

Aus dem Anatomischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Jobst Sievers)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DIE INTERAKTION VON FORMYL-PEPTID-REZEPTOREN UND
DEM SCAVENGER-REZEPTOR MARCO BEI DER
SIGNALTRANSDUKTION VON AMYLOID-BETA 1-42 (A β 1-42) IN
GLIAZELLEN DER RATTE**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

MAXIMILIAN KONRAD

aus ZWEIBRÜCKEN

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jobst Sievers

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Martina Böttner

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den
gez.

1. EINLEITUNG	1
1.1 MORBUS ALZHEIMER	1
1.2 HISTOPATHOLOGISCHES UND MOLEKULARBIOLOGISCHES KORRELAT DER ALZHEIMER-DEMENZ	2
1.2.1 NEURITISCHE PLAQUES UND NEUROFIBRILLÄRE BÜNDEL	2
1.2.2 MOLEKULARE UNTEREINHEIT DER ALZHEIMERLÄSIONEN – AMYLOID-BETA-PEPTID UND TAU-PROTEIN	2
1.3 DIE BETA-AMYLOID-HYPOTHESE – URSACHE DER ALZHEIMER-KRANKHEIT?	3
1.4 DIE ROLLE DER GLIAZELLEN BEI DER PATHOGENESE DER ALZHEIMER-DEMENZ	5
1.4.1 MIKROGLIA	5
1.4.2 ASTROZYTEN	6
1.5 POTENTIELLE REZEPTORKANDIDATEN FÜR DIE ABETA₁₋₄₂-INDUZIERTER GLIAZELLAKTIVIERUNG	7
1.5.1 FORMYL-PEPTID-REZEPTOREN: FPR UND FPRL-1	7
1.5.2 SCAVENGER-REZEPTOREN: SR-A UND SR-MARCO	10
1.6 FRAGESTELLUNG	12
2. MATERIAL	13
2.1 BIOCHEMIKALIEN	13
2.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	14
2.3 PEPTIDE	14
2.4 ENZYME UND OLIGONUKLEOTIDE	14
2.5 VEKTOREN, REKOMBINANTE EXPRESSIONSPLASMIDE UND ANTIKÖRPER	15
2.6 GEBRAUCHSFERTIGE KITS	16
2.7 LÖSUNGEN UND KULTURMEDIENTEN	16
3. METHODEN	20
3.1 VERSUCHSTIERE	20
3.2 ZELLKULTUREN	20
3.2.1 ASTROZYTEN	20
3.2.2 MIKROGLIA	21
3.2.3 TRANSFEKTION DER ASTROZYTEN MIT <i>SMALL INTERFERING RNA</i> (SIRNA)	21
3.2.4 ALLGEMEINE HANDHABUNG DER HEK293-ZELLEN	22
3.2.5 TRANSFEKTION UND SELEKTION DER HEK293-ZELLEN	23
3.3 MESSUNG DER INTRAZELLULÄREN CAMP-KONZENTRATION	23
3.4 WESTERN BLOT-ANALYSEN	25
3.4.1 ALLGEMEINES	25
3.4.2 BEHANDLUNG	25
3.4.3 ZELLAUFARBEITUNG UND ZELLYSE	25
3.4.4 PROTEINBESTIMMUNG	26
3.4.5 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (PAGE)	26
3.4.6 ÜBERTRAGUNG DER PROTEINE AUF PVDF-MEMBRAN	26
3.4.7 DETEKTION DES ANTIGEN-ANTI-KÖRPER-KOMPLEXE	27
3.5 KOIMMUNOPRÄZIPITATION	28
3.5.1 ALLGEMEINES	28
3.5.2 ZELLAUFARBEITUNG UND ZELLYSE	28
3.5.3 KOIMMUNOPRÄZIPITATION	29
3.6 REVERSE-TRANSKRIPTASE-POLYMERASEKETTENREAKTION (RT-PCR) UND REAL-TIME-PCR	29
3.6.1 ISOLIERUNG VON RNA	29
3.6.2 DNASE-VERDAU	30
3.6.3 DURCHFÜHRUNG DER PCR	31

3.6.4	AUSWERTUNG UND DARSTELLUNG DER DATEN DER REAL-TIME-PCR	32
3.7	DOPPELFLUORESCENZMIKROSKOPIE	32
3.8	DATENANALYSEN	33
4.	<u>ERGEBNISSE</u>	34
4.1	HEMMUNG DER ABETA₁₋₄₂- UND FUCOIDAN-INDUZIERTEN GLIAZELLAKTIVIERUNG DURCH DEN FPRL-1-ANTAGONISTEN WRW4	34
4.1.1	HEMMUNG DER ERK1/2-PHOSPHORYLIERUNG DURCH WRW4	34
4.1.2	HEMMUNG DER CAMP-SENKUNG DURCH WRW4	36
4.2	UNTERSUCHUNG DER ABETA₁₋₄₂- UND FUCOIDAN-INDUZIERTEN SIGNALTRANSDUKTION IN MIT siRNA-TRANSFIZIERTEN ASTROZYTEN	39
4.2.1	HEMMUNG DER EXPRESSION VON FPR, FPRL-1 UND MARCO IN ASTROZYTEN DURCH siRNA	39
4.2.2	HEMMUNG DER ABETA ₁₋₄₂ - UND FUCOIDAN-INDUZIERTEN PHOSPHORYLIERUNG VON ERK1/2 DURCH TRANSFEKTION VON FPRL-1-SIRNA IN ASTROZYTEN	40
4.3	INTERAKTION VON FPR, FPRL-1 UND MARCO IN GLIAZELLEN	42
4.3.1	MARCO INTERAGIERT MIT FPR UND FPRL-1 IN GLIAZELLEN	42
4.3.2	KOLOKALISATION VON FPR/FPRL-1 UND MARCO IN DER FLUORESCENZMIKROSKOPIE	44
4.4	MARCO INTERAGIERT MIT FPRL-1 IN TRANSFIZIERTEN HEK293-ZELLEN	46
4.5	FPRL-1- UND MARCO-VERMITTELTE ERK1/2-PHOSPHORYLIERUNG UND ÄNDERUNG DER CAMP-MENGE IN TRANSFIZIERTEN HEK293-ZELLEN	48
5.	<u>DISKUSSION</u>	51
5.1	VORBEMERKUNG	51
5.2	BETEILIGUNG VON FPRL-1 BEI DER ABETA ₁₋₄₂ -INDUZIERTEN GLIAZELLAKTIVIERUNG	52
5.3	BETEILIGUNG VON SCAVENGER-REZEPTOREN BEI DER ABETA ₁₋₄₂ -INDUZIERTEN GLIAZELLAKTIVIERUNG	54
5.4	ZUSAMMENSPIEL VON SR-MARCO UND FPRL-1	56
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	61
7.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	62
8.	<u>ABKÜRZUNGEN</u>	74
9.	<u>ANHANG</u>	76

1. Einleitung

1.1 Morbus Alzheimer

Im Jahre 1901 traf der Würzburger Nervenarzt Alois Alzheimer in der Universitätsklinik für Psychiatrie in Frankfurt am Main auf die damals erst 51-jährige Patientin Auguste Deter, die an Vergesslichkeit, Sprach- und Schriftstörung litt. An ihrer Person verfolgte er erstmals die Symptomatik und den Verlauf einer präsenilen Demenz. Unter dem Mikroskop erkannte er die typischen Veränderungen im Gehirn der Patientin und dokumentierte diese. Während sich anfangs das Interesse an seiner Entdeckung in Grenzen hielt, ehrte ihn sein ehemaliger Lehrer Emil Kraepelin 1910 in seinem Psychiatrie-Lehrbuch durch die Einführung des Begriffs „Alzheimersche Krankheit“. Erst später erkannte man, dass dieselben histopathologischen Veränderungen auch bei älteren Demenz-Patienten auftreten und bezeichnete die Erkrankungsform des älteren Menschen zur Unterscheidung gegenüber dem „echten“, präsenilen Morbus Alzheimer als senile Demenz vom Alzheimer-Typ.

Bei beiden Formen leiden die Patienten initial unter Gedächtnis- und Wortfindungsstörungen und psychomotorischer Unruhe. Im weiteren Verlauf kommt es zu Desorientierung und Störungen von Affekt und Antrieb. Im Gegensatz zu den intellektuellen Fähigkeiten bleibt die Persönlichkeit lange unversehrt. Frühzeitig kommt es zur Pflegebedürftigkeit. Die meisten Patienten sterben nach einer Krankheitsdauer von 8-10 Jahren an infektionsbedingten Komplikationen der Bettlägerigkeit (z. B. Pneumonie).

Im Jahre 2000 litten in Deutschland Schätzungen zufolge mehr als 900.000 Menschen an Demenzerkrankungen, davon etwa 650.000 an der Alzheimer Krankheit (Bickel, 2000). Durchschnittlich entwickeln sich pro Jahr rund 200.000 dementielle Neuerkrankungen, darunter etwa 120.000 Fälle von Alzheimer. Die deutliche Altersassoziation der Erkrankungsraten bringt es mit sich, dass zwei Drittel des Krankenbestandes und 60% der Neuerkrankungen auf die über 80-jährigen entfallen, nur 3% hingegen auf die unter 65-jährigen. In einer immer älter werdenden Gesellschaft stellt eine Erkrankung wie die Alzheimer-Demenz (AD), die vorrangig ältere Menschen betrifft und mit einem enormen Pflegeaufwand verbunden ist, ein großes volkswirtschaftliches Problem dar.

1.2 Histopathologisches und molekularbiologisches Korrelat der Alzheimer-Demenz

1.2.1 Neuritische Plaques und Neurofibrilläre Bündel

Der Einsatz der Elektronenmikroskopie erlaubte dem Engländer Michael Kidd und dem Amerikaner Robert Terry in den sechziger Jahren erstmals eine genaue Beschreibung der ultrastrukturellen Veränderungen, die den beiden pathognomonischen Läsionen der AD zu Grunde liegen (Kidd 1964; Terry 1964)

Es handelt sich hierbei um die so genannten neuritischen Plaques (*neuritic plaques*, NP) und die neurofibrillären Bündel (*neurofibrillary tangles*, NFT). Erstere sind mikroskopische Herde von extrazellulären Amyloidablagerungen mit einem Durchmesser von 10-120 µm, die mit axonalen und dendritischen Verletzungen assoziiert sind und vornehmlich in großer Anzahl im limbischen und Assoziationskortex von Alzheimer-Patienten vorzufinden sind (Dickson, 1997).

