und somit irrelevant für die Immunpräzipitation mit Liquor ist.

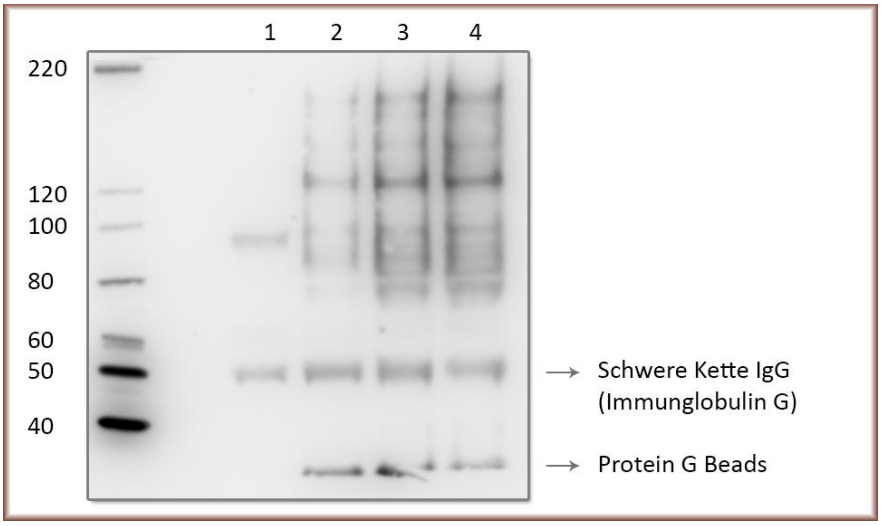

Abb. 30 Western Blot mit vorgereinigtem Liquor (pre-clearing). *Als Positivkontrolle dient Liquor in den Puffern LDS (lithium dodecyl sulfate sample loading buffer) und DTT (Dithiothreitol) gelöst (1). Das Pre-clearing des Liquors erfolgte mit Protein G Beads (Beads): 50 µl Beads (2), 100 µl Beads (3), 150 µl Beads (4). Das Ziel die IgG-Bande durch das Pre-clearing (2–4) zu eliminieren ist nicht erreicht, die IgG-Bande ist weiterhin nachweisbar. Der Liquor entstammt der neurologischen Universitätsklinik Ulm (2001–2010). (1. Antikörper: Anti-Picalm, 2. Antikörper: Anti-Goat)*

Da die Methoden Z und B mit den Zelllysaten ein gleichwertig starkes Picalm-Signal zeigen, wurde entschieden die Methode B ohne pre-clearing für mehrere Liquor-Proben durchzuführen.

3.1.3.7.3 Immunpräzipitationen mit Liquor

Für die Immunpräzipitation mit Liquor wurde, wie bei den Zelllysaten, ein Volumen von 1 ml Liquor verwendet und die Methode B durchgeführt (siehe 2.2.8). Für diesen letzten Versuch Picalm im Liquor nachzuweisen, wurden Picalm überexprimierende Neuro-2A Zellen hergestellt (siehe 2.2.1 und 2.2.2), um eine möglichst gute Positivkontrolle zu haben. Für die Liquoranalyse wurden Liquor-Proben von drei Alzheimerpatienten (AD I–III), drei Depressionspatienten (DC I–III) und drei Kontrollpatienten (C I–III) ausgewählt (Abb. 31). Im Anschluss an die Immunpräzipitation erfolgte ein Western Blot mit den zuvor angewandten Antikörperkonzentrationen: Anti-Picalm 1:500, Anti-Goat 1:10 000. Sowohl bei den unbehandelten Liquor-Proben als auch bei den immunpräzipitierten Liquor-Proben zeigen sich keine Banden zwischen 60 und 72 kDa, was auf ein Signal von Picalm hindeuten könnte (Abb. 31).

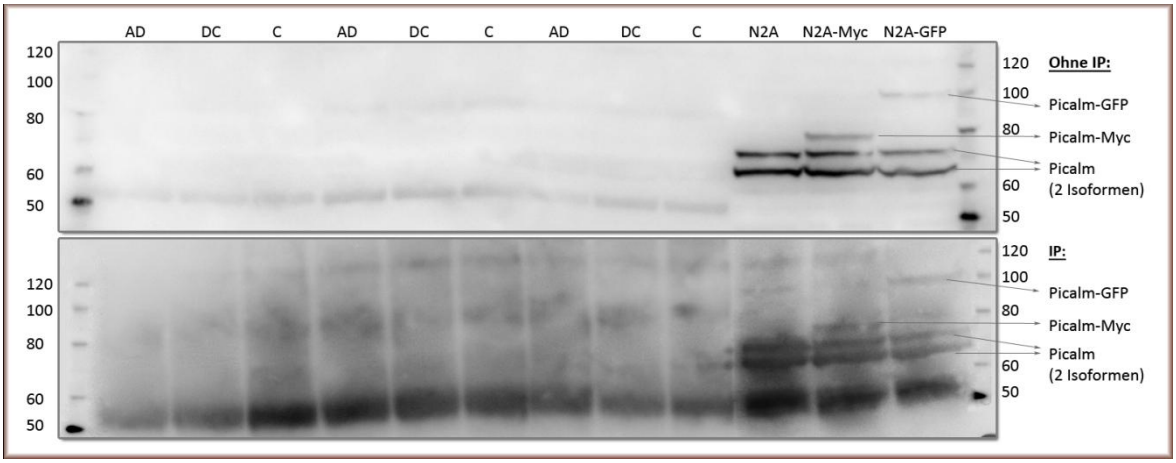

Abb. 31 ***<u>Bild oben:</u>*** ***Western Blot mit unbehandelten Liquor-Proben (AD, DC, C) und Zelllysaten in den Puffern LDS (lithium dodecyl sulfate) und DTT (Dithiothreitol) gelöst****. Diese unbehandelten Proben dienen zum Vergleich der Immunpräzipitation (IP) (Bild unten). Als Positivkontrolle dienen nicht-immunpräzipitierte Zelllysate: Endogene Picalm Expression in Neuro-2A (N2A) und überexprimiertes Picalm in Neuro-2A (N2A-Myc und N2A-GFP).*

<u>Bild unten:</u> ***Western Blot mit immunpräzipitierten Liquor-Proben (AD, DC, C) und Zelllysaten, um Picalm im Liquor darzustellen.*** *Liquor und Zelllysate entsprechen dem Bild oben.*

<u>Bild oben und unten:</u> Es zeigt sich kein Picalm-Signal (62–72 kDa), weder bei unbehandeltem Liquor, noch bei Picalm-konzentriertem Liquor mittels Immunpräzipitation. Das Picalm-Signal der Zellen verstärkt sich durch die IP, die IP hat daher prinzipiell funktioniert. Alzheimer-Demenz (AD), Krankheitskontrolle: Depression (DC), Kontrolle (C), Grün fluoreszierendes Protein (GFP). Liquor-Proben entstammen der neurologischen Universitätsklinik Ulm (2001–2010).
(1. Antikörper: Anti-Picalm, 2. Antikörper: Anti-Goat)

Aus allen Versuchen Picalm nachzuweisen (siehe 3.1.3.1–3.1.3.7) lässt sich folgern, dass Picalm mit den von mir im Labor etablierten Methoden im Liquor nicht nachzuweisen ist.

3.2 Zyto- und Chemokinbestimmung im Liquor

3.2.1 Zyto- und Chemokine im Liquor von Alzheimer-patienten, Depressionspatienten und Kontrollpatienten

Messungen der Zyto- und Chemokine (Interleukin-1β (IL-1β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNFα)) wurden mit Liquor-Proben von Patienten mit AD, von Patienten mit Depression und von Kontrollpatienten durchgeführt. Mit diesen Proben sollen einerseits Unterschiede der Zyto- und Chemokinkonzentrationen zwischen gesunden und an AD erkrankten Personen festgestellt werden, um mögliche Biomarker der AD zu erkennen, andererseits wurden zwei neurologische Erkrankungen, AD und Depression, verglichen, um festzustellen ob Veränderungen möglicherweise nur bei einer Erkrankung auftreten und somit möglicherweise spezifisch für diese Erkrankung wären (siehe 4.2.1).

In dieser Studie sind im Liquor von Alzheimerpatienten und Depressionspatienten, im Vergleich zu Kontrollpatienten, fast alle Konzentrationen der Zyto- und Chemokine verändert: Die IL-1β Konzentration im Liquor zeigt eine tendenzielle Steigerung des Medians von 0,37 pg/ml bei Kontrollpatienten auf 0,48 pg/ml bei AD (Abb. 32, Interleukin-1β). Der Median der Interleukine IL-6 mit 1,3 pg/ml bei Kontrollpatienten, 0,81 pg/ml bei Depression und 0,9 pg/ml bei AD (Abb. 32, Interleukin-6) und IL-8 mit 46,27 pg/ml bei Kontrollpatienten, 31,54 pg/ml bei Depression und 30,91 pg/ml bei AD (Abb. 32, Interleukin-8) zeigt eine signifikante Reduktion der Konzentrationen bei AD und Depression. Die Konzentration von TNFα ist signifikant reduziert bei Depressionspatienten mit einem Median von 0,29 pg/ml im Vergleich zu Kontrollpatienten mit 0,44 pg/ml. Zwischen dem Median von Alzheimerpatienten (0,36 pg/ml) und Kontrollpatienten lassen sich keine signifikanten Änderungen des TNFα erkennen (Abb. 32, Tumor-Nekrose-Faktor α). Ausführliche Ergebnisse finden sich in der Abbildung 32.

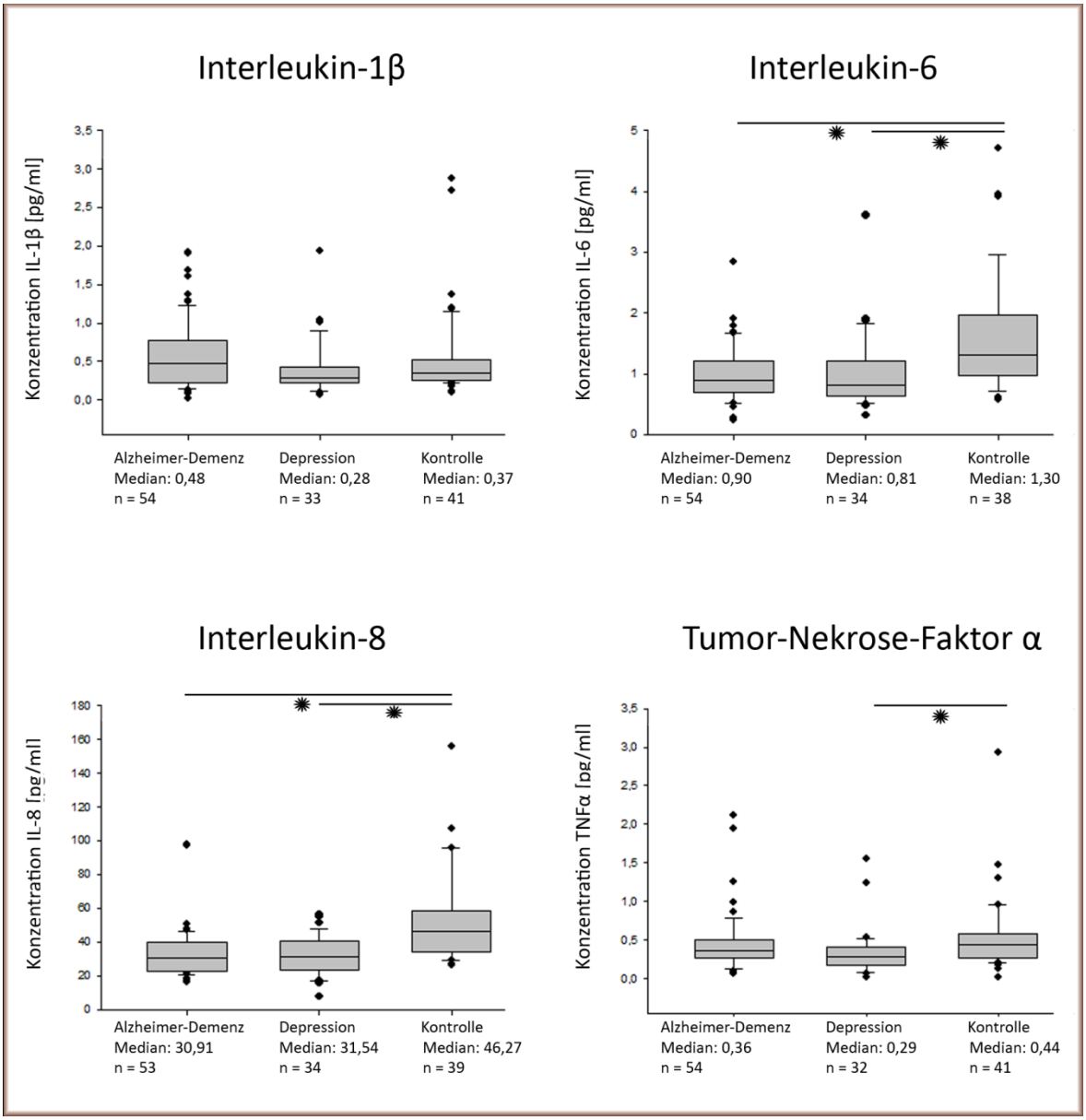

Abb. 32 Konzentrationen der Zyto- und Chemokine (Interleukin-1β (IL-1β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNFα)) im Liquor von Alzheimer-Demenz, Depression und Kontrollpatienten. *IL-1β zeigt einen tendenziellen Anstieg bei AD, wohingegen IL-6, IL-8 und TNFα eine tendentielle oder signifikante Reduktion von Patienten mit AD gegenüber Kontrollen zeigen. Liquor-Proben entstammen der neurologischen Universitätsklinik Ulm (2001–2010). Fallzahl (n).*

Zur besseren Darstellung der Veränderung von IL-1β bei AD wurden folgende Einzelwerte nicht abgebildet: AD: 5,18 pg/ml; C: 6,93 pg/ml.

(∗ Signifikanz (p<0,05) der durch Balken verbundenen Patientengruppen)

3.2.1.1 Interleukin-1β

Das Interleukin-1β ist das einzige von mir untersuchte Zytokin, welches bei AD im Vergleich zu depressiven und Kontrollpatienten im Liquor ansteigt (Abb. 32). Um die Spezifität und Sensitivität des Zytokins IL-1β für die diagnostische Trennschärfe bei der AD darzustellen, wurde eine ROC-Kurve der IL-1β Werte bei Alzheimerpatienten gegenüber der IL-1β Werte der depressiven und Kontrollpatienten erstellt. Die Kurve zeigt einen positiven, jedoch nicht signifikanten Ausschlag über die erste Winkelhalbierende (AUC=0,59) entsprechend der errechneten Statistik durch einen Mann-Whitney Rank Sum Test: Median von AD 0,48 pg/ml (n=54) gegenüber dem Median von depressiven und Kontrollpatienten zusammen 0,32 pg/ml (n=74) bei einem p-Wert von 0,075 (Abb. 33). Dies bedeutet, dass an AD erkrankte Personen tendenziell höhere IL-1β Werte haben als Kontrollpatienten, jedoch dies nicht für alle Patienten zutrifft und somit IL-1β wenig sensitiv und wenig spezifisch für AD ist.

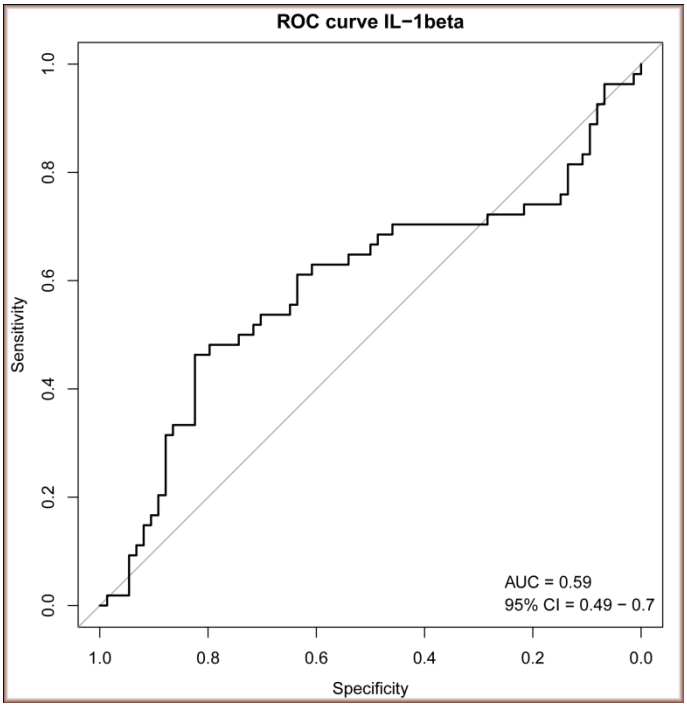

Abb. 33 ROC-Kurve (Receiver Operating Characteristic) zur Darstellung der Sensitivität (Sensitivity) und Spezifität (Specificity) des Interleukin-1ß (IL-1ß) als Diagnosemarker der Alzheimer-Demenz. *Alzheimer-Demenz gegenüber Depression und Kontrollpatienten. Area under the curve (AUC), Konfidenzintervall (CI).*

3.2.1.2 Interleukin-6 und Interleukin-8

Die weiteren zwei Interleukine, IL-6 und IL-8, zeigen eine signifikante Reduktion bei Alzheimer- und Depressionspatienten gegenüber Kontrollpatienten (Abb. 32). Es sind daher veränderte Interleukinwerte bei beiden Erkrankungen gegenüber Kontrollpatienten zu erkennen, also vermutlich keine spezifische Veränderung bei AD.

Da hier die Relevanz der Interleukine für die Alzheimerdiagnostik untersucht werden soll, wurden wie bei IL-1β bei den ROC-Kurven Depressions- und Kontrollpatienten zusammen als Kontrollgruppe betrachtet. Beim Mann-Whitney Rank Sum Test zeigt das IL-6 eine signifikante Reduktion des Medians von 1,11 pg/ml bei depressiven und Kontrollpatienten (n=72) auf 0,9 pg/ml bei AD (n=54) (p=0,04) (Abb. 34, links). Das IL-8 zeigt ebenfalls eine signifikante Reduktion des Medians von 37,17 pg/ml bei depressiven und Kontrollpatienten (n=73) auf 30,91 pg/ml bei Patienten mit AD (n=53) (p=0,003) (Abb. 34, rechts).

Dies bedeutet, dass die IL-6 und IL-8 Werte der Alzheimerpatienten im Schnitt etwas niedriger liegen als die Werte der Depressionspatienten und der Kontrollpatienten. Bei beiden Interleukinen ist die diagnostische Trennschärfe für AD relativ gering (95%-Konfidenzintervall IL-6: 0,51–0,71, 95%-Konfidenzintervall IL-8: 0,56–0,75).

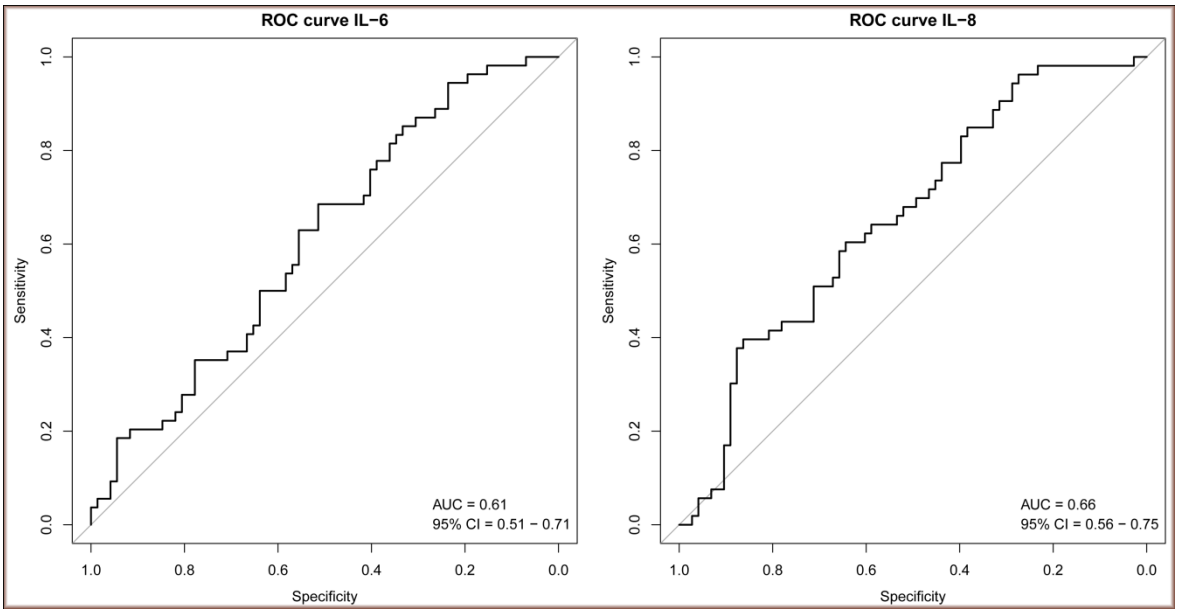

Abb. 34 ROC-Kurven (Receiver Operating Characteristic) zur Darstellung der Sensitivität (Sensitivity) und Spezifität (Specificity) des Interleukin-6 (IL-6) (links) und Interleukin-8 (IL-8) (rechts) als Diagnosemarker der Alzheimer-Demenz. *Jeweils Alzheimer-Demenz gegenüber Depression und Kontrollpatienten. Area under the curve (AUC), Konfidenzintervall (CI).*

3.2.1.3 Tumor-Nekrose-Faktor α

Für TNFα sind keine Veränderungen zwischen AD und Kontrollpatienten erkennbar (Abb. 32). Lediglich die TNFα Werte von Depressionspatienten gegenüber Kontrollpatienten sind signifikant reduziert. Als Biomarker in der Alzheimerdiagnostik, also Werte von AD gegenüber depressiven und Kontrollpatienten, zeigt die ROC-Kurve und auch die Statistik keine Signifikanz oder Tendenz. Die Medianwerte 0,36 pg/ml (AD, n=54) und 0,35 pg/ml (DC und C, n=73) sind nahezu identisch, passend zur ROC-Kurve mit einer Area under the curve (AUC) von 0,52 (Abb. 35, links). Als Biomarker in der Depressionsdiagnostik wäre TNFα durchaus interessant, da die Medianwerte von Kontrollpatienten von 0,44 pg/ml (n=41) auf 0,29 pg/ml bei Depressionspatienten (n=32) fallen und auch eine ROC-Kurve deutlich über der ersten Winkelhalbierenden liegt (AUC=0,7) (Abb. 35, rechts) (siehe 4.2.1.4).

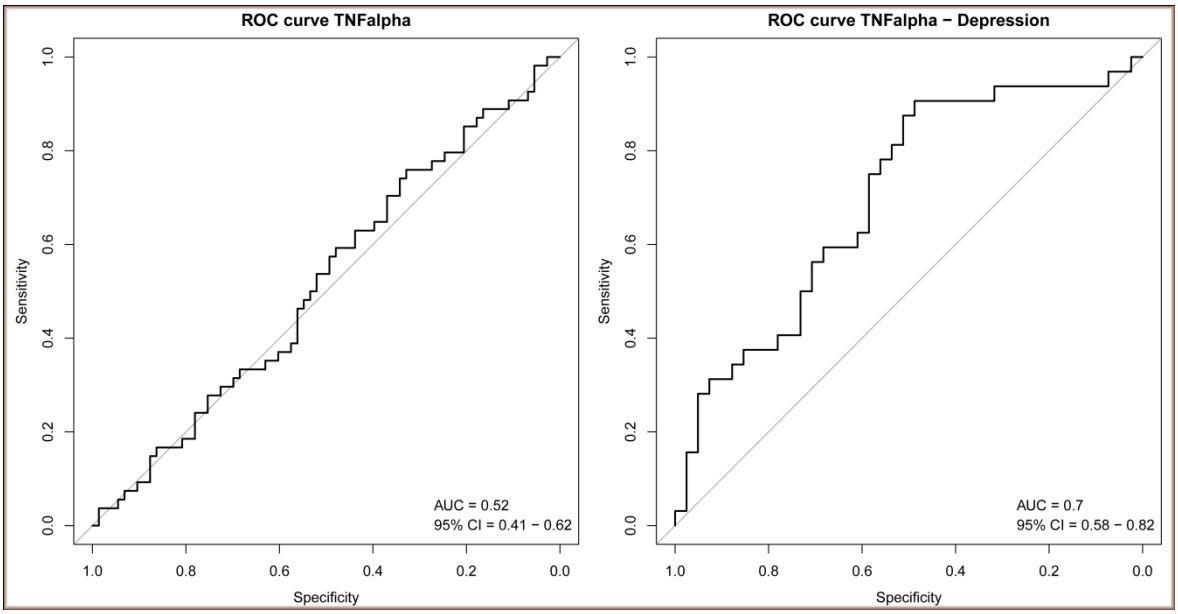

Abb. 35 ROC-Kurve (Receiver Operating Characteristic) zur Darstellung der Sensitivität (Sensitivity) und Spezifität (Specificity) des Tumor-Nekrose-Faktor α (TNFα) als Diagnosemarker der Alzheimer-Demenz (links) bzw. der Depression (rechts). *Alzheimer-Demenz gegenüber Depression und Kontrollpatienten (links) und Depression gegenüber Kontrollpatienten (rechts). Area under the curve (AUC), Konfidenzintervall (CI).*

3.2.2 Zyto- und Chemokine im Serum von Alzheimer-patienten, Depressionspatienten und Kontrollpatienten

Für die Serum-Untersuchungen wurden sowohl die gleichen Zyto- und Chemokine wie im Liquor (IL-1β, IL-6, IL-8 und TNFα) als auch die Proben derselben Patienten gewählt. Im Serum zeigen sich nur geringe, nicht signifikante Veränderungen der Zyto- und Chemokine bei AD und Kontrollen (Abb. 36). Das IL-6 zeigt als einziges Zytokin eine tendenzielle Veränderung. Es scheint, wie im Liquor, zu einer Reduktion des Medians der IL-6 Konzentration bei AD mit 1,87 pg/ml und Depression mit 2,17 pg/ml im Vergleich zu Kontrollpatienten mit 2,78 pg/ml zu kommen. Auch bei den Depressionspatienten zeigen sich nur geringe Veränderungen, mit Ausnahme des Medians von IL-8, welcher, wie auf der Abbildung sichtbar, bei Depressionspatienten mit 8,99 pg/ml gegenüber Kontrollen mit 12,35 pg/ml signifikant reduziert ist (Abb. 36).

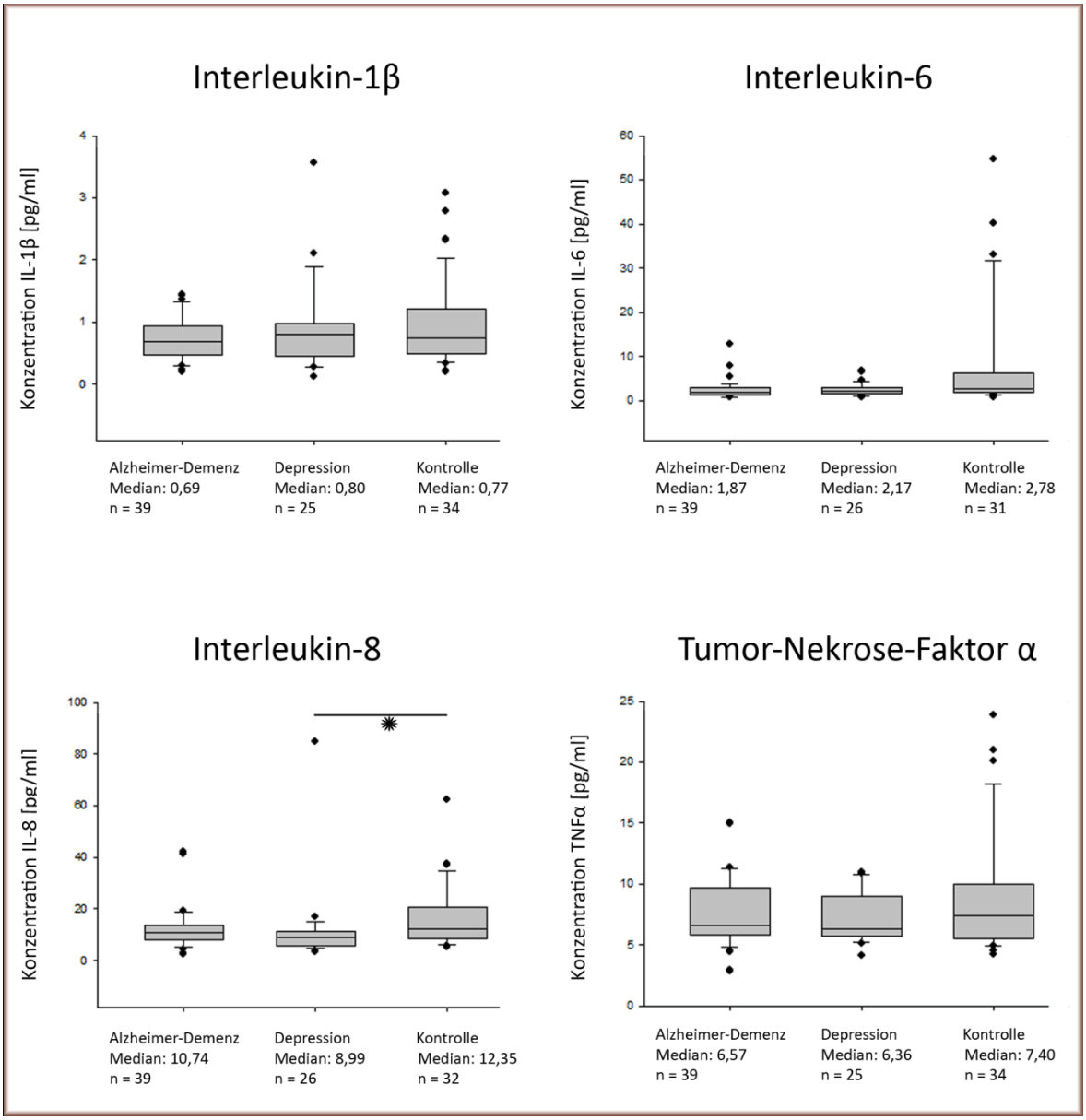

Abb. 36 Konzentrationen der Zyto- und Chemokine (Interleukin-1β (IL-1β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNFα)) im Serum von Alzheimer-Demenz, Depression und Kontrollpatienten. *Es zeigen sich keine relevanten Veränderungen der Zyto- und Chemokine im Serum, mit Ausnahme des IL-8, das bei Depressionspatienten im Vergleich zu Kontrollpatienten reduziert ist. Liquor-Proben entstammen der neurologischen Universitätsklinik Ulm (2001–2010). Fallzahl (n).*
(Signifikanz (p<0,05) der durch Balken verbundenen Patientengruppen)*

3.2.3 Korrelationen der Zyto- und Chemokine mit verschiedenen Parametern

Um erste Hinweise auf den Zusammenhang der Zyto- und Chemokinveränderungen mit der Erkrankung Alzheimer-Demenz zu bekommen, wurden die Konzentrationswerte der vier Zyto- und Chemokine mit verschiedenen krankheitsspezifischen Parametern korreliert (Korrelation nach Spearman). Diese krankheitsspezifischen Parameter sind Alter und Mini-Mental-Status-Test (MMST) der Patienten, Konzentration von Tau und Aβ im Liquor, sowie das Gesamtprotein im Liquor. Das Ziel dieser Untersuchung ist es, die bereits bekannten pathophysiologischen Mechanismen der Alzheimer-Demenz (Aβ und Tau) mit den neu untersuchten entzündlichen Prozessen in Zusammenhang zu bringen, z.B. dass sie sich gegenseitig beeinflussen. Weiterhin soll untersucht werden, ob es einen Zusammenhang der Zyto- und Chemokinveränderungen im Liquor mit der Klinik der Patienten (MMST) gibt. Wie in der Abbildung sichtbar, zeigen sich signifikante Korrelationen zwischen IL-1β und Tau (Korrelation: 0,19, $p<0,05$, $n=126$), IL-1β und Aβ (Korrelation: -0,25, $p<0,01$, $n=126$) sowie IL-1β und MMST (Korrelation: -0,24, $p<0,05$, $n=82$) (Abb. 37). Keine Korrelationen lassen sich zwischen IL-1β und dem Alter der Patienten bzw. dem Gesamtprotein im Liquor der Patienten erkennen.

Alle weiteren Zyto- und Chemokine (IL-6, IL-8, TNFα) zeigen keine Korrelationen zu einem dieser Parameter.