Dystrophe Axone befinden sich sowohl innerhalb der Amyloid-Depots als auch in unmittelbarer Umgebung. Sie sind oftmals dilatiert, gewunden und durch ultrastrukturelle Anomalien wie vergrößerte Lysosomen, zahlreiche Mitochondrien und gepaarte helikale Filamente gekennzeichnet.

Viele Neurone in Hirnregionen, die typischerweise bei der AD befallen sind (v. a. entorhinaler Kortex, Hippokampus, parahippokampaler Gyrus, Amygdala, frontaler, temporaler, parietaler und okzipitaler Assoziationskortex) enthalten neurofibrilläre Bündel, die sich als große, nicht membrangebundene Bündel abnormer Fasern darstellen und einen Großteil des perinukleären Zytoplasmas einnehmen. Neurofibrilläre Veränderungen kommen sowohl im Zellkörper als *neurofibrillary tangles* (NFT), als auch in dystrophen Axonen vor, wo sie dann als *neuropil threads* (NT) bezeichnet werden. Elektronenmikroskopisch handelt es sich hierbei, ähnlich wie bei den neuritischen Plaques, um gepaarte 10 nm-Filamente, die in Helices gewunden sind.

1.2.2 Molekulare Untereinheit der Alzheimerläsionen – Amyloid-beta-Peptid und tau-Protein

Erst die Entwicklung neuerer biochemischer und immunzytochemischer Methoden konnte die Identifizierung der molekularen Untereinheiten der beiden klassischen AD-Läsionen ermöglichen. Anfang der 80ziger Jahre gelang es Glenner, das Amyloid-beta-Peptid (kurz: Aβ) erstmals aus meningovaskulären amyloiden Ablagerungen von AD-Patienten zu extrahieren und zu charakterisieren (Glenner und Wong, 1984). Wenig

später konnte A β auch als Untereinheit der neuritischen Plaques ausfindig gemacht werden (Masters et al., 1985; Selkoe et al., 1986).

A β gilt als physiologisches zelluläres Produkt, dessen Funktion weitestgehend unbekannt ist, jedoch für die Funktion des ZNS unentbehrlich zu sein scheint (Plant et al., 2003). *In vitro* ist es in höheren Konzentrationen nahezu unlöslich und neigt dazu auszufallen und Aggregate mit β -Faltblattstruktur zu bilden (Barrow et al., 1992). Es handelt sich um ein 39-42 Aminosäuren enthaltendes amphiphatisches Peptid, welches sich von transmembranen und extrazellulären Domänen des APP (*amyloid precursor protein*) herleitet (Lee et al., 1998).

Durch Zerschneiden von APP, das Eigenschaften eines integralen Typ I transmembranen Glykoproteins (Kang et al., 1987) besitzt, mithilfe der Enzyme Beta- und Gamma-Sekretase entstehen die zwei C-terminalen Hauptvarianten A β_{1-40} und A β_{1-42} . Letzteres ist die Hauptkomponente der Amyloid-Plaques bei Alzheimerkranken (Younkin, 1995) und neigt eher zur Aggregation (Jarrett et al. 1993). Es konnte gezeigt werden, dass Alzheimer verursachende Mutationen im APP nahe der β - und γ -Sekretase Spaltungsstelle einen Anstieg von A β_{1-42} bewirken (Suzuki et al., 1994).

Bei Patienten mit Down Syndrom (Trisomie 21) kommt es in der Mehrzahl der Fälle zu einer Überexpression von APP, dessen Gen auf Chromosom 21q lokalisiert ist, die bereits im mittleren Lebensalter zur Ausbildung der AD-typischen neuropathologischen Veränderungen führt (Beyreuther et al., 1992).

Anfang 1986 konnten Grundke-Iqbal et al. das sog. tau-Protein als molekulare Untereinheit der NFTs identifizieren. Es gehört zu den Mikrotubulus-assoziierten Proteinen und ist somit wichtig für den Aufbau des Zytoskeletts. Das tau-Protein spielt eine Rolle bei der Stabilisierung der Mikrotubuli, was essentiell für das Aussprossen und den Erhalt von Axonen ist, da Mikrotubuli u. a. als Beförderungsschiene für Mitochondrien und andere Zellorganellen dienen. In Alzheimer-Patienten wird tau-Protein von seinem Bindungsort freigesetzt und akkumuliert in den Neuronen. Das nunmehr vermehrt im Zytosol erscheinende und durch abnorme Hyperphosphorylierung veränderte tau-Protein wird aus dem Axon der Nervenzelle in deren Zelleib und in die Dendriten verlagert und bildet dort rasch Oligomere, die sich zu größeren Aggregaten vernetzen (Rhein und Eckert, 2007).

1.3 Die Beta-Amyloid-Hypothese – Ursache der Alzheimer-Krankheit?

Die Aggregation von löslichem A β_{1-42} zu durch β -Faltblattstruktur stabilisierten Fibrillen wird weitläufig als das ausschlaggebende Ereignis in der Pathologie der Alzheimer-Demenz gesehen (Dumery et al., 2001). Neuerdings weisen immer mehr

Forschungsergebnisse darauf hin, dass die toxischen Effekte eher von dem löslichen $A\beta_{1-42}$ ausgehen und nicht nur die Plaqueablagerungen die kognitiven Einbußen im Verlauf des Morbus Alzheimer bedingen (McLean et al., 1999). Speziell präamyloiden Protofibrillen und intraneuronal akkumuliertem $A\beta_{1-42}$ scheint dabei eine wichtige Rolle zu zukommen (Selkoe, 2001; Wilson et al., 1999).

$A\beta_{1-42}$, das leichter zur Polymerisierung zu Protease-resistenten Fibrillen neigt, wurde auch in transgenen Mäusen und Zellen, die FAD (familiäre Alzheimer Demenz)-Mutationen von APP exprimieren, nachgewiesen (Neve et al., 2000).

Die einst propagierte Neurotoxizität von $A\beta_{1-42}$ konnte in vielen Versuchsreihen nicht bestätigt werden. Paradoxerweise konnte sogar unter bestimmten Zellkulturbedingungen beobachtet werden, dass $A\beta_{1-42}$ das Neuritenwachstum fördert (Koo et al., 1993; Yankner et al., 1990). $A\beta_{1-42}$ -Ablagerungen konnten auch in Hirnregionen ohne Neurodegeneration nachgewiesen werden (Gearing et al., 1993; Joachim et al., 1989) und *vice versa* wurden Regionen mit neuronalem Zellverlust, jedoch ohne begleitende $A\beta_{1-42}$ -Ablagerung identifiziert (Cochran et al., 1991). Diese Ergebnisse legten nahe, dass die neurotoxische Wirkung von $A\beta_{1-42}$ durch andere sekundäre Mechanismen hervorgerufen wird, die unter dem Begriff „ β -Amyloid-Hypothese“ subsumiert werden.

Folgende Reaktionskaskaden können durch $A\beta_{1-42}$ induziert werden und sind Gegenstand aktueller Forschung (Suh und Checler, 2002):

- 1) Dysregulation der Ca^{2+} -Homeostase
- 2) Aktivierung bestimmter Signalkaskaden
- 3) Inflammatorische Antwort
- 4) Generierung reaktiver Sauerstoffspezies

In den letzten Jahren hat die Erforschung der inflammatorischen Vorgänge, die sich bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem M. Alzheimer abspielen, zunehmend an Bedeutung gewonnen. Besonders die Aufdeckung der Funktion der Gliazellen, v. a. Astrozyten und Mikroglia, die durch ihrer Reaktion auf $A\beta_{1-42}$ einen chronischen Entzündungsprozess aufrecht zu erhalten scheinen, kann zum Verständnis der Alzheimer-Ätiologie beitragen und damit neue pharmakologische Therapiestrategien eröffnen.

1.4 Die Rolle der Gliazellen bei der Pathogenese der Alzheimer-Demenz

1.4.1 Mikroglia

Mikrogliazellen des Zentralnervensystems fungieren durch vielfältige Funktionen als Immunzellen des Gehirns. Dabei scheinen sie jedoch nicht nur Krankheiten abzuwehren. Neuesten Untersuchungen zufolge können sie vielmehr zur Entstehung oder Verschlechterung von neurodegenerativen Veränderungen (z. B. M. Alzheimer und M. Parkinson) oder entzündlich-infektiösen Erkrankungen (z. B. Multiple Sklerose und AIDS-Demenz) beitragen. Ein gemeinsames Kennzeichen dieser neuropathologischen Veränderungen ist dabei die Aktivierung von Mikrogliazellen mit nachfolgender neuronaler Schädigung bis hin zum neuronalen Zelltod.

Mikroglia entstammen dem monozytären Phagozytensystem (Chugani et al., 1991) und sind daher als spezialisierte, ortsständige, zentralnervöse Makrophagen anzusehen. Sie wandern in der späten Embryonalphase über zentralnervöse Blutgefäße als amöboide Zellen in das ZNS ein und bilden dort eine Gliapopulation von etwa 5-20% (Lawson et al., 1990). Mikrogliazellen lassen sich durch ihre charakteristische Morphologie, Funktion und Färbungseigenschaft von anderen Zellen des Zentralnervensystems (ZNS) wie Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten unterscheiden.

Durch eine Reihe pathologischer Ereignisse (z.B. traumatische ZNS-Schädigungen, Ischämie, HIV-Infektion, Multiple Sklerose, neurodegenerative Erkrankungen) (Dickson et al., 1993; Rosenstiel et al., 2001) wandelt sich die ramifizierte (ruhende) Zelle in eine amöboide (aktive) Form um. Eine verstärkte Sekretion von Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor- α und Interleukin-1 (TNF- α , IL-1) (Griffin et al., 1989), proteolytischen Enzymen, Prostaglandine und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Banati et al., 1993) und eine verstärkte Expression von MHC-II-Antigenen (von engl. *major histocompatibility complex*) auf der Zelloberfläche (Mattiace et al., 1990) machen Mikrogliazellen zu residenten, intrinsischen Immuneffektorzellen des Gehirns. Durch diese Veränderungen sind Mikrogliazellen das zentrale Element für die Einleitung von Abwehr-, aber auch Reparatur- und Regenerationsprozessen im ZNS.

Bei Alzheimer-Kranken sind reaktive Gliazellen unmittelbar mit den neuritischen Plaques assoziiert. Mikroglia sind sowohl integraler Bestandteil des zentralen Amyloidkerns als auch peripher an diesen angeheftet. In Übereinstimmung mit dieser Tatsache ist ihre Fähigkeit, in humanen Zellkulturen in Richtung humanen A β ₁₋₄₂ migrieren zu können (Lue et al., 2001b; Rogers et al., 2002a).