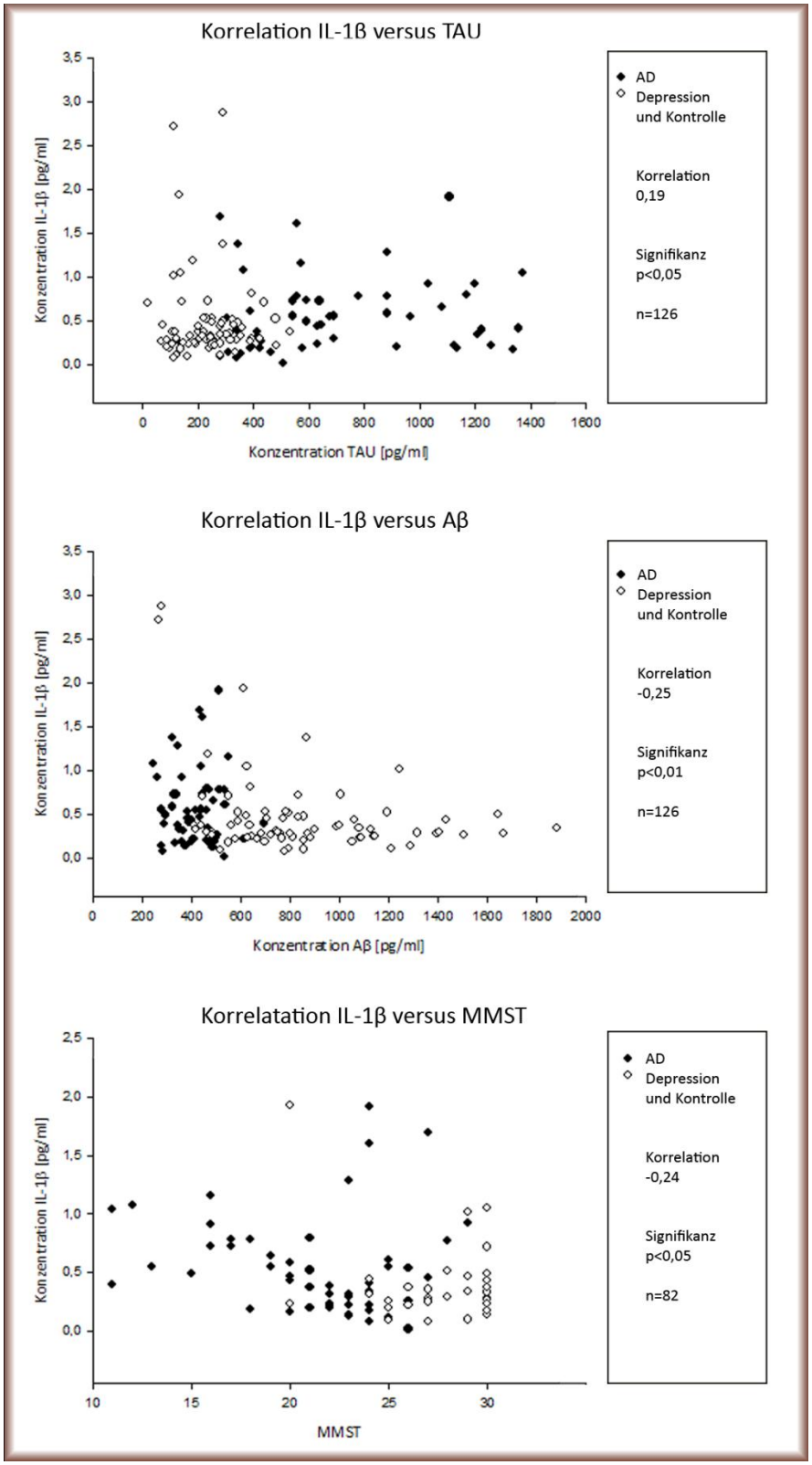

Abb. 37 Signifikante Korrelationen nach Spearman der Interleukin-1ß (IL-1ß) Konzentration mit den krankheits-spezifischen Parametern: *Tau, Amyloid ß (Aß) und Mini-Mental-Status-Test (MMST). Je höher der Tau-Wert und je niedriger der Aß- und MMST-Wert, umso höher ist die IL-1ß Konzentration. Fallzahl (n).*

3.2.4 Korrelationen der Zyto- und Chemokine zwischen den Liquor- und Serumwerten derselben Patienten

Da die Konzentrationsbestimmungen von Liquor und Serum bei denselben Patienten durchgeführt wurden, kann nun untersucht werden, ob die Liquorwerte mit den Serumwerten einen Zusammenhang haben, z.B. dass wenn die Serumwerte verhältnismäßig hoch sind, auch die Liquorwerte hoch sind. Sollte dies der Fall sein, so wäre es gut möglich, dass die Zyto- und/oder Chemokine peripher sezerniert werden und dann über die Blut-Liquor-Schranke in den Liquor gelangen.

Um diese Durchlässigkeit der Blut-Liquor-Schranke zu überprüfen, wurden Korrelationen zwischen den Liquor- und Serumwerten derselben Patienten bestimmt (Korrelation nach Spearman). Dabei zeigten sich keine Zusammenhänge der Konzentrationen für IL-1β, IL-8 und TNFα im Serum und Liquor. Lediglich für das IL-6 stellt sich eine Korrelation von 0,32 dar (Tab. 25).

Tab. 25 Korrelationen nach Spearman der Zyto- und Chemokine zwischen Liquor- und Serumwerten derselben Patienten. *Das IL-6 zeigt eine signifikante Korrelation zwischen Liquor und Serum. Interleukin-1ß (IL-1ß), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNFα), Fallzahl (n), signifikante Korrelation (p<0,05), keine signifikante Korrelation (-).*

	IL-1 β Serum	IL-6 Serum	IL-8 Serum	TNFα Serum
IL-1β Liquor	-			
IL-6 Liquor		0,32 p < 0,01 n = 96		
IL-8 Liquor			-	
TNFα Liquor				-

3.2.5 Korrelationen der Zyto- und Chemokine untereinander bei denselben Patienten

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, führen IL-1β und TNFα in Hirnzellen zu gesteigerter Synthese von IL-6 und IL-8. Dies bedeutet, dass wenn IL-1β oder TNFα ansteigen, es zu einem reflektorischen Anstieg von IL-6 und/oder IL-8 kommt. Ob sich dies auch im Liquor zeigt ist noch unbekannt, weshalb dies hier durch Korrelation (Korrelation nach Spearman) jeweils zwei der Zyto- und Chemokine bei demselben Patienten untersucht worden ist. Manche dieser Zusammenhänge der Zyto- und Chemokine lassen sich auch tatsächlich im Liquor nachweisen: Zwischen IL-1β und IL-6, IL-6 und IL-8, IL-6 und TNFα sowie IL-8 und TNFα (Tab. 26).

Tab. 26 Korrelationen nach Spearman der Zyto- und Chemokine untereinander bei denselben Patienten. *Signifikante Korrelationen zeigen sich zwischen IL-1β und IL-6, IL-6 und IL-8, IL-6 und TNFα sowie IL-8 und TNFα. Interleukin-1β (IL-1β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNFα), Fallzahl (n), signifikante Korrelation (p<0,05), keine signifikante Korrelation (-).*

	IL-6	IL-8	TNFα
IL-1β	0,24 p < 0,01 n = 124	-	-
IL-6	-	0,41 p < 0,01 n = 125	0,23 p < 0,05 n = 124
IL-8	-	-	0,49 p < 0,01 n = 124

4 Diskussion

4.1 Picalm

4.1.1 Picalm in humanem Hirnlysat

In humanen okzipitalen und zerebellären Hirnlysaten zeigen sich drei Proteinbanden mit der molekularen Masse der Isoformen von Picalm (62, 68 und 72 kDa) (Abb. 13). Die Arbeitsgruppe Baig et al. aus Bristol verwendete, zur Untersuchung von Picalm in humanem Hirnlysat, den gleichen Anti-Picalm Antikörper (sc-6433, Santa Cruz), sie konnten jedoch nur zwei Proteinbanden im Western Blot darstellen. Diese Arbeitsgruppe beschrieb, dass sie zwar die Isoform I von den anderen trennen konnten, nicht jedoch die Isoformen II und III (Baig et al. 2010). Dass in den durchgeführten Western Blots meiner Arbeit drei Isoformen getrennt werden konnten, könnte an einem anderen Gel (NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12% gradient gels, Invitrogen) oder unterschiedlichen Arbeitsschritten des Western Blots (siehe 2.2.5) liegen. Wie bei der Arbeitsgruppe Baig et al., zeigt sich in meiner Arbeit das Vorkommen der Isoform I im Hirnlysat, welches auch die größte Bindungsfähigkeit zu Clathrin besitzt (Tebar et al. 1999).
Letztendlich konnten drei Isoformen von Picalm im Hirnlysat detektiert werden, weshalb Picalm möglicherweise auch im Liquor cerebrospinalis vorkommen könnte. Die Messung von Picalm im Liquor, wie in dieser Arbeit beschrieben, würde den ersten Schritt auf der Suche nach neuen Biomarkern im Liquor bei AD bedeuten (siehe 4.1.3).

4.1.2 Picalm in verschiedenen Hirnzellen

Da die Auftrennung verschiedener Hirnzellen beim Menschen aufwendig ist, wurden murine Zellen für eine erste Darstellung von Picalm in verschiedenen Hirnzellen verwendet. In allen untersuchten Hirnzellen (Neurone, Astrozyten, Mikroglia und Neuroblastomzellen der Maus, sowie humane Neuroblastomzellen) lässt sich Picalm nachweisen. Bei Mäusen sind 6 Isoformen von Picalm bekannt, welche alle eine Größe zwischen 60 kDa und 72 kDa haben. In murinen Neuronen lassen sich drei der sechs Isoformen von Picalm darstellen (74, 70 und 61 kDa), wobei die längste Isoform durch die prominenteste Proteinbande wiedergegeben wird und daher eine höhere Konzentration

als die kürzeren Isoformen aufweist. In Astrozyten (70 und 65 kDa), Mikroglia (72 und 67 kDa) und Neuroblastomzellen (72 und 65 kDa) der Maus sind je zwei Isoformen erkennbar, wobei jeweils die kürzere Isoform die stärkere Bande hervorruft. Auch in humanen Neuroblastomzellen sind zwei Isoformen von Picalm nachweisbar (72 und 68 kDa). Die Stärke dieser zwei Proteinbanden ist nahezu identisch, die zwei Isoformen in humanen Neuroblastomzellen haben daher ähnliche Konzentrationen (Abb. 14). Der gemessenen molekularen Masse zufolge lässt sich vermuten, dass in humanen Neuroblastomzellen die Isoformen I und II exprimiert werden, im Gegensatz zu humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293), in welchen zwei kürzere Isoformen (möglicherweise Isoform II und III) exprimiert werden. Die genauere Bestimmung der Isoformen könnte beispielsweise mittels Real-Time-PCR erfolgen.
Der von mir verwendete Anti-Picalm Antikörper erkennt die Sequenz von Picalm in humanem und murinem Gewebe und kann somit für beide Spezies verwendet werden.

Sowohl in humanem Hirnlysat als auch in humanen Neuroblastomzellen zeigt sich die längste Isoform (Isoform I), welche wie bereits erwähnt, die größte Bindungsfähigkeit zu Clathrin besitzt (Tebar et al. 1999) und daher möglicherweise die bedeutendste Isoform für das Gehirn ist. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass Picalm in den wichtigsten neuronalen Zellen der Maus vorkommt, somit wahrscheinlich auch in humanen Hirnzellen und vielleicht auch in humanem Liquor.

4.1.3 Picalm im Liquor

Ziel der Arbeit ist die Suche nach neuen Biomarkern im Liquor für die Diagnostik der Alzheimer-Demenz. Die bekannten genetischen Assoziationen von Picalm (Bertram et al. 2010) und die nachgewiesene Erhöhung von Picalm im Frontalhirn bei Alzheimerpatienten (Baig et al. 2010) könnten darauf hinweisen, dass das Protein bei der Alzheimer-Demenz eine Rolle spielt. Aus dieser Erhöhung von Picalm entstand die Idee, Picalm auch im Liquor zu detektieren. Sollte Picalm die Hirn-Liquor-Schranke passieren können, so wäre eine erhöhte Konzentration von Picalm im Liquor bei Alzheimerpatienten, im Vergleich zu Kontrollpatienten, durchaus vorstellbar. Picalm wäre eventuell ein spezifischer Biomarker der Alzheimer-Erkrankung.

Um das Protein im Liquor nachweisen zu können, wurden folgende Versuche durchgeführt: Unterschiedliche Antikörperkonzentrationen, ein Albumin/IgG-Removal Kit, Acetonpräzipitationen (AP) (um Proteine im Liquor zu konzentrieren), APs mit unterschiedlichen Zweitantikörpern und unterschiedlichen Puffern zum besseren Lösen der Proteine. Durch die drei Pufferversuche (siehe 3.1.3.6) entstanden letztendlich zwei unterschiedliche Laufmuster der Proteine beim Western Blot. Einerseits zeigten sich bei SDS-Puffern Banden bei ca. 160, 110, 72 und 50 kDa, wobei die Bande bei 72 kDa exakt der molekularen Masse von Picalm (Isoform I) entsprechen würde, andererseits zeigte sich bei DTT-Puffern nur eine deutliche Bande bei ca. 50 kDa. Eine Überlegung bezüglich der SDS-Puffer war, dass die Bande bei ca. 160 kDa eventuell eine Verbindung von Picalm mit einem anderen Protein oder ein sehr ähnliches Protein ist, welches durch den Anti-Picalm Antikörper erkannt wird. Sowohl DTT als auch β-Mercaptoethanol spalten Disulfidbrücken von Proteinen, weshalb eine weitere Überlegung war, dass Picalm aus mehreren Peptidketten besteht, welche durch intermolekulare Disulfidbrücken kovalent verbunden sind, wie zum Beispiel Insulin. Dies ließ sich allerdings aus der Literatur und über UniProt nicht belegen. Zusätzlich würde dagegen sprechen, dass Picalm in Zellen gut nachzuweisen war und diese Zelllysate ebenfalls mit DTT behandelt wurden. Es musste also eine weitere Erklärung geben, warum die Banden ohne Behandlung mit DTT oder β-Mercaptoethanol vorhanden sind und nach Zugabe verschwinden.

Die plausibelste und einfachste Erklärung ist, dass das im Liquor zweithäufigste Protein durch den SDS-Puffer (Upper Tris buffer, Puffer 1–5, siehe 3.1.3.6.1) in seine einzelnen Komponenten aufgespalten wurde: das Immunglobulin G (IgG) (Abb. 38).

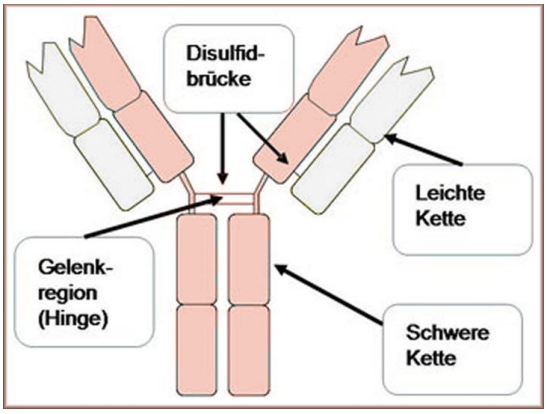

Abb. 38 Schematische Darstellung des Aufbaus von Immunglobulins G (IgG). *Durch Spaltung/Nicht-Spaltung der Disulfidbrücken können folgende Fragmente entstehen:*

- *Komplettes IgG: Zwei schwere und zwei leichte Ketten*
- *Zwei schwere und eine leichte Kette*
- *Zwei schwere Ketten*
- *Eine schwere und eine leichte Kette*
- *Eine schwere Kette*
- *Eine leichte Kette*

Vermutlich werden diese Komponenten von IgG (leichte Kette, schwere Kette, leichte und schwere Kette und zwei schwere Ketten) vom Zweitantikörper Anti-Goat und vom nativen Zweitantikörper (Clean-Blot IP Detection Reagent) erkannt (Abb. 39). Durch DTT oder β-Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken gespalten, weshalb IgG komplett in schwere und leichte Ketten zerlegt wird. Daher zeigte sich im Western Blot mit DTT-Puffern lediglich ein starkes Signal bei ca. 50 kDa, was den schweren Ketten von IgG entsprechen würde und eine sehr schwache Bande bei ca. 22 kDa, die durch die leichten Ketten von IgG dargestellt werden (Abb. 39). Vergleichbare Spaltungen des IgG in leichte und schwere Ketten durch Mercaptoethanol wurden bereits publiziert (Gearing et al. 2002).

Eine ähnliche Fehlinterpretation eines Proteins im Liquor ist der Arbeitsgruppe Borroni et al. unterlaufen. Diese Arbeitsgruppe publizierte eine signifikante Reduktion des Verhältnisses von zwei Tau-Fragmenten (33/55 kDa) bei Patienten mit progressiver supranukleärer Blickparese, einer parkinsonoiden Erkrankung, im Vergleich zu Kontrollpatienten (Borroni et al. 2009, Borroni et al. 2008). Weitere Untersuchungen

zeigten, dass es sich bei diesen zwei Fragmenten, wie in meiner Arbeit, um schwere und leichte Ketten von IgG handelt (Kuiperij et al. 2012).

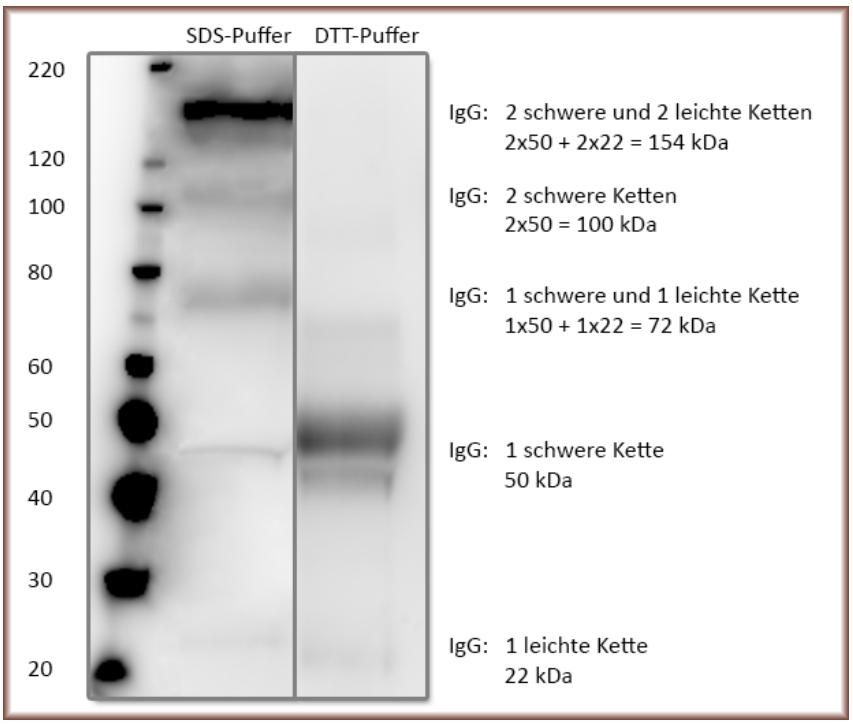

Abb. 39 Western Blot mit acetonpräzipitierten Liquor-Proben in den Puffern SDS (Natriumdodecylsulfat) und DTT (Dithiothreitol) gelöst*. Durch SDS-Puffer wird das Immunglobulin G (IgG) des Liquors in alle möglichen Einzelkomponenten zerlegt, durch DTT-Puffer werden alle Disulfidbrücken gespalten und es entstehen nur schwere und leichte Ketten des IgG.*

Mit den bisherigen Methoden konnte Picalm nicht nachgewiesen werden, was an einer sehr geringen Konzentration des Proteins im Liquor liegen könnte. Daher wurde zuerst die Überexpression von Picalm in Neuro-2A (siehe 2.2.1 und 2.2.2) vorgenommen, um im weiteren Versuch eine gute Positivkontrolle für Picalm im Liquor zu haben. Nach der Überexpression erfolgte die Immunpräzipitation, um Picalm möglichst stark zu konzentrieren, so dass das Protein möglicherweise auch im Liquor nachweisbar wird. Das Picalm immunpräzipitierter Zellen konnte deutlich aufkonzentriert werden (Abb. 31). Im Gegensatz hierzu konnte das Protein im immunpräzipitierten Liquor nicht stark genug aufkonzentriert werden, um detektierbar zu sein (Abb. 31). Letztendlich konnte Picalm im Liquor nicht nachgewiesen werden, da das Protein möglicherweise keine

Schrankensysteme passieren kann, im Liquor vielleicht sofort abgebaut wird oder die Konzentration von Picalm unter der Nachweisgrenze liegt.

Um in den Liquor zu gelangen, müssen Proteine wie Picalm Schrankensysteme, wie die Blut-Hirn-, Blut-Liquor- oder Hirn-Liquor-Schranke, passieren. Umso größer die Moleküle, desto geringer ist deren Konzentration im Liquor und desto geringer ist deren Passierfähigkeit über die Schranken, wie z.B. beim Immunglobulin M (Felgenhauer et al. 1995). Große Proteine wie Picalm, haben hierfür unterschiedliche Möglichkeiten. Der wichtigste Mechanismus ist die rezeptorvermittelte Transzytose, wobei Proteine in Hirnendothelzellen aufgenommen werden, über das Zytoplasma transportiert und an der abluminalen Membran wieder abgegeben werden (Redzic 2011). Eine andere Strategie des Transports besteht in der Modifikation der Aminosäureseitenketten, um die Lipophilie zu erhöhen und die Passage der Schranken zu erleichtern (Redzic 2011).

Gründe, dass Picalm im Liquor nicht nachgewiesen werden konnte, könnten sein, dass die Schrankensysteme zu geringe Mengen oder kein Picalm in Liquor sezernieren. Eine weitere Überlegung wäre, dass das Protein im Liquor nicht stabil ist oder sogar abgebaut wird. Liquor besitzt, wie auch Zellen oder andere Körperflüssigkeiten, die Fähigkeit Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System abzubauen (Sixt et al. 2008). Als Bindungsstelle für Ubiquitin benötigt ein Protein lediglich die Aminosäure Lysin, welches im Picalm mehrfach vorkommt.

Eine letzte Möglichkeit, warum Picalm nicht nachweisbar war, wäre, dass die Konzentration von Picalm im Liquor unter der Nachweisgrenze der von mir durchgeführten Experimente liegt. Ein Beispiel für weitere Proteine, die im Liquor nach Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden konnten, sind die 33/55 kDa Tau-Fragmente, welche als Liquorbiomarker der progressiven supranukleären Blickparese untersucht wurden (Kuiperij et al. 2012).

Um geringste Konzentrationen von Picalm im Liquor nachweisen zu können, könnte in weiteren Versuchen ein ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) für Liquor und Picalm etabliert werden.

4.2 Zytokin- und Chemokinbestimmung im Liquor

4.2.1 Zytokin- und Chemokine im Liquor und im Serum von Alzheimerpatienten, Depressionspatienten und Kontrollpatienten

4.2.1.1 Interleukin-1β

Das Interleukin-1β (IL-1β) ist das einzige von mir untersuchte Interleukin, dessen Konzentration bei AD im Vergleich zu depressiven und Kontrollpatienten im Liquor ansteigt. Dies unterstützt die Hypothese, dass eine entzündliche Reaktion im Gehirn von Alzheimerpatienten vonstattengeht. Möglicherweise könnte der IL-1β Anstieg spezifisch für AD sein, da kein Anstieg bei Depressionspatienten zu erkennen ist. Depressionspatienten wurden untersucht, um erste Hinweise zu bekommen, ob die Zytokinveränderung spezifisch für AD sein könnte. Hierfür müssten jedoch noch andere Demenzerkrankungen und andere neurologische Erkrankungen untersucht werden.

Die Depression ist eine affektive Störung des Gehirns, bei welcher, wie bei der AD, entzündliche Prozesse vermutet werden (Leonard 2007). Depressionspatienten haben ein erhöhtes Risiko an Alzheimer zu erkranken (Jorm 2000). Die Entwicklung einer Demenz aus einer Depression könnte durch eine Aktivierung von Makrophagen im Blut und Mikroglia im Gehirn, welche für die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen verantwortlich sind, zustande kommen (Leonard 2007). Eines dieser proinflammatorischen Zytokine könnte IL-1β sein, welches bei AD, nicht jedoch bei der Depression angestiegen ist.

Um festzustellen, ob sich IL-1β im Liquor als Biomarker der AD eignen würde, wurde die Spezifität und Sensitivität von IL-1β bei AD mittels einer ROC-Kurve (Receiver Operating Characteristic) ermittelt. Die ROC-Kurve stellt die Fähigkeit des Biomarkers, tatsächlich Kranke als krank zu erkennen (Sensitivität) der Fähigkeit, tatsächlich Gesunde als gesund zu identifizieren (Spezifität), gegenüber. Beträgt die Fläche unter der Kurve (AUC, Area under the curve) den Wert 1, so bedeutet dies eine Sensitivität und Spezifität von 100%, beträgt die AUC 0,5, so bedeutet dies, dass der Biomarker dem Zufallsprozess unterliegt und Werte bei Kranken und Gesunden, erhöht oder erniedrigt sein können. Das

95%-Konfidenzintervall ist ein Unsicherheitsbereich, wobei ein unbekannter Parameter mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% in diesem Intervall liegt. Signifikante Ergebnisse, errechnet mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ($p<0,05$), zeigen sich in meinen Berechnungen durch einen unteren Grenzwert des Konfidenzintervalls von über 0,5.
In diesem Versuch wurde eine ROC-Kurve der IL-1β Werte bei Alzheimerpatienten gegenüber der IL-1β Werte der depressiven und Kontrollpatienten erstellt. Depressive und Kontrollpatienten wurden zusammen betrachtet, um eine größere Fallzahl der Kontrollen zu erreichen. Die ROC-Kurve zeigte einen positiven Ausschlag über die erste Winkelhalbierende (AUC=0,59), aber bei einem p-Wert von 0,075 (95%-Konfidenzintervall: 0,49–0,7) kein signifikantes Ergebnis (Abb. 33).

Neben meiner Liquor-Studie mit Alzheimerpatienten existieren bereits sechs Publikationen, bei denen ebenfalls IL-1β im Liquor untersucht wurde, nicht jedoch unter dem Gesichtspunkt als Biomarker für AD. Alle sechs Publikationen weisen niedrigere Fallzahlen auf, als die von mir durchgeführte Studie. In zwei dieser Studien steigt das IL-1β bei AD ebenfalls an (Blum-Degena et al. 1995, Tarkowski et al. 1999). In weiteren Studien zeigen sich keine Änderungen zwischen AD und Kontrollen (Martinez et al. 2000, Gomez-Tortosa et al. 2003, Lanzrein et al. 1998) oder auch verminderte IL-1β Konzentrationen bei AD (Richartz et al. 2005). Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten sich zum einen aus den geringeren Fallzahlen der Studien, zum anderen auch aus der geringen Konzentration des Interleukins im Liquor ergeben. Manche Arbeitsgruppen beschreiben, dass mit deren Assays das IL-1β nicht oder nur bei einigen Proben nachzuweisen war (Gomez-Tortosa et al. 2003, Tarkowski et al. 2001). Auch in meiner Studie ließen sich nur geringe Konzentrationen des IL-1β nachweisen, jedoch konstant in allen Liquor-Proben. Ein weiterer Grund der unterschiedlichen Studienergebnisse könnte die Auswahl von Alzheimerpatienten mit verschiedenen Schweregraden der AD sein. Da das IL-1β mit dem Mini-Mental-Status-Test korreliert (siehe 3.2.3 und 4.2.2), könnte die Auswahl eines geringen Schweregrades der AD andere Ergebnisse liefern, als die Auswahl eines hohen. Die Auswahl der Alzheimerpatienten unterschied sich in nahezu allen Studien durch Verwendung verschiedener kognitiver Tests, gelegentlich bildgebender Diagnostik und meist fehlender Aβ/Tau Untersuchung im Liquor. Weiterhin zeigte die meist ungenau beschriebene Präanalytik des Liquors Unterschiede. Um genauere Aussagen über das Verhalten des Interleukins bei AD machen zu können, müssen noch weitere Studien mit

großen Fallzahlen, gleicher Patientenauswahl und Präanalytik bzw. Umgang mit dem Liquor durchgeführt werden. Sinnvoll wäre auch ein speziell für Liquor und IL-1β etablierter Assay. Da der von mir verwendete Assay vier Zyto- und Chemokine gleichzeitig bestimmt hat und die Konzentration von IL-1β im Liquor im Vergleich zu den anderen Zyto- und Chemokinen sehr gering ist, könnte dies zu kleinen Ungenauigkeiten der Messergebnisse geführt haben.

Der Anstieg im Liquor steht pathophysiologisch in Einklang mit der erhöhten Expression des IL-1β um Amyloidplaques in Gehirnen von Alzheimerpatienten (Griffin et al. 1989, Mrak et al. 2001) und auch mit der erhöhten Konzentration im Hirngewebe bei AD im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sokolova et al. 2009). Eine andere Hirnlysat-Studie berichtet von einer gleichbleibenden IL-1β Konzentration im Hirngewebe, wobei deren Fallzahlen sehr begrenzt waren (AD: n=6, non-AD: n=4), was zu dem unterschiedlichen Ergebnis im Vergleich zur Studie von Sokolova et al. geführt haben könnte (Lanzrein et al. 1998). Diese höhere IL-1β Konzentration könnte bei Alzheimerpatienten zu verstärkter APP-Sekretion und damit zu gesteigertem Aβ führen (Griffin et al. 2000). Die weitere Funktion von IL-1β, der signifikanten Hochregulation der α-Spaltung von APP und Reduktion von Aβ (Tachida et al. 2008), könnte durch noch unbekannte Prozesse gehemmt werden und somit zum Progress der AD beitragen. Weiterhin kann IL-1β die Pathogenese der AD fördern, indem IL-1β zur Überexpression und Phosphorylierung von Tau und zur cholinergen Dysfunktion von Synapsen führt (Sheng et al. 2000, Li et al. 2000).

Im Serum zeigte sich kein Anstieg des Interleukins, weder bei AD noch bei Depression. Die Veränderungen im Liquor bei AD sprechen daher in dieser Studie für einen intrathekalen Prozess der Erkrankung ohne systemische Beteiligung. Bereits existierende AD-Serum-Studien zeigen jedoch eine geringe Steigerung der IL-1β Konzentration im Serum bei AD (Swardfager et al. 2010). Ob diese Steigerung durch einen Übertritt der Interleukine aus dem Gehirn zustande kommt (siehe 4.2.3) oder es eine periphere entzündliche Beteiligung der Erkrankung gibt, ist unbekannt.

Im Vergleich zu IL-1β, welches keine signifikanten Ergebnisse zeigt, weisen Amyloid β und Tau jeweils signifikante Ergebnisse als diagnostische Biomarker der AD in Bezug auf die Sensitivität und Spezifität auf (Kombination von Aβ und Tau: Sensitivität von 86–92% und

Spezifität von 89% (Sunderland et al. 2003, Engelborghs et al. 2009)). Möglicherweise würde jedoch deren Kombination mit IL-1β die Sensitivität und/oder die Spezifität weiter erhöhen. Ein weiterer interessanter Aspekt wäre die Differenzierung nach Erkrankungsgrad. Möglicherweise würde sich ein deutlicher Anstieg des IL-1β bei Patienten mit MCI (Mild Cognitive Impairment, leichte kognitive Beeinträchtigung) zeigen, also in sehr frühen Erkrankungsphasen oder auch bei Patienten in sehr spätem Stadium der AD. Ein Anstieg in frühen Erkrankungsphasen wäre für die Diagnostik der AD von entscheidender Bedeutung, da eine möglichst frühe Diagnose und Therapie den Verlauf der Erkrankung entscheidend beeinflussen könnte. Eventuell würde sich IL-1β auch als Verlaufsparameter der AD eignen, da IL-1β mit dem Mini-Mental-Status-Test und somit mit der Klinik der Alzheimerpatienten korreliert (siehe 4.2.2). Um diese Aspekte genauer zu untersuchen, wären noch mehrere unabhängige Studien mit unterschiedlichen Assays und einer Patientenauswahl mit verschiedenen Schweregraden der AD und MCI nötig.

4.2.1.2 Interleukin-6

Das Interleukin-6 (IL-6), ebenso wie das Interleukin-8, kennzeichnet sich in meiner Studie durch eine signifikante Reduktion der Interleukinkonzentration bei AD und bei Depression im Vergleich zu Kontrollpatienten. Da die Reduktion bei beiden Erkrankung erkennbar ist, könnte es sich um Veränderungen bei mehreren neurologischen Erkrankungen handeln. Um diese Hypothese zu bestätigen, müssten jedoch noch weitere Demenzerkrankungen und andere neurologische Erkrankungen untersucht werden.
Die von mir gemessenen veränderten Konzentrationen von IL-6, IL-8 und TNFα (Abb. 32) bei der Depression unterstützen die Hypothese, dass entzündliche Prozesse bei der Depression vorkommen (Leonard 2007).

Um die Sensitivität und Spezifität der diagnostischen Relevanz von IL-6 bei AD darzustellen, wurde eine ROC-Kurve der IL-6 Werte bei Alzheimerpatienten gegenüber den IL-6 Werten der depressiven und Kontrollpatienten erstellt (Abb. 34). Depressive und Kontrollpatienten wurden zusammen betrachtet, da in dieser Arbeit die Relevanz der Alzheimerdiagnostik untersucht werden soll. Die ROC-Kurve zeigt einen schwachen Ausschlag über die erste Winkelhalbierende bei nur grenzwertig signifikanten Ergebnissen ($p=0,04$), weshalb das Interleukin-6 sich als Biomarker eher nicht eignen würde.