In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, dass Mikroglia als potentielle Vermittler von mindestens zwei entscheidenden Mechanismen bei der AD fungieren können. Der eine

ist die lokale, angeborene Immunantwort, die mit den $A\beta_{1-42}$ -Ablagerungen einhergeht, der andere die Prozessierung von $A\beta_{1-42}$ durch die Mikroglia (Andreani et al., 2000). Exponiert man Mikrogliazellkulturen von älteren Patienten mit oder ohne AD mit $A\beta_{1-42}$, so resultiert daraus ein Anstieg der Oberflächenexpression von MHCII (Rogers et al., 2002a), was deren Aktivierung widerspiegelt. Zusätzlich kommt es zu einem dosis-abhängigen Anstieg der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α , von Chemokin IL-8, von *macrophage inflammatory protein-1* (MIP-1), von *monocyte chemoattractant peptide-1* (MCP-1) und von dem Wachstumsfaktor *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) (Lue et al., 2001a).

Es gibt mehrere Studien an Zellkulturen und Tiermodellen, die nahe legen, dass Mikroglia die Fähigkeit besitzen, $A\beta_{1-42}$ -Fibrillen zu phagozytieren und damit zu beseitigen (Rogers et al., 2002a; Shigematsu et al., 1992).

1.4.2 Astrozyten

In unmittelbarer Nähe der Alzheimer-typischen neuritischen Plaques finden sich neben Mikroglia auch zahlreiche reaktive Astrozyten, die durch eine Hypertrophie von Zellkern- und -körper charakterisiert sind und verstärkt *glial fibrillary acid protein* (GFAP) exprimieren.

Astrozyten, die die mengenmäßig größte Gliapopulation im ZNS darstellen, sind neuroektodermalen Ursprungs und essentiell für die neuronale Homöostase und Funktion (Dong und Benveniste, 2001). Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) wird durch das Ausbilden von sog. *tight junctions* (*Zonulae occludentes*) der Endothelzellen ermöglicht. Die Ausbildung der *tight junctions* wird durch Astrozyten induziert, die mit ihren Fortsätzen die Endothelzellen umgeben (*Membrana limitans glialis perivascularis*). Sie bilden die gliale Begrenzung um die Blutgefäße und verhindern so die Invasion von immunkompetenten Zellen ins ZNS (Bechmann et al., 2007).

Nachdem Astrozyten pathogene Substanzen erkannt haben, setzen sie Mediatoren frei, die im Wesentlichen zwei Reaktionswege anschalten können (Farina et al., 2007). Der erste führt zu einer Aktivierung der benachbarten Zellen (Astrozyten und Mikroglia), die die lokale, initiale angeborene Immunantwort weiter steigern. Im zweiten Reaktionsweg stehen die Modifizierung der BHS und das Anlocken von Immunzellen aus dem Blutkreislauf ins Hirngewebe mit konsekutiver Unterstützung der erworbenen Immunantwort im Vordergrund. Dabei ist das Gleichgewicht zwischen inflammatorischen, also gewebsschädigenden und immunsuppressiven, also geweberegenerierenden Signalwegen fundamental für eine kontrollierte Reaktion des ZNS auf ein traumatisches

Ereignis jeglicher Genese. Dysregulationen dieser Signalwege können zu einer pathogenen chronischen Neuroinflammation und –degeneration führen.

Unter den Zytokinen sind TNF, Interferon γ (IFN γ) und IL-1 die Hauptaktivatoren der Astrozyten. Genexpressions-Studien *in vitro* an Astrozyten, die inflammatorischen Zytokinen ausgesetzt waren, zeigten eine tiefgreifende Regulation von Genen, die in zelluläre Signalwege involviert sind, die die angeborene und erworbene Immunität, Antigen-Präsentation, Apoptose, Leukozytenmigration und die Permeabilität der BHS betreffen (John et al., 2005; Riviaccio et al., 2005).

Aktiviert Astrozyten, die die Amyloid-Plaques umgeben oder mit A β_{1-42} *in vitro* behandelt wurden, steigerten die Expression induzierbarer NO-Synthase und sezernierten proinflammatorische Substanzen, wie IL-1 β und MCP-1 (Johnstone et al., 1999).

Dass Astrozyten zur Phagozytose von A β_{1-42} fähig sind, ist noch nicht so eindeutig belegt worden wie im Falle der Mikroglia. Jedoch konnten in Gehirnen von AD-Patienten Astrozyten nachgewiesen werden, die in ihren Zellkörpern A β_{1-42} -Fragmente enthielten (DeWitt et al., 1998). Desweiteren demonstrierten Wyss-Coray et al. (2003) in einem AD-Mausmodell, dass Astrozyten, die auf einen A β_{1-42} enthaltenden Hirnschnitt gebettet waren, die darin enthaltende A β_{1-42} -Gesamtmenge reduzieren konnten.

Bislang ist nicht genau geklärt, welcher Rezeptor die Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia durch A β_{1-42} übermittelt.

1.5 Potentielle Rezeptorkandidaten für die A β_{1-42} -induzierte Gliazellaktivierung

1.5.1 Formyl-Peptid-Rezeptoren: FPR und FPRL-1

Viele Untersuchungen weisen darauf hin, dass A β_{1-42} seine proinflammatorischen und neurotoxischen Wirkungen über die Interaktion mit spezifischen Zellrezeptoren entfaltet. Ausgehend von der Wirkung von Signaltransduktionswegen, die durch A β_{1-42} in THP-1-Monozyten (humane akute Leukämiezellreihe) ausgelöst wurden, wie der Ca²⁺-Mobilisation, Aktivierung von GTP-bindenden Proteinen (G-Proteinen) (Lorton, 1997) sowie der Aktivierung der MAPK (*mitogen activated protein kinase*) ERK1/2 (*extracellular signal-related kinase*) durch A β_{25-35} und A β_{1-40} in Mikroglia der Ratte (McDonald et al., 1998), wurde eine Interaktion von A β mit Sieben-Transmembrandomänen (STM)-Rezeptoren vermutet (McDonald et al., 1997).

In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass das bakterielle chemotaktische Peptid formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin (fMLF) die A β_{1-42} -induzierte Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β in Endotoxin-stimulierter Mikroglia der Ratte

verringern konnte (Lorton et al., 2000). Dieses Ergebnis legt nahe, dass sich $A\beta_{1-42}$ einen Rezeptor mit fMLF teilt.

Im Menschen wird ein Prototyp eines STM-Rezeptors namens *formyl peptide receptor* (FPR) von geringen Konzentrationen (im pico- oder unteren nanomolaren Bereich) von fMLF aktiviert und deswegen als *high affinity* fMLF-Rezeptor bezeichnet. Eine zu 70% homologe FPR-Variante (Boulay et al., 1990), der *formyl peptide receptor-like 1* (FPRL-1), reagiert nur auf hohe Konzentrationen (im mikromolaren Bereich) von fMLF und wird deshalb als *low affinity* fMLF-Rezeptor definiert (Prossnitz und Ye, 1997). Ein weiteres Mitglied dieser Familie, der FPRL-2, wird nicht durch Formyl-Peptide aktiviert (Durstin et al., 1994).

Formyl-Peptid-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR engl. für: *G-protein coupled receptor*), welche circa 1000 bekannte Rezeptoren umfasst. Diese Gruppe ist durch sieben hydrophobe helikale Transmembrandomänen charakterisiert, die zur Verankerung des Rezeptors in der Membran dienen. Der N-Terminus befindet sich im Extrazellulärraum und der C-Terminus im Intrazellulärraum. Die sieben Transmembrandomänen sind durch drei unterschiedlich große intrazelluläre und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden (Pierce et al., 2002). Mittels röntgenkristallographischer Analyse konnte die angenommene strukturelle Anordnung bestätigt werden, wonach die sieben Helices bündelförmig in die Membran eingebettet sind. Die Bindung der spezifischen Liganden (*first messenger*) erfolgt durch die extrazelluläre Domäne des Rezeptors mit hoher Affinität und führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, was eine Kopplung der intrazellulären Schleifen und direkt benachbarter Transmembrandomänen mit spezifischen G-Proteinen und deren Aktivierung zur Folge hat (Gether und Kobilka, 1998).

Ein G-Protein besteht aus den drei Untereinheiten α , β , und γ . Die α -Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle für Guanin-Nukleotide (Guanosindiphosphat [GDP] beziehungsweise Guanosintriphosphat [GTP]) und beinhaltet die GTPase-Aktivität. Über den hydrophoben Komplex der β - und γ -Untereinheit ist das G-Protein in der Membran verankert, wo es im inaktiven Zustand als Trimer der drei Untereinheiten ohne Kopplung an den Rezeptor vorliegt. Nach der Bindung des Liganden an den Rezeptor und der Assoziation mit dem trimeren G-Protein kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit und der Abtrennung der $\beta\gamma$ -Untereinheit von dem ternären Komplex aus Ligand, Rezeptor und trimeren G-Protein. Die Aktivierung des G-Proteins führt zur Regulation von spezifischen Effektorsystemen durch die G-Protein-Untereinheiten α und $\beta\gamma$. Dadurch kommt es zur Bildung von sog. *second messenger*-Molekülen, die über nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden weitere Enzymsysteme kontrollieren

(Reiter und Lefkowitz, 2006). Ein solcher Aktivierungszyklus ist in **Abb. 1** schematisch dargestellt.

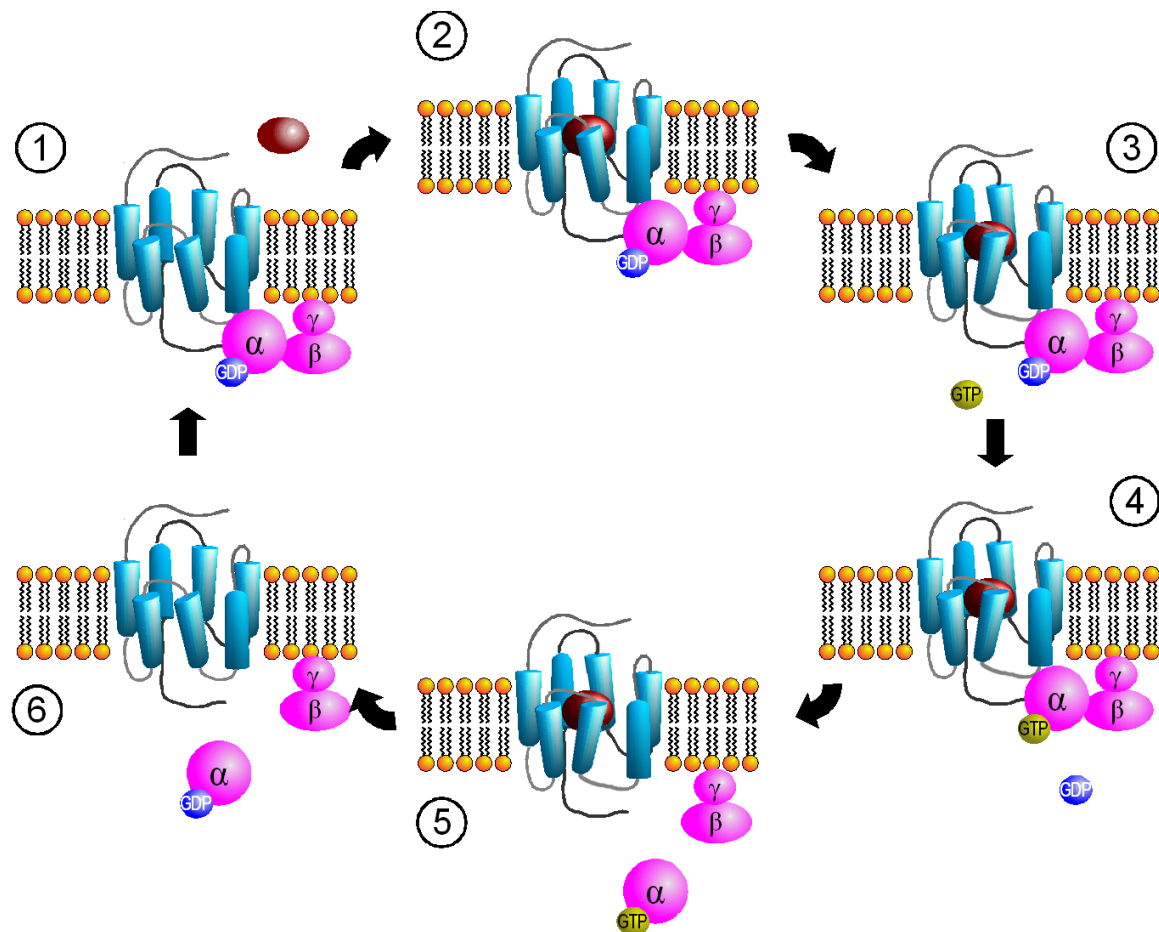


Abb. 1 Aktivierungszyklus von G-Proteinen durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. (1) Bindung des G-Proteins. (2) Ligandenbindung. (3) Aktivierung des Rezeptors. (4) Aktivierung des G-Proteins. (5) Dissoziation des G-Proteins und Signaltransduktion. (6) Inaktivierung des G-Proteins (aus Wikipedia, Urheber: Sven Jähnichen (2006), Titel: *Activation cycle of G-proteins by G-protein-coupled receptors*).

FPR und FPRL1 werden hochgradig von peripheren Neutrophilen und Monozyten exprimiert und vermitteln ihre chemotaktischen Eigenschaften über ein Pertussis-sensitives und damit inhibitorisches G-Protein (G_i) (Le et al., 2002), dessen α -Untereinheit die Adenylatzyklase hemmt. Da das Enzym die Entstehung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) stimuliert, einem wichtigem *second messenger* der Zelle, verringert die Inhibition der Adenylatzyklase den cAMP-Spiegel der Zelle. Die Aktivierung der $\beta\gamma$ -Untereinheit kann unterschiedliche Effektoren regulieren wie zum Beispiel die Phospholipase C und G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK). Aufgrund der konstitutiven enzymatischen Aktivität der α -Untereinheit wird anschließend das gebundene GTP hydrolysiert, was zur Auflösung des Komplexes mit dem Rezeptor

und zur Heterotrimerisierung der Untereinheiten zum inaktiven G-Protein führt (Lefkowitz, 1998).

Obwohl FPR und FPRL-1 als eine der ersten unter den chemotaktischen Rezeptoren identifiziert wurden und ihre Sequenz bereits molekular geklont wurde, ist noch relativ wenig über deren Bedeutung *in vivo* bekannt. FPRL-1-defiziente Mäuse zeigten keine spontanen phenotypischen Defekte, waren aber anfälliger gegenüber Infektionen mit *Listeria monocytogenes* (Gao et al., 1999; Le et al., 2000). Solche Mäuse zeigten nach Exposition zu bakteriellem fMLF eine beeinträchtigte neutrophile Chemotaxis, was bedeutet, dass dieser Rezeptor eine aktive Komponente in der angeborenen Immunantwort gegen bakterielle Infektionen sein könnte.

In vitro hat die Aktivierung von FPRL-1 und FPR durch Agonisten wie fMLF eine Serie von Signalkaskaden zur Folge, die zu Zelladhäsion, Chemotaxis, Phagozytose, Freisetzung reaktiver O₂-Spezies und Produktion proinflammatorischer Zytokine führt (Le et al., 2000; Prossnitz und Ye, 1997). Es scheint neuerdings, dass eher FPRL-1 die Zellaktivierung durch A β ₁₋₄₂ vermittelt, was anhand von Ca²⁺-Mobilisation in mit FPRL-1 transfizierten *human embryonic kidney* (HEK)-Zellen und Monozyten gezeigt worden ist (Le et al., 2001a). Ferner vermittelte der Rezeptor in diesen Zellgattungen die Migration zu A β ₁₋₄₂. FPRL-1 gilt auch als potentieller Kandidat für die Vermittlung der Endozytose von A β ₁₋₄₂. Yazawa et al. (2001) wiesen diesbezüglich die Internalisierung eines A β ₁₋₄₂/FPRL-1-Komplexes in Makrophagen nach. Lorton et al. (2000) gelang erstmals der immunzytochemische Nachweis von FPR in primärer Mikroglia der Ratte. Die Existenz von FPRL-1 und dessen Funktion bei der Interaktion mit A β ₁₋₄₂ in primären Gliazellen der Ratte wurde bislang nicht untersucht.

1.5.2 Scavenger-Rezeptoren: SR-A und SR-MARCO

Die Suche nach Rezeptoren, über die A β ₁₋₄₂ seine Wirkung entfaltet, brachte außer den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) weitere Zielkandidaten hervor, wie die *scavenger receptors* (SR, vom Engl.: *scavenger* = Straßenfeger, Fänger) (El et al., 1996). Scavenger-Rezeptoren sind eine große Gruppe membranständiger, strukturell unterschiedlicher Glykoproteine, die sich an der Bindung und Endozytose zahlreicher, verschiedener Substanzen, wie z. B. anionischen Polysacchariden, Polynukleotiden, Lipoproteinen, apoptotischen Zellen und Bakterien beteiligen (Husemann et al., 2002). Hierdurch erklären sich ihre facettenreichen Funktionen in Makrophagen, wie die Beseitigung pathogener Substanzen (Hampton et al., 1991; Resnick et al., 1993) und die Wirtsverteidigung (Haworth et al., 1997; Suzuki et al., 1997). Sie werden von myeloiden und einigen endothelialen Zellen exprimiert und wurden ursprünglich aufgrund ihrer

Fähigkeit, acetyliertes *low density lipoprotein* (LDL) zu binden charakterisiert (Goldstein et al., 1979).

Alarcon et al. (2005) konnten zeigen, dass Astrozyten und Mikroglia neugeborener Ratten zu Oberflächen, die mit $A\beta_{1-42}$ benetzt waren, adhärten. Durch Einsatz von spezifischen SR-A-Liganden wie Poly-Inosin-Säure (Poly(I)) und Fucoidan fanden sie heraus, dass diese Adhäsion an die Funktion von SR-A gebunden war. Fucoidan, ein gerinnungshemmender Inhaltsstoff aus braunem Seetang (*Laminaria japonica*), ist ein aus L-Fucose-Einheiten aufgebautes, stark verzweigtes sulfatisiertes Polysaccharid. Obwohl es kein Lipoprotein ist, wird es als Ligand von Scavenger-Rezeptoren angesehen und kann die Bindung von oxidiertem LDL kompetitiv hemmen, was in MSR (*macrophage scavenger receptor*)-Liganden-Bindungsstudien gezeigt werden konnte (Brown und Goldstein, 1983; Krieger und Herz, 1994).

Weitere Ergebnisse von Alarcon et al. (2005) sprechen dafür, dass ein anderer Fucoidan-sensitiver Rezeptor als SR-A die Adhäsion von $A\beta_{1-42}$ an Gliazellen vermittelt. Die Autoren vermuten, dass SR-MARCO (*macrophage receptor with collagenous structure*), ein dem SR-A verwandter SR (Kraal et al., 2000), den sie in Astrozyten und Mikrogliazellen immunodetektieren, $A\beta_{1-42}$ binden kann. Diese Annahme wurde durch die Tatsache, dass ein neutralisierender Antikörper gegen SR-MARCO die Adhäsion von Gliazellen zu $A\beta_{1-42}$ inhibieren konnte, gestützt. Das Ausmaß der Inhibition war vergleichbar mit der von Poly(I) und Fucoidan. Demgegenüber hatten SR-A-Antikörper keinen Effekt auf die Adhäsion.

SR-MARCO ist ein jüngst beschriebener Scavenger-Rezeptor. Er wurde anfangs als Bakterien bindender Rezeptor charakterisiert. Er bindet aber auch modifiziertes LDL, weshalb er in die Familie der SR-A-Rezeptoren eingereiht wurde (Gough und Gordon, 2000). Über welche Mechanismen SRs in Gliazellen ihre Funktionen übermitteln ist noch nicht erforscht worden. Es gibt Hinweise darauf, dass SR-A-Liganden wie Fucoidan in murinen Makrophagen die Sekretion von TNF- α und IL-1 β induzieren können. Dafür sollen Signaltransduktionswege verantwortlich sein, die Proteinkinasen und MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*) wie ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*c-Jun-N-terminal kinase*) und p38 (*p38 mitogen-activated kinase*) beinhalten (Hsu et al., 2001). Welche Signalwege bei der Interaktion von SR-A bzw. -MARCO mit $A\beta_{1-42}$ in Gliazellen ausgelöst werden ist bislang nicht untersucht worden.

SR-MARCO könnte genau wie FPRL-1 ein Schlüsselrezeptor bei der Interaktion mit $A\beta_{1-42}$ sein, was sie als pharmakologische Angriffspunkte für künftige kausal wirkende Antidementiva interessant machen könnte.

1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll die Rolle von FPR/FPRL-1 und Scavenger-Rezeptoren (insbesondere MARCO) bei der Interaktion mit A β ₁₋₄₂ in primären Gliazellen (Astrozyten und Mikroglia) der Ratte untersucht werden.