Um diese Aussage zu bestätigen, sind Vergleiche zu anderen IL-6 Studien sowie weitere unabhängige Studien mit großen Fallzahlen und unterschiedlichen Assays nötig. Bereits existierende IL-6 Studien weisen unterschiedliche Ergebnisse auf. Die folgenden Studien haben ebenfalls IL-6 im Liquor bei Alzheimer- und Kontrollpatienten bestimmt, nicht jedoch in Bezug auf eine Suche nach Biomarkern für AD im Liquor. In fünf Studien waren die IL-6 Konzentrationen im Liquor bei AD tendenziell erhöht (Gomez-Tortosa et al. 2003, Galimberti et al. 2008), drei davon signifikant erhöht (Martinez et al. 2000, Rosler et al. 2001, Blum-Degena et al. 1995). Kein Unterschied zwischen AD und Kontrollgruppen zeigte sich in weiteren vier Studien (Lanzrein et al. 1998, Tarkowski et al. 1999, Hampel et al. 1997, März et al. 1997). Eine Reduktion der Konzentrationswerte im Liquor wird ebenfalls in zwei verschiedenen Studien beschrieben (Richartz et al. 2005, Yamada et al. 1995).

Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten sich, wie bereits bei Interleukin-1β (siehe 4.2.1.1) erläutert, aus den zum Teil geringen Fallzahlen der Studien ergeben. Bis auf die Studie von Tarkowski (AD: n=34, C: n=59), welche mehr Kontrollpatienten als in meiner Studie (AD: n=54, C: n=38) aufweist, haben alle Studien geringere Fallzahlen (siehe 4.2.1.5).

Im Hirngewebe wurden, im Gegensatz zum Liquor, erhöhte oder in einer anderen Studie gleichbleibende IL-6 Konzentrationen bei Alzheimerpatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen (Sokolova et al. 2009, Lanzrein et al. 1998). Um sichere Aussagen über das Verhalten des IL-6 im Gehirn zu machen, sollten weitere Hirnlysat-Studien durchgeführt werden. Warum die Interleukinwerte im Liquor eher erniedrigt sind, ist unbekannt. Möglicherweise ist die Hirn-Liquor-Schranke bei AD sehr streng reguliert und verhindert ein Übertreten des IL-6 in den Liquor.

Für Patienten mit AD könnte eine Reduktion der IL-6 Konzentration im Liquor nun folgendes bedeuten: Sollte die IL-6 Konzentration sowohl im Liquor als auch im Hirn erniedrigt sein, so wären die neuroprotektiven Eigenschaften, wie die Regulation der Entwicklung, Differenzierung und Regeneration von Neuronen, sowie der indirekten Synthese von Kortikoiden (Gadient et al. 1997, Akira et al. 1993) und Regulation der reaktiven Gliose, die die Entfernung der Aβ-Plaques verbessert (Chakrabarty et al. 2010), schwächer als bei gesunden Personen ausgeprägt. Die Folgen der destruktiven

proinflammatorischen Eigenschaften des Interleukins (Akiyama et al. 2000) könnten durch sekundäre Prozesse stärker ausgeprägt sein als bei gesunden Personen. Andererseits wäre auch möglich, dass das IL-6 zwar im Liquor erniedrigt, aber im Hirn selbst erhöht ist, ähnlich dem Prinzip von Amyloid β, welches im Gehirn zu senilen Plaques aggregiert, aber im Liquor reduziert ist (siehe 1.2.3). Dies würde bedeuten, dass die destruktiven proinflammatorischen Eigenschaften bei AD verstärkt sind, aber auch die neuroprotektiven Eigenschaften von IL-6 das Gehirn besser schützen sollten. Möglicherweise werden die neuroprotektiven Eigenschaften bei der AD durch weitere noch nicht erforschte Prozesse gehemmt. Wie sich das Protein letztendlich verhält und welche Funktionen bei der AD die Bedeutenderen sind, ist noch unbekannt.

Die Serum IL-6 Werte verhalten sich ähnlich wie im Liquor. Es zeigt sich eine tendenzielle, aber nicht signifikante, Reduktion bei AD und Depression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Passend hierzu lässt sich eine Korrelation zwischen Liquor und Serum der IL-6 Werte derselben Patienten erkennen (siehe 4.2.3). Die IL-6 Reduktion könnte daher ein intrathekaler Prozess sein und die IL-6 Veränderung im Serum, durch Übertreten der Proteine über die Blut-Liquor-Schranke, bewirkt haben. Ebenso gut möglich, wäre ein systemischer Prozess, der zu einer IL-6 Reduktion im Liquor geführt hat. Bereits publizierte Serum-Studien mit Alzheimerpatienten zeigen, im Gegensatz zu meinen Messungen, eine leichte Steigerung der IL-6 Konzentration im Serum bei AD (Swardfager et al. 2010). Ob es letztendlich zu einer Steigerung oder einer Reduktion im Serum bei AD kommt, müsste mit weiteren Serum-Studien geklärt werden.

Letztendlich würde sich IL-6 im Liquor eher nicht als diagnostischer Biomarker der AD eignen, da IL-6 nicht nur bei Alzheimerpatienten sondern auch bei Depressionspatienten reduziert ist und somit wahrscheinlich nicht spezifisch für AD wäre. Gründe, warum die entzündlichen Prozesse bei beiden Erkrankungen zu finden sind, wurden noch nicht ausreichend erforscht. Dass sich IL-6 vermutlich nicht als Biomarker eignet, wurde auch von Swardfager et al. in einer Liquor Meta-Analyse der oben genannten Studien beschrieben (Swardfager et al. 2010).

4.2.1.3 Interleukin-8

Die Konzentration von Interleukin-8 (IL-8) im Liquor kennzeichnet sich, wie das Interleukin-6, durch eine signifikante Reduktion bei AD und bei Depression im Vergleich zu Kontrollpatienten. Es handelt sich daher um eine Reduktion bei beiden Erkrankungen, was wie bereits bei IL-6 beschrieben (siehe 4.2.1.2), auf eine Veränderung verschiedener neurologischer Erkrankungen hindeuten könnte. Hierfür müssten jedoch weitere demenzielle und andere neurologische Erkrankungen untersucht werden.

Für das IL-8 wurde, wie bereits für das IL-1β und IL-6, eine ROC-Kurve erstellt, um die Spezifität und Sensitivität von IL-8 für die diagnostische Relevanz bei Alzheimerpatienten darzustellen. Wie bereits bei IL-6 beschrieben, wurden depressive und Kontrollpatienten zu einer Kontrollgruppe zusammengefasst, da in dieser Arbeit die Relevanz der Alzheimerdiagnostik untersucht werden soll. Die ROC-Kurve zeigt einen leichten Ausschlag über die erste Winkelhalbierende (AUC=0,66) bei einer signifikanten Reduktion bei AD (95%-Konfidenzintervall 0,56–0,75; p=0,003) (Abb. 34). Aus der ROC-Kurve ist ersichtlich, dass die Sensitivität und Spezifität geringer ist als die der bestehenden Biomarker Amyloid β und Tau. Bei Kombination von Aβ und Tau ergeben sich eine Sensitivität von 86–92% und eine Spezifität von 89% (Sunderland et al. 2003, Engelborghs et al. 2009). Die Sensitivität und Spezifität von IL-8 sind vermutlich zu gering, um als Biomarker für die Alzheimerdiagnostik eingesetzt zu werden. Möglich wäre jedoch, dass die Kombination der Biomarker Amyloid β und Tau mit IL-8 zu einer höheren Sensitivität und/oder Spezifität führen würde. Um diese Hypothese zu bestätigen, wären jedoch noch weitere Studien mit AD und anderen neurologischen Erkrankungen nötig, denn es existieren bislang nur drei Studien.

Zwei Studien, die IL-8 im Liquor von Alzheimer-Demenz und Kontrollen untersucht haben, berichten von einem Anstieg von IL-8 im Liquor von Alzheimerpatienten (Galimberti et al. 2006 (AD: n=36, C: n=41), Zhang et al. 2008 (AD: n=48, C: n=95)). Weitere Ergebnisse einer kleinen Studie (AD: n=15, C: n=7) weisen auf gleichbleibende bzw. sehr gering verminderte IL-8 Konzentrationen im Liquor bei AD hin (Llano et al. 2011). Diese unterschiedlichen Ergebnisse können dadurch entstanden sein, dass Patienten nach unterschiedlichen Kriterien ausgesucht worden sind. Beispielsweise in der Studie von Jing Zhang et al. wiesen Patienten in der AD-Gruppe sehr hohe Tau Werte auf (Mittelwert:

1425,0 ± 104,3). Derart hohe Tau Werte wurden bisher auch bei demenziellen Patienten mit Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (Creutzfeldt-Jakob disease) gemessen (Otto et al. 1997). In der zweiten Studie von Daniela Galimberti et al. zeigte sich der deutlichste Anstieg für Patienten mit MCI, Patienten die in meiner Studie nicht untersucht wurden, wobei die Patienten hauptsächlich nach deren MMST eingestuft wurden und Liquor Parameter, wie Tau und Aβ, für die Selektion der Patienten vermutlich keine Bedeutung spielten (Galimberti et al. 2006). Derartige Unterschiede könnten die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Studien erklären.

Im Hirngewebe scheint auch dieses Interleukin bei AD im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht zu sein (Sokolova et al. 2009). Wie beim IL-6 ist unbekannt, warum die Interleukinwerte im Liquor eher erniedrigt sind und im Hirngewebe erhöht gefunden wurden. Sicherlich könnte es an einer strengen Regulierung der Hirn-Liquor-Schranke bei AD liegen, die ein Übertreten des IL-8 in den Liquor verhindert, jedoch müsste diese Theorie noch genauer untersucht werden und noch weitere Hirnlysat-Studien und Liquor-Studien durchgeführt werden.
Wie bereits beim IL-6 beschrieben, könnte eine Reduktion der IL-8 Konzentration im Liquor nun einerseits bedeuten, dass das Interleukin sowohl im Liquor, als auch im Hirn reduziert ist, andererseits könnte die Reduktion sich aber auch nur auf den Liquor beschränken und im Gehirn könnte die Konzentration gleichbleibend oder auch erhöht sein. Eine Reduktion im Gehirn, wie sie von mir im Liquor gefunden wurde, würde sehr gut zur Pathophysiologie der Alzheimer-Demenz passen, da dies zu einer verringerten Rekrutierung und Akkumulation von Astrozyten und Mikroglia um senile Plaques und somit zu verringerter Phagozytose von Aβ, also gesteigertem Aβ im Gehirn führen würde (Akiyama et al. 2000).

Im Serum zeigen sich in meiner Studie kaum Unterschiede zwischen AD und Kontrollen, was auf einen intrathekalen entzündlichen Prozess ohne systemische Beteiligung hindeutet. Dies bestätigt sich auch durch bereits publizierte Serum-AD-Studien, die ebenso wie in dieser Studie, größtenteils keine Veränderungen von IL-8 erkennen lassen (Galimberti et al. 2003, Choi et al. 2008, Bonotis et al. 2008). Lediglich eine Studie zeigt eine Steigerung (Corsi et al. 2011), wobei wiederum eine andere Publikation eine Reduktion von IL-8 im Serum zeigt (Kim et al. 2011). Aus den publizierten und von mir

gemessenen Daten lässt sich folgern, dass die Konzentration von IL-8 im Serum bei AD vermutlich gleich hoch ist wie bei Kontrollpatienten.

Letztendlich würde sich IL-8 im Liquor eher nicht als diagnostischer Biomarker der AD eignen, da IL-8 nicht nur bei Alzheimerpatienten sondern auch bei Depressionspatienten reduziert ist und somit wahrscheinlich nicht spezifisch für AD wäre. Dies müsste jedoch in weiteren Studien untersucht werden.

Bei Depressionspatienten ist eine signifikante Reduktion der IL-8 Serumkonzentration, im Vergleich zur Kontrollgruppe, erkennbar. Ein Übertreten des IL-8 von Liquor in das Serum oder umgekehrt ist eher unwahrscheinlich, da keine Korrelation zwischen Serum- und Liquorwerten besteht (siehe 4.2.3) und auch keine Korrelation, wenn nur Depressionspatienten betrachtet werden (Korrelation bei Depression Serum versus Liquor: -0,08 bei p=0,69, n=26). Durch die intrathekalen und systemischen IL-8 Konzentrationsänderungen könnte die Depression eine Erkrankung sein, die nicht allein das Gehirn betrifft. Vier bereits existierende Serum-Depression-Studien zeigen in einer Meta-Analyse jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Depression und Kontrollen (Dowlati et al. 2010). Eine Studie beschreibt, wie in meiner Arbeit, eine Reduktion, drei weitere eine Steigerung der IL-8 Konzentration bei Depressionspatienten (Dowlati et al. 2010).

4.2.1.4 Tumor-Nekrose-Faktor α

Tumor-Nekrose-Faktor α (TNFα) kennzeichnet sich durch gleiche Konzentrationen im Liquor bei Alzheimer- und Kontrollpatienten. Schon aus diesem Ergebnis kann man vermuten, dass sich TNFα nicht als diagnostischer Biomarker für die AD eignet. Dies bestätigt sich auch durch die zugehörige ROC-Kurve (Abb. 35).

Die TNFα Konzentrationen im Liquor bei Depressionspatienten kennzeichnen sich durch eine signifikante Reduktion im Verglich zur Kontrollgruppe. Da die Reduktion nur bei der Depression und nicht bei AD zu erkennen ist, könnte es sich um eine spezifische Veränderung bei Depressionspatienten handeln. Die dazugehörige ROC-Kurve, bei der nur Depression gegenüber Kontrollpatienten aufgetragen wurde, bestätigt die spezifische Veränderung mit einen deutlichen Ausschlag über die erste Winkelhalbierende (AUC=0,7) (Abb. 35). Zwei andere Studien, die TNFα bei Depressionspatienten im Liquor untersucht

haben, bestätigen diese Hypothese jedoch nicht. Sie beschreiben eine gleichbleibende TNFα Konzentration bei Depression und Kontrollen (Martinez et al. 2011, Levine et al. 1999). Gründe für die unterschiedlichen Studienergebnisse könnten, wie bereits bei IL-1β und IL-6 beschrieben (siehe 4.2.1.1 und 4.2.1.2), die geringen Fallzahlen sein oder auch die Auswahl der Patienten nach unterschiedlichen Parametern (siehe 4.2.1.5).

Bestehende Alzheimer-Liquor-Studien weisen bei TNFα unterschiedliche Ergebnisse auf. Zwei Studien beschreiben einen signifikanten Anstieg von TNFα im Liquor von AD im Vergleich zu Kontrollen (Tarkowski et al. 1999, Tarkowski et al. 2000). Eine weitere Studie beschreibt eine Reduktion von TNFα im Liquor bei AD (Richartz et al. 2005). Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten sich, wie bereits bei den anderen Zyto- und Chemokinen erläutert (siehe 4.2.1.1–4.2.1.3), aus den geringeren Fallzahlen gegenüber der von mir durchgeführten Studie oder der unterschiedlichen Auswahl der Patienten der Studien ergeben. Die Meta-Analyse dieser drei publizierten Studien ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen AD und Kontrollen, weshalb sich das Zytokin, wie bereits vermutet, nicht als diagnostischer Biomarker der AD eignen würde (Swardfager et al. 2010).

Im Hirngewebe wurden sowohl erhöhte TNFα Konzentrationen bei AD (Sokolova et al. 2009), als auch erniedrigte TNFα Konzentrationen im frontalen Kortex (32%, p=0.024), dem superioren temporalen Kortex (57%, p=0.021) und dem entorhinalen Kortex (49%, p=0.009) bei Alzheimerpatienten, im Vergleich zur Kontrollgruppe, gemessen (Lanzrein et al. 1998). Vermutlich wäre eine weitere größere Studie bezüglich der TNFα Konzentration im Hirngewebe sinnvoll, um genauere Aussagen zu machen, wie sich TNFα im Hirngewebe verhält. Aus den sich widersprechenden Publikationen lassen sich keine Rückschlüsse ziehen, ob ein Übertreten von TNFα über die Hirn-Liquor-Schranke möglich ist. Je nach tatsächlichem Verhalten des Zytokins im Gehirn, würden die neurotoxischen bzw. neuroprotektiven Eigenschaften an Bedeutung gewinnen (Abb. 7).