Dazu wurden folgende Aspekte bearbeitet:

Untersuchung der A β ₁₋₄₂-induzierten Gliazellaktivierung mittels

– Western Blot-Analysen:

Induziert A β ₁₋₄₂ in Gliazellen der Ratte eine Phosphorylierung der MAPK ERK1/2?

Welcher der o. g. Rezeptoren spielt dabei eine Rolle?

– Hemmung der cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat)-Akkumulation:

Sind FPRL-1 und Scavenger-Rezeptoren daran beteiligt?

Die Ergebnisse dieser Fragestellungen brachten uns zu der Hypothese einer möglichen Rezeptorinteraktion zwischen FPRL-1 und Scavenger-Rezeptoren, die wir durch folgende weitere Fragestellungen zu erhärten versuchten:

Rezeptorinteraktion zwischen FPR/FPRL-1 und SR-MARCO

– siRNA-Versuchsansätze in Astrozyten:

Kann durch Rezeptor-Down-Regulation mittels siRNA (*small interfering RNA*) gezeigt werden, dass sowohl FPRL-1 als auch MARCO bei der A β ₁₋₄₂ bzw. Fucoidan-induzierten Signaltransduktion in Gliazellen eine Rolle spielen?

– Koimmunopräzipitation:

Läßt sich außer der vermutenden funktionellen Interaktion auch eine physische Interaktion der untersuchten Rezeptoren nachweisen? Ist eine „Transaktivierung“ in Form einer Rezeptorphosphorylierung nachweisbar?

– Doppelfluoreszenzmikroskopie:

Sind beide Rezeptoren in Gliazellen in räumlicher Beziehung zueinander auf zellulärer Ebene nachweisbar?

– Untersuchungen in mit FPRL-1 und/oder MARCO transfizierten HEK293-Zellen:

Können die aus den Gliazellen gewonnenen Ergebnisse in dieser Zellreihe verifiziert werden?

2. Material

2.1 Biochemikalien

Acrylamid	Serva #10682, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck #101201, Darmstadt
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad #5000006, München
Bisbenzimid	Sigma, Deisenhofen
Chloroform für RNA-Isolation	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Forskolin	Sigma, Deisenhofen
Fucoidan	Sigma, Deisenhofen
GFAP	Astrozytenmarker; Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HCl	Roth, Karlsruhe
HEPES	Biomol, Hamburg
Immu-Mount, Eindeckmedium	Thermo Electron Cooperation, USA
Isopropanol für RNA-Isolation	Roth, Karlsruhe
Kasein	Santa Cruz, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe
OX42	Mikroglia-/Makrophagenmarker; Sera-Lab, UK
Protein G-Agarose Kügelchen	sc-2002, Santa Cruz, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
SDS	Biomol, Hamburg
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris-EDTA-Pufferlösung	Amersham Pharmacia Biotech, UK
Tris-HCl für PAGE	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma 7-9®, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe

2.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser, 12 ø mm	Carl Roth, Karlsruhe
Einmalpipetten, verschiedene Größen	Greiner, Frikenhausen
Fotopapier	Agfa beziehungsweise Fuji
Gewebekulturflaschen und -schalen	Greiner, Frikenhausen
Hyperfilm	Amersham Pharmacia, UK
Objektträger Glas, SuperFrost Plus	Menzel, Braunschweig
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Greiner, Frikenhausen
PVDF-Membran „Hybond P“	Amersham Pharmacia, UK
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Szintillatorröhrchen, aus Polypropylen, 8 ml	Packard, USA
Whatmann-Pappe	Mercateo, München
Zellkulturplatten, 6, 12 oder 24 Vertiefungen	Biochrom, Berlin
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner, Frikenhausen

Ferner das übliche Laborzubehör und Glasgebrauchsmaterial

2.3 Peptide

Humanes A β ₁₋₄₂, Kontrollpeptid A β ₄₂₋₁ und der FPRL-1-Antagonist WRW4 (Tryptophan-Argenin-(Tryptophan)₄) wurden von Dr. P. Henklein (Charité, Berlin) geliefert. fMLF (formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin) wurde von der Firma Sigma, Deisenhofen bezogen.

Die Peptide wurden in 1mM und 10 mM Konzentration in DMSO gelöst. A β ₁₋₄₂ und A β ₄₂₋₁ lagen dabei in löslicher Form vor.

2.4 Enzyme und Oligonukleotide

Verwendete Enzyme:

Reverse Transkriptase: <i>RevertAid™ H Minus</i>	
<i>M-MuLV Reverse Transcriptase</i> (200 U/μl)	Fermentas, Canada
Real-Time-PCR Mastermix: <i>Power SYBR</i>	
<i>Green PCR Master Mix</i>	Applied Biosystems, USA

Verwendete Oligonukleotide:

<i>Oligo-(dT)₁₅ Primer</i>	Promega, USA
---------------------------------------	--------------

GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase):

	Sequenz
Vorwärts-Primer	5'-TCTACCCACGGCAAGTTCAAC-3'
Rückwärts-Primer	5'-TCTCGCTCCTGGAAGATGGT-3'

Primer für die untersuchten Rezeptoren (hergestellt von Qiagen, USA; *QuantiTect Primer Assay*):

Rezeptor	Katalognummer
FPR	QT00465703
FPRL-1	QT00462672
MARCO	QT00425684

siRNA für die untersuchten Rezeptoren (alle von Qiagen,USA):

Rezeptor	Katalognummer	Zielsequenz	Zielspezies
FPR	SI01990079	5'-AAGTTCATATATACTGTAATA-3'	<i>Rattus norvegicus</i>
FPRL-1	SI01984647	5'-AACCAAGTGATACAGGCACAAA-3'	<i>Rattus norvegicus</i>
MARCO	SI01895103	5'-AAGGGAGAACCTGGGATGAAA-3'	<i>Rattus norvegicus</i>
Kontroll-siRNA	SI01022076	5'-AATCTCCGAAGGTGTCACGT-3'	

Primer zur Amplifizierung des Expressionsplasmid hMARCO:

Primer	Sequenz
hMARCO- <i>HindIII</i> - <i>forward</i>	5'-CGCAAGCTTGCAGGCATGAGAAATAAGAAAATTCTC-3'
hMARCO- <i>XbaI</i> - <i>reverse</i>	5'-CTATCTAGATGGGTTCTAGACGCTGCACTCCACGCC-3'

2.5 Vektoren, rekombinante Expressionsplasmide und Antikörper

Verwendete Vektoren:

pEAK10 (Edge Bio System, USA)

pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe)

Verwendete rekombinante Expressionsplasmide:

hFPRL-1-Expressionsplasmid

hFPRL-1-pcDNA3.1-Plasmid wurde freundlicherweise von Frau PD Dr. U. Rescher (Uni Münster) zur Verfügung gestellt und enthält ein Neomycin-Resistenzgen

hMARCO-Expressionsplasmid

hMARCO-pEAK10-Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. L.-O. Brandenburg (RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt und enthält ein Puromycin-Resistenzgen

Verwendete primäre Antikörper:

polyklonal Maus anti pERK1/2 und anti ERK2	Santa Cruz, USA
polyklonal Ziege anti FPR	Santa Cruz, USA
polyklonal Kaninchen anti FPRL-1	Acris, Hiddenhausen
polyklonal Ratte anti Maus-SR-MARCO	Serotec, USA
polyklonal Kaninchen anti GAPDH	Santa Cruz, USA
monoklonal Maus anti Phosphoserin/-threonin/-tyrosin	Genetex, USA

Verwendete sekundäre Antikörper:

Kaninchen anti Ratte Peroxidase	Sigma, Deisenhofen
Ziege anti Maus Peroxidase	Sigma, Deisenhofen
Ziege anti Kaninchen Peroxidase	Dianova, Hamburg
Esel anti Ziege Peroxidase	Dianova, Hamburg
Kaninchen anti Ziege Cy3	Sigma, Deisenhofen
Ziege anti Kaninchen AlexaFluor488	Molecular Probes, USA
Ziege anti Ratte AlexaFluor488	Molecular Probes, USA
Esel anti Ziege AlexaFluor488	Molecular Probes, USA

2.6 Gebrauchsfertige Kits

siRNA-Transfektion: *Primefect®*

Lonza, USA

Transfektion der HEK-Zellen: *Lipfectamine™ 2000*

Invitrogen, Karlsruhe

Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Kit

Amersham Pharmacia

Biotech, UK

cAMP [³H] assay system

Amersham, Braunschweig

RNA-Extraktion: *peqGOLD TriFast*

peqLab, Erlangen

RQ1 RNase-Free DNase-Kit

Promega, USA

2.7 Lösungen und Kulturmedien

Elektrodenpuffer (Laufpuffer, pH 8,2)

12,2 g Tris

57,6 g Glycin

4 g SDS (Sodiumdodecylsulfat)

auf 4 l mit A. dest. auffüllen

Gelpuffer I (pH 8,8)

1,5M Tris HCl

0,4% SDS, pH 8,8

Gelpuffer II (pH 6,8)

0,5M Tris HCl

0,4% SDS

Hepes-Puffer

150 mM NaCl

20 mM Hepes

5 mM EDTA

3 mM EGTA

Proteinaseinhibitoren (s. Homogenisierungspuffer)

Dodecyl- β -maltosid (4mg/ml)

Homogenisierungspuffer (pH 7,6)

10 mM Tris

5 mM EDTA

3 mM EGTA

250 mM Sucrose

Proteinaseinhibitoren (10 μ g/ml Leupeptin, 1 μ g/ml Pepstatin A, 1 μ g/ml Aprotinin, 0,2 mM

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 10 μ g/ml Bacitracin)

Idoacetamid (1,85 mg/ml; 10 mM)

Lauffrontanzeiger

Bromphenolblau, gesättigte Lösung

Lysispuffer

50 mM Tris pH 7,5

100 mM NaCl

5 mM EDTA

1% Triton
2 mM Natrium-Vanadat
2,5 mM Natrium-Pyrophosphat
1 mM β -Glycerol-phosphat
1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid

SDS-Probenpuffer

0,23 g SDS
1,25ml Gelpuffer II
1ml Glycerin
50 mM DTT (Dithiotreitol)
mit Aqua dest. auf 10 ml auffüllen

TBS-T (Tris-buffered Saline Tween, pH 7,5)

50 mM Tris
150 mM NaCl
1 mM EDTA
0,1% Tween

Transferpuffer (pH 9,0)

25 mM Tris
192 mM Glycin
10% Methanol

Trenngel (12,5%)

2,5 ml Gelpuffer I
4,17ml Acrylamid
3,29ml Aqua dest.
60 μ l APS 10%
30 μ l TEMED

Tris/phosphat-bufferes saline (TPBS 15 x)

7,5 g Thimerosal
18,6 g Tris
135 g NaCl
0,2 M Phosphatpuffer:
132,8 ml Lösung A: 27,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ auf 1 l Aqua bidest. und

566,7 ml Lösung B: 35,63 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ auf 1 l Aqua bidest.