In den Serum TNFα Werten zeigen sich keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Bereits bestehende AD-Serum-Studien zeigen, im Gegensatz zu meiner Studie, eine leichte Steigerung der TNFα Konzentration im Serum bei AD (Swardfager et al. 2010). Ebenso wie bei IL-1β ist unbekannt, ob diese Steigerung durch einen Übertritt des TNFα aus dem Gehirn zustande kommt (siehe 4.2.3) oder es eine periphere entzündliche

Beteiligung der Erkrankung gibt. Auch Serum-Depression-Studien sprechen von einer leichten Steigerung des TNFα, wobei auch hier diverse Publikationen mit unterschiedlichen Ergebnissen bestehen (Howren et al. 2009, Dowlati et al. 2010).

Letztendlich kann aus dieser und den bereits publizierten Ergebnissen zusammengefasst werden, dass das TNFα sich weder im Liquor noch im Serum als Biomarker der Alzheimerdiagnostik eignen würde. Für die Depressionsdiagnostik wäre das TNFα im Liquor durchaus interessant, was jedoch in weiteren Studien untersucht werden müsste.

4.2.1.5 Unterschiedliche Liquor-Studienergebnisse

Bei allen der untersuchten Zyto- und Chemokinen unterscheiden sich die Ergebnisse der Liquor-Studien deutlich voneinander. Dies könnte, wie bereits in den einzelnen Kapiteln (siehe 4.2.1.1–4.2.1.4) erwähnt, an geringeren Fallzahlen der Studien oder auch an der unterschiedlichen Patientenauswahl nach Schweregrad der Erkrankung liegen. Ein weiterer Punkt, der zu den unterschiedlichen Studienergebnissen geführt haben könnte, ist die Prädiagnostik und der Umgang mit Liquor vor dessen Analyse. Beispielsweise, wie der Liquor zentrifugiert, aufbewahrt, eingefroren und während der Versuche behandelt wurde. Dies konnte aus den jeweiligen Publikationen meist nicht eruiert werden.

Weiterhin ist der Zeitpunkt der Lumbalpunktion für die jeweiligen Konzentrationen entscheidend. Sehr wahrscheinlich schwankten proinflammatorische Zyto- und Chemokine nach einer zirkadianen Rhythmik (Llano et al. 2011). Daher wäre es für zukünftige Studien sinnvoll, die Tageszeit der Lumbalpunktion gleich zu wählen.

Unterschiedliche Ergebnisse der Depression-Studien, sowohl bei Liquor als auch bei Serum, könnten dadurch bedingt sein, dass die Kontrollpatienten in dieser Studie passend zu den Alzheimerpatienten ausgewählt wurden und daher generell älter als die untersuchten Depressionspatienten sind. Depressionspatienten sind im Schnitt ca. 12 Jahre jünger als die Alzheimer- und Kontrollpatienten, da die Erkrankung Depression deutlich früher auftritt als eine Alzheimer-Demenz (durchschnittliches Erkrankungsalter der Depression: 30.–40. Lebensjahr). Sehr große Auswirkungen kann dieser Aspekt jedoch nicht haben, da keine Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und den Konzentrationen der Zyto- und Chemokine besteht (siehe 3.2.3).

Ein weiterer Aspekt, der Einfluss auf die Depression-Studien haben könnte, ist der Affekt des Patienten zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion, ob der Patient sich direkt in einer depressiven Phase, am Beginn bzw. am Ende einer depressiven Phase oder sogar in einer Phase ohne Depressionen befindet. Ob sich die Stärke der Entzündung, also die Konzentration verschiedener Zyto- und Chemokine, je nach Phase einer Depression verändert, wäre ein interessanter Aspekt für zukünftige Studien.

4.2.2 Korrelationen der Zyto- und Chemokine mit verschiedenen Parametern

Um die Zyto- und Chemokinveränderungen im Liquor und die daraus folgende entzündliche Reaktion im Gehirn mit der Erkrankung Alzheimer-Demenz in Zusammenhang zu bringen, wurden die gemessenen Zyto- und Chemokinkonzentrationen mit verschiedenen patientenspezifischen Parametern korreliert. Es zeigen sich signifikante Korrelationen von IL-1β mit Tau, Aβ und dem Mini-Mental-Status-Test (MMST) (Abb. 37). Hohe Tau Werte und niedrige Aβ Werte im Liquor sprechen für die Erkrankung AD (Andreasen et al. 2003, Lo et al. 2011). Umso höher die Tau Werte und umso niedriger die Aβ Werte, desto höher sind auch die IL-1β Werte (Abb. 37). Dies könnte bedeuten, dass sich bei Progression der Erkrankung nicht nur Tau und Aβ weiter verändern, sondern auch die Entzündung im Gehirn weiter zunimmt (Griffin 2006) (Abb. 40). Dieser Zusammenhang, dass sich diese pathologischen Mechanismen gegenseitig beeinflussen, findet sich auch in bereits publizierten Daten: IL-1β führt einerseits zu verstärkter APP-Sekretion und somit zur vermehrten Aβ Produktion, Ablagerung und Plaqueformation (Griffin 2006, Griffin et al. 2000) und andererseits zur Überexpression und Phosphorylierung von Tau (Sheng et al. 2000). Klinisch zeigt sich der Zusammenhang von verminderten kognitiven Fähigkeiten und Entzündung im Gehirn durch die signifikante Korrelation zwischen IL-1β und MMST (Abb. 37, Abb. 40). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass IL-1β als Verlaufsbiomarker oder als früher Biomarker eingesetzt werden könnte. Weitere Studien mit MCI Patienten (Mild Cognitive Impairment, leichte kognitive Beeinträchtigung) und Alzheimerpatienten in unterschiedlichen Stadien könnten durchaus interessante Ergebnisse liefern.

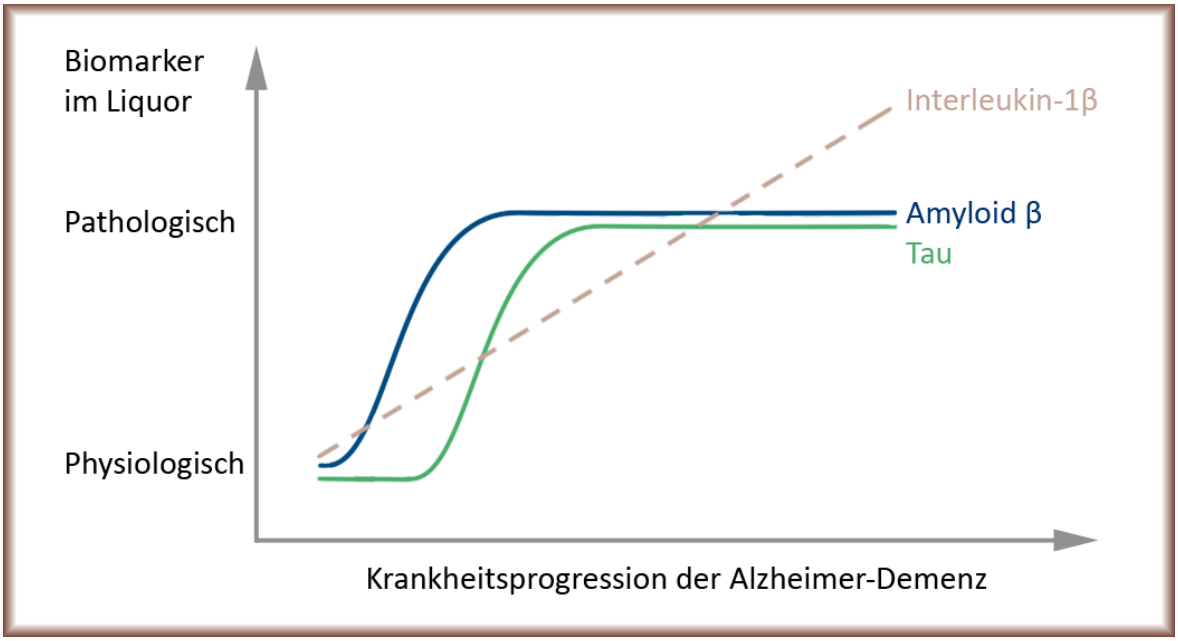

Abb. 40 Pathophysiologische Proteinveränderungen im Liquor im Krankheitsprogress der Alzheimer-Demenz. *Die gestrichelte Linie zeigt, wie sich Interleukin-1ß möglicherweise im Krankheitsprogress verhalten könnte, da das Interleukin-1ß mit dem Mini-Mental-Status-Test, also der kognitiven Funktion der Erkrankten, korreliert. Dies würde bedeuten, dass sich Interleukin-1ß eventuell als Verlaufsbiomarker eignen würde (Daten bezüglich Amyloid ß und Tau aus Jack et al. 2010).*

4.2.3 Korrelationen der Zyto- und Chemokine zwischen den Liquor- und Serumwerten derselben Patienten

Zytokine können die Blut-Hirn-Schranke passieren (Banks et al. 1995), wobei sowohl die klinische Bedeutung als auch der spezielle Vorgang der Passage der Proteine (siehe 1.1) noch nicht vollständig geklärt sind. Gesichert ist jedoch, dass es sich um einen sättigbaren Transportmechanismus (saturable transport mechanism) handelt (Banks et al. 1995). Dementsprechend kann sowohl das IL-1β (Skinner et al. 2009), als auch das IL-6 (Banks et al. 1994) und TNFα (Gutierrez et al. 1993) über die Blut-Hirn-Schranke gelangen. Letztendlich handelt es sich aber vermutlich um sehr geringe Mengen, da beispielsweise von intravenös appliziertem radioaktiv markiertem IL-6 nur etwa 0,2% das Gehirn erreichen (Banks et al. 1994). Weiterhin geht man davon aus, dass 99% des IL-6 und 94% des TNFα der im Liquor befindlichen Zytokine aus einer intrathekalen Synthese hervorgehen (Tumani et al. 2005). Das einzige von mir untersuchte Zytokin, welches entsprechend seiner Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, auch tatsächlich zwischen Liquor- und Serumkonzentration korreliert, ist das IL-6 (siehe 3.2.4). Alle

weiteren untersuchten Zyto- und Chemokine (IL-1β, IL-8, TNFα) zeigen keine Korrelation zwischen Liquor- und Serumwerten, woraus sich schließen lässt, dass deren Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu passieren zwar möglicherweise vorhanden, aber vermutlich sehr gering ist. Trotz fehlender Studien der Passage von IL-8 über die Blut-Hirn-Schranke kann davon ausgegangen werden, dass diese Fähigkeit sehr gering ist und deren Relevanz bei der Konzentrationsreduktion bei AD und Depression im Liquor verschwindend gering ist. Auch für IL-1β scheint die Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke passieren zu können, keine große Relevanz für die Konzentrationssteigerung bei AD zu haben.

4.2.4 Korrelationen der Zyto- und Chemokine untereinander bei denselben Patienten

Einer der Vorteile vier Zyto- und Chemokine gleichzeitig untersucht zu haben ist, dass die Zyto- und Chemokine untereinander korreliert werden können, um deren Zusammenhang zu erfassen. Die untersuchten Zyto- und Chemokine beeinflussen sich im Hirn gegenseitig. IL-1β und TNFα stimulieren Hirnzellen, hauptsächlich Astrozyten und Mikroglia, zur Synthese von IL-6 und IL-8 (Abb. 41) (Aloisi et al. 1992). Diese Zusammenhänge lassen sich auch im Liquor durch deren Korrelation nachweisen: IL-1β und IL-6, IL-6 und IL-8, IL-6 und TNFα, IL-8 und TNFα (Tab. 26, Abb. 41). Die Korrelation zwischen IL-6 und IL-8 kommt vermutlich dadurch zustande, dass die Synthese beider Interleukine durch IL-1β bzw. TNFα stimuliert wird und sich dadurch beide Interleukine zwangsläufig gleichmäßig verändern. Diese gleichsinnige Veränderung erkennt man auch an deren analogen Reduktion im Liquor bei AD und Depression im Vergleich zu Kontrollen (Abb. 32).

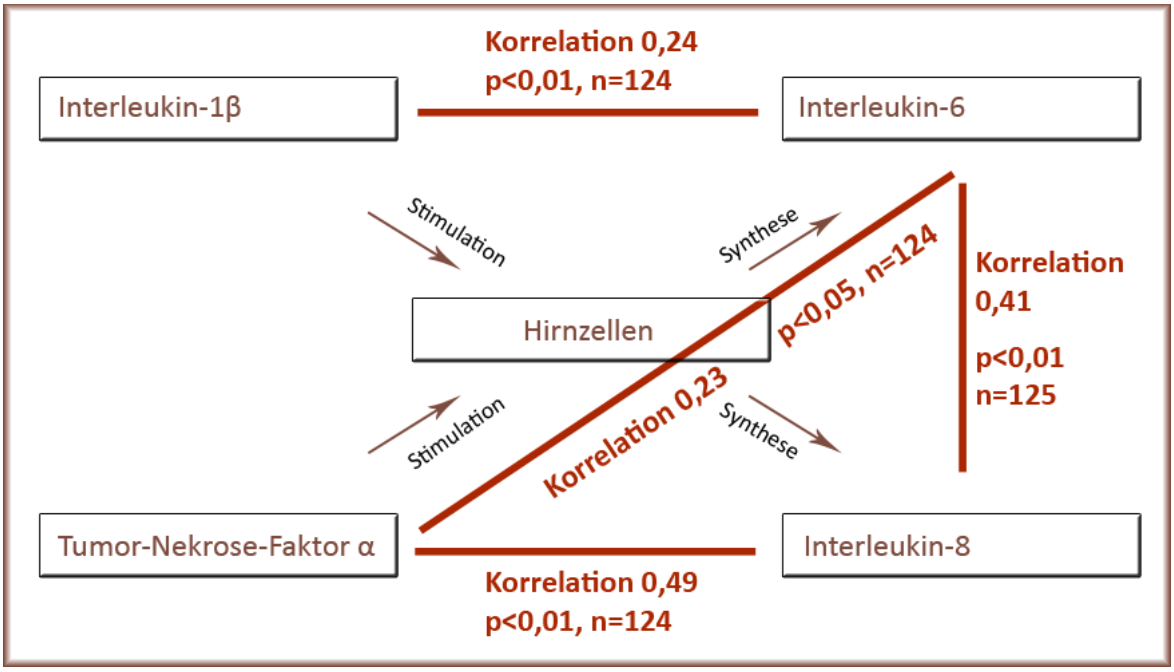

Abb. 41 Korrelationen der Zyto- und Chemokine im Liquor untereinander.
Signifikante Korrelation (p<0,05), Fallzahl (n).

Diese Erkenntnisse könnten in Zukunft Einfluss auf eine mögliche antiinflammatorische Therapie haben. Aufgrund dieser Ergebnisse müsste eventuell in einer zukünftigen Therapie nur in das IL-1β bzw. TNFα eingegriffen werden, da sich IL-6 und IL-8 vermutlich entsprechend der veränderten IL-1β bzw. TNFα Konzentrationen anpassen würden.

4.3 Wurde ein neuer Biomarker für die Alzheimer-Demenz gefunden?

Das Hauptziel dieser Arbeit ist die Suche nach neuen Biomarkern für die Alzheimerdiagnostik, da eine frühe Diagnose und Therapie die Prognose einiger Alzheimerpatienten verbessern könnte. Von den fünf untersuchten Proteinen (Picalm, IL-1β, IL-6, IL-8 und TNFα) wäre das Interleukin-1β als alleiniger Biomarker der Alzheimerdiagnostik im Liquor vermutlich nur begrenzt verwendbar, da sich keine signifikanten Ergebnisse zeigten. Möglicherweise aber würde IL-1β durch Kombination mit Aβ und Tau deren Sensitivität und Spezifität weiter steigern.

Neben Alzheimerpatienten wurden Depressionspatienten untersucht, um erste Hinweise zu erhalten, ob Konzentrationsveränderungen der Zyto- und Chemokine auch bei anderen neurologischen Erkrankungen auftreten. Alzheimerpatienten zeigen gesteigerte Konzentrationen von Interleukin-1β im Liquor verglichen mit Kontrollpatienten. Depressionspatienten weisen ähnliche Werte wie Kontrollpatienten auf, weshalb der Konzentrationsanstieg bei Alzheimerpatienten möglicherweise spezifisch für AD sein könnte. Um von einem spezifischen Konzentrationsanstieg von IL-1β im Liquor bei AD zu sprechen, wären noch mehrere unabhängige Studien und auch Untersuchungen anderer demenzieller und neurologischer Erkrankungen nötig.

Weiterhin zeigen sich signifikante Korrelationen von IL-1β mit den Konzentrationen der Biomarker Tau und Aβ derselben Patienten, was für eine gegenseitige Beeinflussung der pathologischen Mechanismen von Tau und Aβ mit der chronischen Entzündung bei AD spricht.

Ein klinischer Zusammenhang von verminderter kognitiver Leistung und Entzündung im Gehirn bei AD zeigt sich durch die signifikante Korrelation zwischen IL-1β und dem Mini-Mental-Status-Test der Patienten. Aus diesem Grund könnte IL-1β möglicherweise als Verlaufsparameter der Alzheimer-Demenz fungieren. Bisher gibt es keine apparative Progressdiagnostik für Alzheimerpatienten, sondern nur klinische Beurteilungen mittels kognitiver Tests. Diese Funktion von IL-1β als Verlaufsparameter müsste in weiteren Studien untersucht werden.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit scheint Interleukin-1β in der Pathophysiologie der Alzheimer-Demenz eine bedeutende Rolle zu spielen und könnte als potenzieller Biomarker in Kombination mit Aβ und Tau oder als Verlaufsparameter der AD in Frage kommen.

5 Zusammenfassung

Demenz-Erkrankungen zählen mit etwa 36 Millionen Menschen weltweit zu den häufigsten Erkrankungen des höheren Lebensalters, wobei ein Großteil hiervon der Alzheimer-Demenz (AD) zuzuschreiben ist. Die meisten Alzheimerpatienten leiden an der sporadischen Form der AD, bei welcher Polymorphismen in Genen von Picalm, Interleukin-1β (IL-1β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNFα) gefunden wurden. Picalm ist ein Schlüsselelement der Clathrin vermittelten Endozytose und daher für Transportvorgänge im Gehirn verantwortlich. Die Zyto- und Chemokine (IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα) hingegen regulieren unter anderem die chronische Entzündung im Gehirn bei AD. In dieser Arbeit wurden die Konzentrationen dieser fünf Proteine im Liquor cerebrospinalis (Liquor) bei Alzheimerpatienten im Vergleich zu depressiven und Kontrollpatienten untersucht, um bei Konzentrations-unterschieden eventuell als neue diagnostische Biomarker zu fungieren.

Das Hauptziel dieser Arbeit ist somit die Suche nach neuen Biomarkern für die Alzheimerdiagnostik. Die Messungen der depressiven Patienten sollen erste Hinweise liefern, ob Veränderungen auch bei anderen Erkrankungen des Gehirns zu finden sind.

Um Picalm im Liquor nachweisen zu können, wurden verschiedene Western Blots durchgeführt. Doch selbst nach Aufkonzentrieren von Picalm im Liquor mittels Immunpräzipitation konnte das Protein nicht detektiert werden, woraus sich schließen lässt, dass Picalm nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen im Liquor vorhanden ist. Picalm eignet sich daher vermutlich nicht als Biomarker der Alzheimerdiagnostik. Das IL-1β ist das einzige untersuchte Interleukin, welches im Liquor bei AD im Vergleich zu depressiven und Kontrollpatienten ansteigt. Der IL-1β Anstieg könnte spezifisch für AD sein, da kein Anstieg bei depressiven Patienten zu erkennen ist. IL-6, IL-8 und TNFα kennzeichnen sich durch eine tendenzielle oder signifikante Reduktion der Konzentration im Liquor bei AD und bei Depression im Vergleich zu Kontrollpatienten. Da die Reduktionen bei beiden Erkrankungen erkennbar sind, handelt es sich wahrscheinlich nicht um spezifische Veränderungen der AD. Von den fünf untersuchten Proteinen könnte das IL-1β im Liquor als potenzieller Biomarker in Kombination mit Aβ und Tau oder als Verlaufsparameter der AD fungieren. Hierfür wären weitere unabhängige Studien mit Alzheimerpatienten und anderen demenziellen und neurologischen Erkrankungen nötig.

6 Literaturverzeichnis

1. Akira S, Taga T, Kishimoto T: Interleukin-6 in biology and medicine. Adv.Immunol., 54: 1-78 (1993)
2. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole G M, Cooper N R, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich B L, Finch C E, Frautschy S, Griffin W S, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie I R, McGeer P L, O'Banion M K, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel F L, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T: Inflammation and Alzheimer's disease. Neurobiol.Aging, 21: 383-421 (2000)
3. Aloisi F, Care A, Borsellino G, Gallo P, Rosa S, Bassani A, Cabibbo A, Testa U, Levi G, Peschle C: Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. J.Immunol., 149: 2358-2366 (1992)
4. Alzheimer A: Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. [An unusual illness of the cerebral cortex.]. Allgemeine Zeitschr.Psychisch-Gerichtliche Medizin, 64: 146–148 [in German] (1907)
5. American Health Assistance Foundation: http://www.ahaf.org/alzheimers/about/understanding/plaques-and-tangles.html (2012) (Downloaddatum: 04.06.2012)
6. Andreasen N, Sjogren M, Blennow K: CSF markers for Alzheimer's disease: total tau, phospho-tau and Abeta42. World J.Biol.Psychiatry, 4: 147-155 (2003)
7. Bai Y, Markham K, Chen F, Weerasekera R, Watts J, Horne P, Wakutani Y, Bagshaw R, Mathews P M, Fraser P E, Westaway D, St George-Hyslop P, Schmitt-Ulms G: The in vivo brain interactome of the amyloid precursor protein. Mol.Cell Proteomics, 7: 15-34 (2008)
8. Baig S, Joseph S A, Tayler H, Abraham R, Owen M J, Williams J, Kehoe P G, Love S: Distribution and Expression of Picalm in Alzheimer Disease. J.Neuropathol.Exp.Neurol., 69: 1071-1077 (2010)
9. Banks W A, Kastin A J, Gutierrez E G: Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. Neurosci.Lett., 179: 53-56 (1994)
10. Banks W A, Kastin A J, Broadwell R D: Passage of cytokines across the blood-brain barrier. Neuroimmunomodulation, 2: 241-248 (1995)
11. Bertram L, Lill C M, Tanzi R E: The genetics of Alzheimer disease: back to the future. Neuron, 68: 270-281 (2010)
12. Blasko I, Marx F, Steiner E, Hartmann T, Grubeck-Loebenstein B: TNFalpha plus IFNgamma induce the production of Alzheimer beta-amyloid peptides and decrease the secretion of APPs. FASEB J., 13: 63-68 (1999)
13. Blum-Degena D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P: Interleukin-1 [beta] and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. Neurosci.Lett., 202: 17-20 (1995)

14. Bonotis K, Krikki E, Holeva V, Aggouridaki C, Costa V, Baloyannis S: Systemic immune aberrations in Alzheimer's disease patients. J.Neuroimmunol., 193: 183-187 (2008)
15. Borroni B, Malinverno M, Gardoni F, Alberici A, Parnetti L, Premi E, Bonuccelli U, Grassi M, Perani D, Calabresi P, Di Luca M, Padovani A: Tau forms in CSF as a reliable biomarker for progressive supranuclear palsy. Neurology., 71: 1796-1803 (2008)
16. Borroni B, Gardoni F, Parnetti L, Magno L, Malinverno M, Saggese E, Calabresi P, Spillantini MG, Padovani A, Di Luca M: Pattern of Tau forms in CSF is altered in progressive supranuclear palsy. Neurobiol.Aging, 30: 34-40 (2009)
17. Buerger K, Ewers M, Pirttila T, Zinkowski R, Alafuzoff I, Teipel S J, DeBernardis J, Kerkman D, McCulloch C, Soininen H, Hampel H: CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. Brain, 129: 3035-3041 (2006)
18. Carey R M, Balcz B A, Lopez-Coviella I, Slack B E: Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. BMC Cell Biol., 6: 30 (2005)
19. Chakrabarty P, Jansen-West K, Beccard A, Ceballos-Diaz C, Levites Y, Verbeeck C, Zubair A C, Dickson D, Golde T E, Das P: Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses Abeta deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. FASEB J., 24: 548-559 (2010)
20. Choi C, Jeong J H, Jang J S, Choi K, Lee J, Kwon J, Choi K G, Lee J S, Kang S W: Multiplex analysis of cytokines in the serum and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by color-coded bead technology. J Clin Neurol, 4: 84-88 (2008)
21. Collins J S, Perry R T, Watson B,Jr, Harrell L E, Acton R T, Blacker D, Albert M S, Tanzi R E, Bassett S S, McInnis M G, Campbell R D, Go R C: Association of a haplotype for tumor necrosis factor in siblings with late-onset Alzheimer disease: the NIMH Alzheimer Disease Genetics Initiative. Am.J.Med.Genet., 96: 823-830 (2000)
22. Corsi M M, Licastro F, Porcellini E, Dogliotti G, Galliera E, Lamont J L, Innocenzi P J, Fitzgerald S P: Reduced plasma levels of P-selectin and L-selectin in a pilot study from Alzheimer disease: relationship with neuro-degeneration. Biogerontology, 12: 451-454 (2011)
23. Dejana E, Zanetti A, Del Maschio A: Adhesive proteins at endothelial cell-to-cell junctions and leukocyte extravasation. Haemostasis, 26: 210-219 (1996)
24. Dell'Angelica E C: Clathrin-binding proteins: got a motif? Join the network! Trends Cell Biol., 11: 315-318 (2001)
25. Deuschl G (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN)), Maier W (Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde (DGPPN)) http://www.dgn.org/images/stories/dgn/leitlinien/ll_demenz/ll-demenz-kurz-170210.pdf (2009) (Downloaddatum: 04.06.2012)
26. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim E K, Lanctot K L: A meta-analysis of cytokines in major depression. Biol.Psychiatry, 67: 446-457 (2010)
27. Dreyling M H, Martinez-Climent J A, Zheng M, Mao J, Rowley J D, Bohlander S K: The t(10;11)(p13;q14) in the U937 cell line results in the fusion of the AF10 gene and

CALM, encoding a new member of the AP-3 clathrin assembly protein family. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 93: 4804-4809 (1996)

28. Duyckaerts C, Potier M C, Delatour B: Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. Acta Neuropathol., 115: 5-38 (2008)
29. von Einem: Modulation of amyloid precursor protein (APP) and β-site of APP cleaving enzyme 1 (BASE1) intracellular transport and its influence on APP processing in Alzheimer's disease. Rer nat Dissertation, Universität Ulm (2010)
30. Engelborghs S, De Vreese K, Van de Casteele T, Vanderstichele H, Van Everbroeck B, Cras P, Martin JJ, Vanmechelen E, De Deyn PP: Diagnostic performance of a CSF-biomarker panel in autopsy-confirmed dementia. Neurobiol.Aging, 29: 1143-1159 (2009)
31. Fagan A M, Mintun M A, Mach R H, Lee S Y, Dence C S, Shah A R, LaRossa G N, Spinner M L, Klunk W E, Mathis C A, DeKosky S T, Morris J C, Holtzman D M: Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. Ann.Neurol., 59: 512-519 (2006)
32. Farrer L A, Cupples L A, Haines J L, Hyman B, Kukull W A, Mayeux R, Myers R H, Pericak-Vance M A, Risch N, van Duijn C M: Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. JAMA, 278: 1349-1356 (1997)
33 Felgenhauer K: The filtration concept of the blood-CSF barrier as basis for the differentiation of CSF proteins. In: Greenwood J, Begley D J, Segal M B (Hrsg) New Concepts of a blood-brain barrier, Plenum Press New York, Seite 209-217 (1995)
34. Ferger AI, Campanelli L, Reimer V, Muth KN, Merdian I, Ludolph AC, Witting A: Effects of mitochondrial dysfunction on the immunological properties of microglia. J Neuroinflammation, 7: 45 (2010)
35. Fitzjohn S M, Morton R A, Kuenzi F, Rosahl T W, Shearman M, Lewis H, Smith D, Reynolds D S, Davies C H, Collingridge G L, Seabrook G R: Age-related impairment of synaptic transmission but normal long-term potentiation in transgenic mice that overexpress the human APP695SWE mutant form of amyloid precursor protein. J.Neurosci., 21: 4691-4698 (2001)
36. Forstl H, Kurz A: Clinical features of Alzheimer's disease. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 249: 288-290 (1999)
37. Gadient R A, Otten U H: Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. Prog.Neurobiol., 52: 379-390 (1997)
38. Galimberti D, Schoonenboom N, Scarpini E, Scheltens P, Dutch-Italian Alzheimer Research Group: Chemokines in serum and cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. Ann.Neurol., 53: 547-548 (2003)
39. Galimberti D, Schoonenboom N, Scheltens P, Fenoglio C, Bouwman F, Venturelli E, Guidi I, Blankenstein M A, Bresolin N, Scarpini E: Intrathecal chemokine synthesis in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. Arch.Neurol., 63: 538-543 (2006)

40. Galimberti D, Venturelli E, Fenoglio C, Guidi I, Villa C, Bergamaschini L, Cortini F, Scalabrini D, Baron P, Vergani C, Bresolin N, Scarpini E: Intrathecal levels of IL-6, IL-11 and LIF in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. J.Neurol., 255: 539-544 (2008)
41. Galimberti D, Scarpini E: Inflammation and oxidative damage in Alzheimer's disease: friend or foe? Front Biosci (Schol Ed), 3: 252-266 (2011)
42. Gearing AJ, Thorpe SJ, Miller K, Mangan M, Varley PG, Dudgeon T, Ward G, Turner C, Thorpe R: Selective cleavage of human IgG by the matrix metalloproteinases, matrilysin and stromelysin. Immunol Lett., 81: 41-48 (2002)
43. Gitter B D, Cox L M, Rydel R E, May P C: Amyloid beta peptide potentiates cytokine secretion by interleukin-1 beta-activated human astrocytoma cells. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 92: 10738-10741 (1995)
44. Gitter B D, Boggs L N, May P C, Czilli D L, Carlson C D: Regulation of cytokine secretion and amyloid precursor protein processing by proinflammatory amyloid beta (A beta). Ann.N.Y.Acad.Sci., 917: 154-164 (2000)
45. Gomann E M: Alzheimer – „Die Krankheit des Vergessens“ http://znspotsdamregio.de /fachartikel/alzheimer (2010) (Downloaddatum: 06.06.2012)
46. Gomez-Tortosa E, Gonzalo I, Fanjul S, Sainz M J, Cantarero S, Cemillan C, Yebenes J G, del Ser T: Cerebrospinal fluid markers in dementia with lewy bodies compared with Alzheimer disease. Arch.Neurol., 60: 1218-1222 (2003)
47. Griffin W S, Stanley L C, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot L J, White C L,3rd, Araoz C: Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 86: 7611-7615 (1989)
48. Griffin W S, Nicoll J A, Grimaldi L M, Sheng J G, Mrak R E: The pervasiveness of interleukin-1 in alzheimer pathogenesis: a role for specific polymorphisms in disease risk. Exp.Gerontol., 35: 481-487 (2000)
49. Griffin W S: Inflammation and neurodegenerative diseases. Am.J.Clin.Nutr., 83: 470S-474S (2006)
50. Gutierrez E G, Banks W A, Kastin A J: Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. J.Neuroimmunol., 47: 169-176 (1993)
51. Hampel H, Schoen D, Schwarz M J, Kotter H U, Schneider C, Sunderland T, Dukoff R, Levy J, Padberg F, Stubner S, Buch K, Muller N, Moller H J: Interleukin-6 is not altered in cerebrospinal fluid of first-degree relatives and patients with Alzheimer's disease. Neurosci.Lett., 228: 143-146 (1997)
52. Harel A, Wu F, Mattson M P, Morris C M, Yao P J: Evidence for CALM in directing VAMP2 trafficking. Traffic, 9: 417-429 (2008)
53. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere M L, Pahwa J S, Moskvina V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan A R, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton M K, Brayne C, Rubinsztein D C, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown K S, Passmore P A, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith A D, Love S, Kehoe P G, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schurmann B, van den Bussche H, Heuser I,

Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frolich L, Hampel H, Hull M, Rujescu D, Goate A M, Kauwe J S, Cruchaga C, Nowotny P, Morris J C, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn P P, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass N J, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw C E, Tsolaki M, Singleton A B, Guerreiro R, Muhleisen T W, Nothen M M, Moebus S, Jockel K H, Klopp N, Wichmann H E, Carrasquillo M M, Pankratz V S, Younkin S G, Holmans P A, O'Donovan M, Owen M J, Williams J: Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. Nat.Genet., 41: 1088-1093 (2009)