Die Substanzen werden in 800 ml Aqua bidest. gelöst, der pH auf 7,5 mit konzentrierter HCl eingestellt und auf 1 l aufgefüllt.

Zamboni-Fixierlösung

350 ml gesättigte Pikrinsäure und 80 g Paraformaldehyd werden in einer 500 ml Flasche auf 60°C erhitzt. Tropfenweise wird NaOH-Lösung dazugegeben bis das Paraformaldehyd gelöst ist. Das Gemisch wird in eine 2 l Flasche filtriert und mit Phosphatpuffer (6,62 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und 44,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ gelöst in 2 l Aqua bidest.) aufgefüllt.

Zellkulturmedien und Zusätze

- DMEM (*Dulbecco's modified Eagle-Medium*, Invitrogen)
- Einfriermedium (2x: 10 ml DMSO, 15 ml FKS, 25 ml DMEM Medium ohne Zusätze)
- FKS (fötale Kälberserum, Invitrogen, Endkonzentration im Medium: 10%)
- G418 (Geneticin, Stocklösung: 50 mg/ml)
- Trypsin/EDTA-Lösung: Die Trypsinkonzentration wird auf 0,05% in 1xPBS verdünnt. Auf 500 ml dieser Lösung werden 500 µl 0,5 M EDTA gegeben.
- Penicilin/Streptomycin (P/S, Biochrom)
- PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, Gibco, Belgien)
- Puromycin (2,5 mg/ml, Endkonzentration: 1 µg/ml)

3. Methoden

3.1 Versuchstiere

Für die Herstellung von primären Gliazellkulturen wurden Ratten vom Stamm Wistar genutzt. Verwendet wurden Tiere vom 2. oder 3. postnatalen Tag (P2, P3), wobei der Tag der Geburt als postnataler Tag null gilt.

3.2 Zellkulturen

3.2.1 Astrozyten

Die Zellen werden nach der Standardmethode von McCarthy und deVellis (1980) gewonnen: Nach Dekapitation von 4-6 neugeborenen Ratten (P2, P3) wurden die Hirne aus den Kalotten entfernt und in eine mit sterilem Phosphatpuffer (PBS, Gibco) gefüllte Petrischale verbracht und unter der sterilen Werkbank weiter präpariert. Unter dem Präparationsmikroskop (Vergrößerung x10) wurden nach Entfernung von Kleinhirn, *Bulbus olfactorius*, *Diencephalon* und *Hippocampus* die verbleibenden Kortexhälften vorsichtig von ihrem menigealen Überzug befreit. Danach wurden die Kortizes mit einem Skalpell zerkleinert und für zweimal 15 min im Wasserbad (37°C) durch Inkubation mit 10 ml Trypsin 0,05% enzymatisch dissoziiert. Nach mehrmaligem Aufziehen der Suspension in Pasteurpipetten mit verengtem Lumen und nachfolgender mechanischer Dissoziation durch einen Nylonfilter mit 20 µm Maschenweite erfolgte die Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Ausschluß. Je fünf Millionen vitale Zellen wurden in Kulturflaschen (25 cm² Grundfläche) ausgesät, mit 8 ml Kulturmedium überschichtet und bei 37°C und 5% CO₂-Begasung im Brutschrank kultiviert. Das Medium wurde nach einem Tag gewechselt, anschließend zweimal in der Woche. Nach 10 Tagen erfolgte die Entfernung kontaminierender Neurone, Oligodendrozyten und Fibroblasten mittels eines Rotationsschüttlers (200 U/min, Gerhardt, für 24 Stunden) und gleichzeitiger Gabe des Mitose-Hemmstoffes 5-Fluoro-2'-deoxyuridin (FDU, Sigma, 10⁻⁵ M). Am 16. Tag wurden die Zellen mit einer Lösung aus 3 mg Trypsin/30 mg EDTA in 25 ml PBS (Ca²⁺/Mg²⁺-frei) überschichtet. Nach 15 Sekunden wurde die Lösung abgesaugt und die Flasche für 3 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit 3 ml Medium von der Oberfläche entfernt. Die endgültige Dissoziation wurde mit einer englumigen Pasteurpipette erreicht. Durch Aussaat in große Plastik-Petrischalen (Durchmesser 10 cm; für 20 min bei 37°C) und geringe Zelldichte (5000 Zellen/cm²) wurden schnell adhätierende Mikrogliazellen entfernt, um den Reinheitsgrad der Kultur zu erhöhen. Nach etwa fünf Tagen bildete sich

ein konfluenter Zellrasen aus. Die Überprüfung der Reinheit der Kulturen erfolgte mit einem Antikörper gegen das saure Glia-Filamentprotein (GFAP), einem Zytoskelettprotein der Astrozyten.

3.2.2 Mikroglia

Da Astrozytenkulturen immer eine Anzahl von Mikroglia-Progenitorzellen beinhalten (Richardson et al., 1993), lassen sich aus den Kulturen diese Zellen isolieren und kultivieren. Dazu wurde eine Astrozyten-Primärkultur angelegt, die von Beginn an mit fetalem Kälberserum versorgt wurde, das bei 44-53 °C für 30 min. inaktiviert wurde. Etwa nach dem 10. Kulturtag (und ca. 20 Tage lang) proliferierte in so angelegten Kulturen die Mikroglia, die als frei flottierender Zellrasen mit dem Medium abgesaugt werden konnte. Nach einem Zentrifugationsschritt (500 x g, 5 min.) konnte der Zelleniederschlag in wenig Medium aufgenommen und in den gewünschten Zelldichten in 35 mm-Kulturschalen (Sarstedt) ausgesät werden. Die Kultur erfolgte in DMEM + 10% fetalem Kälberserum (FKS, 56°C) + 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung (P/S). Kontaminierende Astrozyten wurden beseitigt, indem die Zellen für 5-10 min auf Plastikschalen beschichtet und die nicht-adhären Zellen abgestrichen wurden. Dieser Schritt erhöht die Reinheit der Mikroglia auf über 98%. Zuvor schätzten wir die Zellzahl und Vitalität mittels Trypan-Blau-Aufschluss ein.

3.2.3 Transfektion der Astrozyten mit *small interfering RNA* (siRNA)

Bei dem Prinzip der RNA-Interferenz (RNAi) handelt es sich um eine neue Methode der temporären Genausschaltung auf der mRNA-Ebene. In die Zielzelle werden kurze doppelsträngige RNA-Fragmente eingeschleust, die sog. „*small interfering RNA*“ (siRNA). Diese werden in den Proteinkomplex RISC (*RNA induced slicing complex*) inkorporiert, was wiederum Endonukleasen der Zelle dazu veranlasst, die zur siRNA komplementäre zelleigene mRNA zu zerschneiden (Cullen, 2002). Die resultierende Abnahme der Expression des entsprechenden Gens ermöglicht es, Hinweise auf die physio- und pathologische Bedeutung der entsprechenden Gene beziehungsweise der durch diese kodierten Proteine zu erhalten.

Mit Hilfe der siRNA-Transfektion war es uns möglich, die Aktivierung von MAPK in Astrozyten zu untersuchen, bei denen selektiv die mRNA und damit konsekutiv die Rezeptorproteine von FPRL-1, FPR oder SR-MARCO herunterreguliert waren. Die Effizienz der Expressionsabnahme wurde durch Real-Time-PCR und Western Blot-Analyse überprüft.

Die Transfektion der Astrozyten erfolgte mittels eines Standardprotokolls der Firma Lonza, USA (PrimeFect siRNA Transfection Reagent).

Hierfür wurden am Vortag der Transfektion 3×10^5 Astrozyten pro Vertiefung in einer 6-Loch-Zellkulturplatte, die DMEM-Medium mit 10% FKS enthielt, ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Tag der Transfektion wurde das Medium entfernt und durch Serum-freies DMEM-Medium ersetzt. Das Transfektionsreagenz wurde hergestellt, indem 250 µl PrimeFect Verdünnungslösung, 5 µl PrimeFect siRNA Transfektionsreagenz und 37,5 µl der jeweiligen 1µM siRNA in Eppendorf-Gefäß pipettiert wurden (Kontroll-siRNA Cat.No: 1022076, MARCO SI01895103, FPR SI01990079, FPRL-1 SI01984647; alle von Qiagen, Germany). Die Zielsequenzen für die siRNA der jeweiligen Rezeptoren der Ratte lauteten wie folgt: FPR (AAGTTCATATATACTGTAATA), FPRL-1 (AACCAAGTGATACAGGCACAAA), MARCO (AAGGGAGAACCTGGGATGAAA), die der Kontroll-siRNA (AATTCTCCGAAGGTG TCACGT).

Die verwendete Kontroll-siRNA hat keine Homologie zu anderen bekannten Säuger-Genen, was einen nur minimalen Effekt auf die Genexpression sicherstellt. Die verwendeten siRNAs wurden mit 100 mM NaCl in 50 mM Tris, pH 7,5 gelöst, was in Nuklease-freiem Wasser angesetzt war. Die so hergestellte siRNA-Reagenz-Lösung wurde nun tropfenweise auf die Vertiefungen der Zellkulturplatten gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Das erhaltene Volumen betrug ca. 1,5 ml pro Vertiefung, was einer siRNA-Konzentration von ca. 25 nM entspricht. Bis zur Durchführung der weiteren Analysen wurden die Astrozyten für 96 h bei 37°C inkubiert. Die Effizienz der siRNA-Transfektion wurde daraufhin durch Messung der mRNA-Menge durch SYBR *Green Real-Time*-PCR und der Rezeptorproteinexpression durch Western Blot-Analysen überprüft.

3.2.4 Allgemeine Handhabung der HEK293-Zellen

Humane embryonale Nierenzellen (HEK293, *American Type Culture Collection*, USA; (Graham et al., 1977)) wurden bei 37°C und 10% Kohlendioxid in 1% P/S-Lösung kultiviert. Grundlage der dauerhaften Kultivierung bildete DMEM, welchem 10% FKS und die den transfizierten Expressionsplasmiden entsprechenden Antibiotika zugesetzt wurden. Das Medium der Zellen wurde regelmäßig alle 2-3 Tage erneuert. Dazu musste das Medium mit der Pipette steril abgesaugt werden (Vakuumpumpe), ohne dabei die *Monolayer*-Kultur zu beschädigen. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit frischem, auf 37°C vorgewärmtem, Medium bedeckt. Danach erfolgte die Reinkubation bei 37°C und 10% Kohlendioxid im Brutschrank. Sobald die Flaschen konfluent bewachsen waren, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen

vorsichtig mit PBS gewaschen. Nach der Entfernung des PBS wurden die Zellen durch Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung und leichtes Klopfen auf den Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Die Zellsuspension wurde dann im Verhältnis 1:6 bis 1:10 auf neue Kulturgefäße mit frischem Medium verteilt. Die längerfristige Aufbewahrung der Zellen erfolgte in Einfriermedium bei -196°C (flüssiger Stickstoff).

3.2.5 Transfektion und Selektion der HEK293-Zellen

Die Transfektionen wurden mit Hilfe des micellenartigen Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 (Invitrogen) durchgeführt. Für die Transfektion wurden circa 10^5 HEK293-Zellen pro Vertiefung in 6-Loch-Zellkulturschalen ausgesät und in DMEM, welches 10% FKS enthielt, bis zu einer Konfluenz von bis zu 70-80% über Nacht bei 37°C kultiviert. Nach dem Erreichen der Konfluenz wurden jeweils in zwei Reaktionsgefäßen zwei Ansätze vorbereitet: 1. 4 μg DNA des entsprechenden Plasmids in 250 μl DMEM und vorsichtig gemischt. 2. 10 μl Lipofectamine 2000 in 250 μl DMEM und vorsichtig gemischt. Nach fünf Minuten bei Raumtemperatur wurden beide Ansätze gemischt und der Ansatz für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit einer Pipette kreisförmig auf die Zellen und das Medium getropft. Die Kulturschalen wurden dann über Nacht bei 37°C kultiviert und die Zellen am nächsten Tag im Verhältnis 1:6 passagiert. Stabil transfizierte Zellen wurden durch den Zusatz des Selektionsantibiotikums am darauf folgenden Tag selektiert. Für das hFPRL1-pcDNA3.1-Plasmid wurde der Zusatz von 500 μg G418 pro ml Medium verwendet. Das Plasmid enthält ein Resistenzgen (Neomycin-Phosphotransferasegen), dessen Aktivität eukaryontische Zellen resistent gegen das Neomycinanalogon G418 macht. Das hMARCO-pEAK10-Plasmid enthält ein Puromycin-Resistenzgen. Die damit transfizierten Zellen wurden durch Zusatz von 1 μg Puromycin pro ml Medium selektiert. Um eine hFPRL-1-Zelllinie zu erzeugen, die gleichzeitig hMARCO koexprimiert, wurden die Zellen einer zweiten Transfektionsprozedur mit dem pEAK10-hMARCO-Plasmid unterzogen und anschließend in Anwesenheit von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin und 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 selektiert. Die längerfristige Aufbewahrung der Zellen erfolgte in Einfriermedium bei -196°C (flüssiger Stickstoff).

3.3 Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration

Für den cAMP-Assay wurden ungefähr $1,5 \times 10^5$ Astrozyten bzw. 5×10^5 Mikroglia pro Vertiefung auf 22-mm mit Poly-L-Lysin beschichteten 12-Loch-Zellkulturplatten, die mit

DMEM-Lösung (mit 10% FKS) beschickt waren, am Vortag ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Behandlung der Zellen erfolgte für 15 min bei 37°C in Serum-freien DMEM-Medium, das 10 µM Forskolin (für Astrozyten; Sigma, Germany) bzw. 25 µM Forskolin (für Mikroglia) enthielt. Es wurden unterschiedliche Forskolin-Konzentrationen benutzt, da Astrozyten und Mikroglia-Zellen sich hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit auf die durch Forskolin stimulierte Adenylatcyclase-Aktivität unterscheiden. Die Lösungen enthielten außerdem je nach Ansatz die Agonisten fMLF, A β_{1-42} , das Kontrollpeptid A β_{42-1} (jeweils 1 µM) und Fucoidan (100 µg/ml). Um den verantwortlichen Rezeptor für die Veränderung der Adenylatzyklase-Aktivität ausfindig machen zu können, wurden die Zellen in einigen Ansätzen zusätzlich mit WRW4 (Tryptophan-Argenin-(Tryptophan)₄; 10 µM), einem spezifischen Peptid-Antagonisten für FPRL-1, oder mit dem SR-A-Liganden Fucoidan für 30 min beziehungsweise für 15 und 30 min präinkubiert.

Nach der Behandlung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, die Zellkulturplatten sofort auf Eis gestellt und die Zellen mit 1 ml eiskalter Salzsäure/Ethanol-Lösung, Mischungsverhältnis: 1/100 (1M HCl/100% Ethanol) lysiert und in Reaktionsgefäße überführt. Nach dem vollständigen Eindampfen der Proben in der Vakuumzentrifuge (für ca. 2h) wurden die Pellets in Tris-EDTA-Pufferlösung (Amersham) resuspendiert. Die Bestimmung der cAMP-Konzentration erfolgte nach Anleitung und mit Hilfe des „cAMP [³H] assay system“ der Firma Amersham (Braunschweig).

Das Prinzip des Assays basiert auf einer Kompetition zwischen unmarkiertem cAMP und einer stets konstanten Menge [³H]-markierten cAMP um eine hochaffine und hochspezifische Bindungsstelle eines cAMP-bindenden Proteins. Die gebundene Radioaktivität des Proteins wird indirekt mittels Szintillatorflüssigkeit im β -Counter ausgewertet. Je mehr [³H]-markierten cAMP am Protein gemessen wird, desto geringer ist der Anteil an unmarkiertem cAMP in der Probe.

Diese Methode ermöglicht es, durch Messung der cAMP-Konzentration die Aktivität der Adenylatzyklase zu bestimmen, die die Reaktion von cAMP aus ATP katalysiert. Anhand der durch Agonisten induzierten intrazellulären cAMP-Spiegel-Veränderungen und der Aufhebung derselben durch spezifische Rezeptorantagonisten oder -agonisten können Rückschlüsse auf die Beteiligung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die die Adenylatzyklase entweder stimulieren (G_s) oder inhibieren (G_i), gezogen werden.

3.4 Western Blot-Analysen

3.4.1 Allgemeines

Unter anderem löst eine Stimulation von GPCRs wie FPRL-1 mit Rezeptor-spezifischen Liganden eine Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen ERK1 und 2 aus, die sich an der Signalweitergabe vom Zytosol in den Zellkern beteiligen. Diese Proteinkinasen, die zur Gruppe der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) gehören, sind Serin/Threonin-Kinasen. Für viele GPCRs ist bereits beschrieben worden, dass nach einer Ligandenbindung innerhalb von wenigen Minuten ERK1 und ERK2 transient phosphoryliert werden (Luttrell et al., 1997).

Wir verwendeten die Western Blot-Analyse dazu, um den Einfluss von A β ₁₋₄₂ auf die Aktivierung von ERK1/2 zu überprüfen. Durch Verwendung spezifischer Agonisten und Antagonisten wollten wir untersuchen, ob FPRL-1 und MARCO daran beteiligt sind. Desweiteren wurden Western Blots im Rahmen der Koimmunopräzipitation gegen die Rezeptorproteine FPR, FPRL-1 und MARCO sowie gegen Phosphoserin/-threonin/-tyrosin durchgeführt.

3.4.2 Behandlung

Für die Western Blot-Analysen wurden $1,5 \times 10^5$ Astrozyten pro Vertiefung bzw. 5×10^5 Mikroglia pro Vertiefung in 12-Loch-Zellkulturplatten, die DMEM-Medium mit 10% FKS enthielten, ausgesät und für 48 h bei 37°C inkubiert.

Die WRW4 (10 μ M) enthaltenden Ansätze wurden mit diesem für 15 min, die Fucoidan enthaltenden für 0, 15 und 30 min bei 37°C in Serum-freiem DMEM-Medium präinkubiert. Danach erfolgte in Abhängigkeit vom Behandlungsschema die Behandlung mit A β ₁₋₄₂ (1 μ M), Fucoidan (100 μ g/ml), fMLF (1 μ M) oder dem Kontrollpeptid A β ₄₂₋₁ für 5 min bei 37°C in Serum-freiem DMEM-Medium.

Für die Koimmunopräzipitation wurden die Zellen entweder mit A β ₁₋₄₂ oder Fucoidan für jeweils 30 min behandelt.

3.4.3 Zellaufarbeitung und Zellyse

Nach der Behandlung wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gespült und anschließend durch Zugabe von 100 μ l frisch angesetztem Lysis-Puffer mit einem Zellschaber vom Boden der Schale abgelöst und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Protein-Aliquots (30 μ g für FPR, FPRL-1 und MARCO, 5 μ g für pERK1/2 und

ERK2, 3 µg für GAPDH in je 20 µl) wurden in SDS-Probenpuffer angesetzt und danach für 5 min bei 99°C gekocht. Das anionische Detergenz SDS umhüllt dabei das geladene vorliegende Protein derart, dass eine Trennung anhand des Molekulargewichts möglich ist.

3.4.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der durch Fanger (1987) modifizierten Methode von Bradford (1976). Dazu wurden jeweils 10 µl Proteinprobe zu 790 µl destilliertem Wasser (Aqua dest.) und 200 µl Bio-Rad Protein-Assay-Lösung zugegeben und in den Eppendorf-Gefäßen gut durchmischt. Die Proben wurden für mindestens 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Extinktionen bei 595 nm Wellenlänge im Photometer bestimmt wurden. Die Proteinmenge wurde anhand eines Vergleiches mit einer Rinderserumalbumin-(BSA)-Standardreihe bestimmt und entsprechende Protein-Aliquots angesetzt.

3.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Für die Trennung der zu untersuchenden Proteine (FPR, FPRL-1, MARCO, MAP-Kinasen, GAPDH) wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in einem Tris-HCl-Glycin-Puffersystem durchgeführt. Diese Methode ermöglicht eine hohe Auflösung und Bandenschärfe der Proteine. Für die Versuche wurden Trenngele mit einem Acrylamid-Gehalt von 12,5% verwendet, was eine optimale Trennung der untersuchten Proteine gewährleistete.

Äquivalente Proteinmengen der Proben in SDS-Probenpuffer wurden in die Vertiefungen der Sammelgele eingefüllt und mit Laufpuffer überschichtet. Zusätzlich zu den Proben wurde auf jedes Gel ein geeigneter Molekulargewichts-Standard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit einer Stromstärke von 125 mA und einer Spannung von 200 V für zwei Gele für ca. 35 min durchgeführt, bis die bromphenolblaue Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte. Das Gel wurde vorsichtig aus den Glasplatten gehoben und in Laufpuffer eingelegt.