54. Hashimoto P H: Blood-brain barrier and cerebrospinal fluid circulation. Kaibogaku Zasshi, 67: 595-605 (1992)
55. Hellrung: Modulation of the APP processing by transport and adaptor proteins. Thesis zur Erlangung des Master of Science, Universität Ulm (2010)
56. Howren M B, Lamkin D M, Suls J: Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. Psychosom Med, 71: 171-186 (2009)
57. Infante J, Sanz C, Fernandez-Luna J L, Llorca J, Berciano J, Combarros O: Gene-gene interaction between interleukin-1A and interleukin-8 increases Alzheimer's disease risk. J.Neurol., 251: 482-483 (2004)
58. Innogenetics Biotechnology for Healthcare http://www.innogenetics.com (2010) (Downloaddatum: 01.06.2011)
59. Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ: Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. Lancet Neurol, 9: 119-128 (2010)
60. Jorm A F: Is depression a risk factor for dementia or cognitive decline? A review. Gerontology, 46: 219-227 (2000)
61. Kang J, Lemaire H, Unterbeck A, Salbaum J M, Masters C L, Grzeschik K, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B: The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature, 325: 733-736 (1987)
62. Kim J A, Kim H L: Cleavage of purified neuronal clathrin assembly protein (CALM) by caspase 3 and calpain. Exp.Mol.Med., 33: 245-250 (2001)
63. Kim S M, Song J, Kim S, Han C, Park M H, Koh Y, Jo S A, Kim Y Y: Identification of peripheral inflammatory markers between normal control and Alzheimer's disease. BMC Neurol, 11: 51 (2011)
64. Koo E H, Squazzo S L: Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. J.Biol.Chem., 269: 17386-17389 (1994)
65. Kuiperij HB, Verbeek MM: Diagnosis of progressive supranuclear palsy: can measurement of tau forms help? Neurobiol.Aging, 33: 204.e17-204.e18 (2012)
66. Kumar S, Walter J: Phosphorylation of amyloid beta (Abeta) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. Aging (Albany NY), 3: 803-812 (2011)
67. Kumar V, Robbins S L, Abbas A K, Fausto N, Mitchell R S: Robbins basic pathology. 4. Aufl., Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA, (2007)

68. Lanzrein A S, Johnston C M, Perry V H, Jobst K A, King E M, Smith A D: Longitudinal study of inflammatory factors in serum, cerebrospinal fluid, and brain tissue in Alzheimer disease: interleukin-1beta, interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist, tumor necrosis factor-alpha, the soluble tumor necrosis factor receptors I and II, and alpha1-antichymotrypsin. Alzheimer Dis Assoc Disord, 12: 215-227 (1998)
69. Leonard B E: Inflammation, depression and dementia: are they connected? Neurochem.Res., 32: 1749-1756 (2007)
70. Levine J, Barak Y, Chengappa K N, Rapoport A, Rebey M, Barak V: Cerebrospinal cytokine levels in patients with acute depression. Neuropsychobiology, 40: 171-176 (1999)
71. Li K, Liu S, Yao S, Wang B, Dai D, Yao L: Interaction between interleukin-8 and methylenetetrahydrofolate reductase genes modulates Alzheimer's disease risk. Dement Geriatr Cogn Disord, 27: 286-291 (2009)
72. Li Y, Liu L, Kang J, Sheng J G, Barger S W, Mrak R E, Griffin W S: Neuronal-glial interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression. J.Neurosci., 20: 149-155 (2000)
73. Lin H B, Yang X M, Li T J, Cheng Y F, Zhang H T, Xu J P: Memory deficits and neurochemical changes induced by C-reactive protein in rats: implication in Alzheimer’s disease. Psychopharmacology (Berl.), 204: 705-714 (2009)
74. Llano D A, Li J, Waring J F, Ellis T, Devanarayan V, Witte D G, Lenz R A: Cerebrospinal Fluid Cytokine Dynamics Differ Between Alzheimer Disease Patients and Elderly Controls. Alzheimer Dis Assoc Disord, [Epub ahead of print] (2011)
75. Lo R Y, Hubbard A E, Shaw L M, Trojanowski J Q, Petersen R C, Aisen P S, Weiner M W, Jagust W J, for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: Longitudinal Change of Biomarkers in Cognitive Decline. Arch.Neurol., 68(10): 1257-1266 (2011)
76. Mao Y, Chen J, Maynard J A, Zhang B, Quiocho F A: A novel all helix fold of the AP180 amino-terminal domain for phosphoinositide binding and clathrin assembly in synaptic vesicle endocytosis. Cell, 104: 433-440 (2001)
77. Marsh M, McMahon H T: The structural era of endocytosis. Science, 285: 215-220 (1999)
78. Martinez J M, Garakani A, Yehuda R, Gorman J M: Proinflammatory and "resiliency" proteins in the CSF of patients with major depression. Depress Anxiety, 29: 32-38 (2012)
79. Martinez M, Fernandez-Vivancos E, Frank A, De la Fuente M, Hernanz A: Increased cerebrospinal fluid fas (Apo-1) levels in Alzheimer's disease. Relationship with IL-6 concentrations. Brain Res., 869: 216-219 (2000)
80. März P, Heese K, Hock C, Golombowski S, Müller-Spahn F, Rose-John S, Otten U: Interleukin-6 (IL-6) and soluble forms of IL-6 receptors are not altered in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. Neurosci.Lett., 239: 29-32 (1997)
81. Maurer K, Volk S, Gerbaldo H: Auguste D and Alzheimer's disease. Lancet, 349: 1546-1549 (1997)

82. McGeer PL, McGeer EG: Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. J. Neurovirol., 8: 529-538 (2002)
83. Meso Scale Discovery MULTI-SPOT® Assay System, Human ProInflammatory II 4-Plex Assay, Ultra-Sensitive Kit: http://www.mesoscale.com (2010) (Downloaddatum: 08.12.2010)
84. Miller S E, Sahlender D A, Graham S C, Honing S, Robinson M S, Peden A A, Owen D J: The Molecular Basis for the Endocytosis of Small R-SNAREs by the Clathrin Adaptor CALM. Cell, 147: 1118-1131 (2011)
85. Mrak R E, Griffin W S: Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. Neurobiol.Aging, 22: 903-908 (2001)
86. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8301 (2012) (Downloaddatum: 14.06.2012)
87. OriGene, TrueClone™ Human Full-Length cDNA Clones: http://www.origene.com/cdna/trueclone/vectors.mspx (2013) (Downloaddatum: 07.08.2013)
88. Otto M, Wiltfang J, Tumani H, Zerr I, Lantsch M, Kornhuber J, Weber T, Kretzschmar H A, Poser S: Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. Neurosci.Lett., 225: 210-212 (1997)
89. Papassotiropoulos A, Bagli M, Jessen F, Bayer T A, Maier W, Rao M L, Heun R: A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease. Ann.Neurol., 45: 666-668 (1999)
90. Prince M: World Alzheimer Report 2011 | Alzheimer's Disease International. http://www.alz.co.uk/research/Weltalzheimerbericht2011.pdf (2011) (06.06.2012)
91. Redzic Z: Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences Fluids Barriers CNS, 8: 3 (2011)
92. Reiber H: Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)--a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. J.Neurol.Sci., 122: 189-203 (1994)
93. Reiber H: Blut-Liquor-Schrankenfunktion und Liquorfluß. In: Zettl U K, Lehmitz L, Mix E (Hrsg) Klinische Liquordiagnostik (German Edition), 2. Aufl., Gruyter, Seite 58-74 (2005)
94. Richartz E, Stransky E, Batra A, Simon P, Lewczuk P, Buchkremer G, Bartels M, Schott K: Decline of immune responsiveness: a pathogenetic factor in Alzheimer's disease? J Psychiatr Res, 39: 535-543 (2005)
95. Rosler N, Wichart I, Jellinger K A: Intra vitam lumbar and post mortem ventricular cerebrospinal fluid immunoreactive interleukin-6 in Alzheimer's disease patients. Acta Neurol.Scand., 103: 126-130 (2001)
96. Rothwell N J, Luheshi G N: Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. Trends Neurosci., 23: 618-625 (2000)
97. Rubin L L, Staddon J M: The cell biology of the blood-brain barrier. Annu.Rev.Neurosci., 22: 11-28 (1999)

98. Rudinskiy N, Grishchuk Y, Vaslin A, Puyal J, Delacourte A, Hirling H, Clarke P G, Luthi-Carter R: Calpain hydrolysis of alpha- and beta2-adaptins decreases clathrin-dependent endocytosis and may promote neurodegeneration. J.Biol.Chem., 284: 12447-12458 (2009)

99. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt S C, Kakol J M, Stein L D, Marth G, Sherry S, Mullikin J C, Mortimore B J, Willey D L, Hunt S E, Cole C G, Coggill P C, Rice C M, Ning Z, Rogers J, Bentley D R, Kwok P Y, Mardis E R, Yeh R T, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston R H, McPherson J D, Gilman B, Schaffner S, Van Etten W J, Reich D, Higgins J, Daly M J, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody M C, Linton L, Lander E S, Altshuler D, International SNP Map Working Group: A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature, 409: 928-933 (2001)

100. Schjeide B M, Schnack C, Lambert J C, Lill C M, Kirchheiner J, Tumani H, Otto M, Tanzi R E, Lehrach H, Amouyel P, von Arnim C A, Bertram L: The role of clusterin, complement receptor 1, and phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein in Alzheimer disease risk and cerebrospinal fluid biomarker levels. Arch.Gen.Psychiatry, 68: 207-213 (2011)

101. Selkoe D J: Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiol.Rev., 81: 741-766 (2001)

102. Seshadri S, Beiser A, Kelly-Hayes M, Kase CS, Au R, Kannel WB, Wolf PA: The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study. Stroke, 37: 345-350 (2006)

103. Sheng J G, Zhu S G, Jones R A, Griffin W S, Mrak R E: Interleukin-1 promotes expression and phosphorylation of neurofilament and tau proteins in vivo. Exp.Neurol., 163: 388-391 (2000)

104. Sixt S U, Dahlmann B: Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin - incidence and relevance. Biochim.Biophys.Acta, 1782: 817-823 (2008)

105. Skinner R A, Gibson R M, Rothwell N J, Pinteaux E, Penny J I: Transport of interleukin-1 across cerebromicrovascular endothelial cells. Br.J.Pharmacol., 156: 1115-1123 (2009)

106. Sokolova A, Hill M D, Rahimi F, Warden L A, Halliday G M, Shepherd C E: Monocyte chemoattractant protein-1 plays a dominant role in the chronic inflammation observed in Alzheimer's disease. Brain Pathol., 19: 392-398 (2009)

107. Sriram K, O'Callaghan J P: Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. J Neuroimmune Pharmacol, 2: 140-153 (2007)

108. Steiner H, Haass C: Intramembrane proteolysis by presenilins. Nat.Rev.Mol.Cell Biol., 1: 217-224 (2000)

109. Sunderland T, Linker G, Mirza N, Putnam KT, Friedman DL, Kimmel LH, Bergeson J, Manetti GJ, Zimmermann M, Tang B, Bartko JJ, Cohen RM: Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. JAMA, 289: 2094-2103 (2003)

110. Swardfager W, Lanctot K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N: A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. Biol.Psychiatry, 68: 930-941 (2010)

111. Tachida Y, Nakagawa K, Saito T, Saido T C, Honda T, Saito Y, Murayama S, Endo T, Sakaguchi G, Kato A, Kitazume S, Hashimoto Y: Interleukin-1 beta up-regulates TACE to enhance alpha-cleavage of APP in neurons: resulting decrease in Abeta production. J.Neurochem., 104: 1387-1393 (2008)
112. Tarkowski E, Blennow K, Wallin A, Tarkowski A: Intracerebral production of tumor necrosis factor-alpha, a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia. J.Clin.Immunol., 19: 223-230 (1999)
113. Tarkowski E, Liljeroth A M, Nilsson A, Ricksten A, Davidsson P, Minthon L, Blennow K: TNF gene polymorphism and its relation to intracerebral production of TNFalpha and TNFbeta in AD. Neurology, 54: 2077-2081 (2000)
114. Tarkowski E, Liljeroth A M, Nilsson A, Minthon L, Blennow K: Decreased levels of intrathecal interleukin 1 receptor antagonist in Alzheimer's disease. Dement Geriatr Cogn Disord, 12: 314-317 (2001)
115. Tebar F, Bohlander S K, Sorkin A: Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. Mol.Biol.Cell, 10: 2687-2702 (1999)
116. Treusch S, Hamamichi S, Goodman J L, Matlack K E, Chung C Y, Baru V, Shulman J M, Parrado A, Bevis B J, Valastyan J S, Han H, Lindhagen-Persson M, Reiman E M, Evans D A, Bennett D A, Olofsson A, DeJager P L, Tanzi R E, Caldwell K A, Caldwell G A, Lindquist S: Functional links between Abeta toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. Science, 334: 1241-1245 (2011)
117. Tumani H, Kluge H: Anatomie und Physiologie des Liquorsystems. In: Zettl U K, Lehmitz L, Mix E (Hrsg) Klinische Liquordiagnostik (German Edition), 2. Aufl., Gruyter, Seite 39-57 (2005)
118. Vallieres L, Rivest S: Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. J.Neurochem., 69: 1668-1683 (1997)
119. Vassar R, Citron M: Abeta-generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research. Neuron, 27: 419-422 (2000)
120. Walker D G, Lue L F, Beach T G: Gene expression profiling of amyloid beta peptide-stimulated human post-mortem brain microglia. Neurobiol.Aging, 22: 957-966 (2001)
121. Xiao Q, Gil S C, Yan P, Wang Y, Han S, Gonzales E, Perez R, Cirrito J R, Lee J M: Role of phosphatidylinositol clathrin assembly lymphoid-Myeloid Leukemia (PICALM) in intracellular amyloid precursor protein (APP) processing and amyloid plaque pathogenesis. J.Biol.Chem., (2012)
122. Yamada K, Kono K, Umegaki H, Yamada K, Iguchi A, Fukatsu T, Nakashima N, Nishiwaki H, Shimada Y, Sugita Y: Decreased interleukin-6 level in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer-type dementia. Neurosci.Lett., 186: 219-221 (1995)

123. Yao P J, Zhang P, Mattson M P, Furukawa K: Heterogeneity of endocytic proteins: distribution of clathrin adaptor proteins in neurons and glia. Neuroscience, 121: 25-37 (2003)
124. Yao P J, Petralia R S, Bushlin I, Wang Y, Furukawa K: Synaptic distribution of the endocytic accessory proteins AP180 and CALM. J.Comp.Neurol., 481: 58-69 (2005)
125. Zhang J, Sokal I, Peskind E R, Quinn J F, Jankovic J, Kenney C, Chung K A, Millard S P, Nutt J G, Montine T J: CSF multianalyte profile distinguishes Alzheimer and Parkinson diseases. Am.J.Clin.Pathol., 129: 526-529 (2008)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt…

… meiner Doktormutter Prof. Dr. Christine von Arnim für die Aufgabenstellung, die unkomplizierte Betreuung sowie für die Famulatur und den netten Skiausflug!

… Cathrin für die gute Betreuung und die hilfreichen Tipps sowohl im Labor als auch beim Schreiben und Korrekturlesen.

… Björn, Daniel, Ilona und Anke für die gute Zusammenarbeit und fachliche Kompetenz in nahezu allen Fragen im Labor.

… meiner Familie und Klaus, die mich einerseits in verzweifelten Situationen unterstützt und immer für mich da waren, andererseits mir durch tolle Ausflüge und Unternehmungen neue Kraft gaben.

… Laura, Chrissi, Hanna und allen anderen für eine tolle Zeit während des Studiums!

… und Eli, mit der ich über alles reden kann!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Stefanie Kirschmer
Geburtsjahr	1987
Geburtsort	Laichingen

Schulischer Werdegang

1993–1997	Erich-Kästner-Schule, Grundschule Laichingen
1997–2000	Anne-Frank-Realschule, Laichingen
2000–2007	Albert-Schweizer-Gymnasium, Laichingen, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
2004	Sprachaufenthalt in Lindsay, Kanada

Universitärer Werdegang

Wintersemester 2007	Beginn des Studiums der Medizin an der Universität Ulm
August/September 2009	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August–Dezember 2012	Praktisches Jahr, 1. Tertial: Innere Medizin, Ulm
Dezember–April 2012/2013	Praktisches Jahr, 2. Tertial: Pädiatrie, Ulm
April–Juni 2013	Praktisches Jahr, 3. Tertial: Chirurgie, Winterthur, Schweiz
Dezember 2013	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

März 2010	Famulatur Kardiologie, Praxis Dr. Haerer, Ulm
August 2010	Famulatur Neurologie, Ulm
Juli 2011	Famulatur Pädiatrie (SPZ), Ulm
September 2011	Famulatur Augenheilkunde, Ulm
Februar 2012	Famulatur Kinderheilkunde und Neonatologie Praxis Drs. Vossbeck und Kohn, Neu-Ulm

Sonstige Tätigkeiten

August 2006	Forschungspraktikum – Cardiology, University of Manchester
Oktober 2010–Juni 2011	Promotionsprogramm experimentelle Medizin, Universität Ulm