3.4.6 Übertragung der Proteine auf PVDF-Membran

Nach der elektrischen Auftrennung der Proben erfolgte der Transfer der Proteine aus der Gelmatrix des Trenngels auf eine PVDF-Membran (Hybond-P, Amersham) mit Hilfe des Halbtrocken-Verfahrens unter Benutzung einer Graphit-Kammer (Biorad). Hierzu

wurde eine PVDF-Membran in der Größe des Trenngeles für ca. 1 min mit Methanol befeuchtet, anschließend in Aqua dest. gewaschen und für mindestens 15 min in Transferpuffer gelagert.

Für die Schichtung des Blots wurden zuerst zwei in Transferpuffer eingeweichte Stücke Whatmann-Pappe auf die mit Transferpuffer befeuchtete Anodenplatte gelegt. Es folgten die PVDF-Membran, das Polyacrylamid-Gel und abschließend wieder zwei in Transferpuffer eingeweichte Stücke Whatmann-Pappe. Die Luftblasen wurden vorsichtig aus dem Stapel heraus gestrichen und die mit Transferpuffer befeuchtete Kathodenplatte aufgesetzt und die Stromversorgung eingerichtet. Die Transferzeit, die abhängig von der Gelporengröße und dem Proteingehalt ist, betrug ca. 1 h und 15 min. Die angelegte Stromstärke ist abhängig von der Gelgröße und wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Betriebsstromstärke [mA]} = \text{Fläche des Gels [cm}^2\text{]} \times 0,85 \text{ [mA]}$$

Somit erfolgte die Immobilisation der aufgetrennten Proteine auf der PVDF-Membran bei einer Stromstärke von 340 mA und einer Spannung von 25 V für zwei Gele.

Nach dem Transfer wurde die Membran aus der Blotapparatur entnommen und für 1 h in einer Lösung aus 5% Kasein in TBS-T geschwenkt. Dieser Schritt diente der Blockade der freien Bindungsstellen der PVDF-Membran. Anschließend wurde die Membran gründlich mit TBS-T gewaschen und möglichst blasenfrei mit 1 ml des in TBS-T gelösten primären Antikörpers gegen die untersuchten Proteine [FPR (1:100), FPRL-1 (1:100), GAPDH (1:250), monoklonal Maus anti pERK1/2 (1:500) bzw. anti ERK2 (1:500, alle von Santa Cruz, USA), MARCO (1:1000; Serotec, USA) und anti Phosphoserin/-threonin/-tyrosin (1:500; Genetex, USA) luftdicht eingeschweißt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die PVDF-Membran kurz in TBS-T ab gespült und dreimal für jeweils 15 min in demselben gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der in TBST-Lösung angesetzt war, für 1 h unter leichtem Schwenken. Danach wurde die Membran erneut dreimal für 15 min in TBS-T unter Bewegung gewaschen. Der sekundäre Antikörper (goat-anti-mouse-Peroxidase, 1:20000 und rabbit-anti-rat-Peroxidase, 1:12000; beide von Sigma; goat-anti-rabbit-peroxidase, 1:30000 und donkey-anti-goat-peroxidase, 1:20000; beide von Dianova) ist an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt, was eine Detektion des Komplexes mit einem verstärkten Chemilumineszenz-System erlaubte.

3.4.7 Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexe

Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe mit dem verstärkten Chemilumineszenz-System im Immunoblot wurde mittels eines kommerziell erhältlichen ECL (*Enhanced chemoluminescence analysis*)-Kit der Firma Amersham durchgeführt. Bei der ECL-

Reaktion kommt es unter alkalischen Bedingungen zur Peroxidase/H₂O₂-katalysierten Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol. Dabei befindet sich Luminol kurzzeitig in einem angeregten Zustand. Im Beisein von chemischen Verstärkern wird unter Emission von Lichtquanten dieser Zustand wieder verlassen. Durch Auflegen eines Röntgenfilms auf den mit ECL-Kit behandelten Blot kommt es zur Schwärzung. Die Intensität des emittierten grünen Lichts ist dabei proportional der Menge der untersuchten Proteine, so dass nach Scannen des entwickelten und belichteten Röntgenfilms relative Veränderungen zwischen den untersuchten Proben quantitativ erfasst bzw. einer objektiveren densitometrischen Analyse zugeführt werden können.

Eine erste Lösung enthält das Luminol, welches bei der Oxidation mit dem Wasserstoffperoxid aus der zweiten Lösung eine Chemilumineszenz entwickelt. In der zweiten Lösung befindet sich außer dem Substrat der Meerrettichperoxidase, dem Wasserstoffperoxid, eine Verstärkersubstanz, die eine stärkere und länger anhaltende Chemilumineszenz bewirkt. Die PVDF-Membran wurde mit 2,5 ml der beiden Detektionslösungen (Verhältnis 40:1) für 5 min inkubiert und die bei der ablaufenden Reaktion entstandene Lumineszenz anschließend auf ECL-empfindlichen Filmen sichtbar gemacht.

3.5 Koimmunopräzipitation

3.5.1 Allgemeines

Die Koimmunopräzipitation ist eine Methode, um eine vermutete Protein-Protein-Wechselwirkung nachzuweisen. Ein Protein P1 wird mittels eines gegen P1 gerichteten Antikörpers präzipitiert. Andere Proteine (P2, P3, etc.), die sich in der Zelle bzw. an der Zytoplasmamembran in einem Komplex mit P1 befinden, können dabei mit P1 präzipitiert, also kopräzipitiert werden. Das Immunopräzipitat kann beispielsweise mittels SDS-PAGE auf seine Zusammensetzung hin untersucht werden. Die auf diese Weise im Präzipitat nachgewiesenen Proteine interagieren mit hoher Wahrscheinlichkeit mit P1.

3.5.2 Zellaufarbeitung und Zellyse

Nach der Behandlung gemäß **Abschnitt 3.4.2** wurden die Medien aus den Schalen entfernt, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer 30 min auf Eis geschwenkt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Schale entfernt und 2 min mit Hilfe eines Homogenisators aufgearbeitet. In einem ersten Zentrifugationsschritt über 5 min bei 500 x g und 4 °C

wurden unaufgeschlossene Zellen und Zellkerne vom Homogenat abgetrennt. Die sich im Überstand befindlichen Zellmembranen wurden in einer zweiten Zentrifugation über 30 min bei 20.000 x g und 4°C sedimentiert, anschließend in 1ml HEPES-Puffer, welcher N-Dedocyl- β -Maltosid zur Membranauflösung enthielt, aufgenommen und mindestens 1 h auf Eis geschüttelt. Das Lysat wurde dann nochmals 30 min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert und der resultierende Überstand für die Immunpräzipitation verwendet.

3.5.3 Koimmunopräzipitation

Vor der Immunopräzipitation mussten pro Probe 50 μ l Protein G-Agarose Kügelchen (Santa Cruz; sc-2002) mit 5 μ g Antikörpern beladen werden (anti-FPR und -FPRL-1; 1:100; Santa Cruz, USA). Dazu wurden die Kügelchen zweimal vorsichtig mit HEPES-Puffer ohne Maltosid gewaschen, um anschließend mit 800 μ l desselbigen Puffers und der Antikörperlösung überschichtet zu werden. Die Kügelchen wurden dann für mindestens 4 h bei 4°C und leichtem Schütteln inkubiert. Nachdem sie wieder sedimentiert und gewaschen wurden, konnten die Kügelchen mit dem resultierenden Überstand der dritten Zentrifugation aus **Abschnitt 3.5.2** überschichtet werden und über Nacht bei 4°C und leichter Bewegung die Rezeptoren FPR- oder FPRL-1 und die daran gebundenen Proteine bzw. Rezeptoren binden. Am nächsten Tag wurden die Kügelchen durch Zentrifugation vom Überstand getrennt und fünfmal mit kaltem HEPES-Puffer ohne Maltosid gewaschen. Durch Zugabe von 200 μ l SDS-Probenpuffer und 20-minütiger Inkubation bei leichtem Schütteln und 60°C wurden die Immunpräzipitate von den Kügelchen eluiert und nach dem Erkalten gleiche Proteinmengen auf das Gel aufgetragen und weiter wie in **Abschnitt 3.4.5 bis 3.4.7** verfahren.

3.6 Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und Real-Time-PCR

3.6.1 Isolierung von RNA

Für die RNA-Isolierung benutzten wir den peqGOLD TriFast-Kit (peqLab, Germany). Diese Methode basiert auf einer Einschnitt-Flüssigphasen-Separation. Die mit siRNA vorbehandelten Astrozyten wurden durch Zugabe von 1 ml peqGold TriFast-Lösung direkt in die Zellkulturschalen und mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette lysiert. Das in peqGOLD Trifast enthaltene Phenol und Guanidinisothiocyanat bewirkt eine Homogenisierung der Zellen in einphasiger Lösung. Nun wurden die Proben für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu

gewährleisten. Für die Phasentrennung wurden die Proben in Eppendorfgläser überführt, anschließend 200 µl Chloroform zugegeben und für 15 s kräftig geschüttelt. Danach wurden die Proben 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 12.000 x g bilden sich drei Phasen: eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase (DNA und Proteine), eine obere wässrige Phase (RNA) und eine dazwischen liegende Interphase (DNA und Proteine). Die wässrige Phase wurde in ein frisches Röhrchen überführt und die RNA mit 500 µl Isopropanol präzipitiert. Die Proben wurden gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nun schloss sich eine 10-minütige Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C an, nach der sich das gelartige RNA-Präzipitat an der unteren Seite der Röhrchen befand. Der Isopropanolüberstand wurde vorsichtig abgenommen und das RNA-Pellet zweimal mit 1 ml 75% Ethanol durch Schütteln und anschließende Zentrifugation (10 Minuten, 12.000 x g, 4°C) gewaschen. Abschließend wurde das RNA-Pellet 10 min luftgetrocknet, durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit der Pipette in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und auf 60°C erhitzt. Bei -70°C kann die RNA für mehrere Monate gelagert werden.

Die Ausbeute an RNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wird am Photometer von einer 100-fachen Verdünnung der RNA-Lösung in Aqua bidest. ein Absorptionsspektrum zwischen 240 und 300 nm aufgenommen. Das Absorptionsmaximum sollte bei 260 nm liegen, das Verhältnis A₂₆₀ zu A₂₈₀ (Proteine) möglichst nahe bei 2 sein und 1,7 nicht unterschreiten (Delidow et al., 1996). Eine Absorption von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Aus dem maximalen Absorptionswert des Spektrums lässt sich mit dieser Angabe die Konzentration der RNA berechnen.

3.6.2 DNase-Verdau

Mit der aus den Astrozyten isolierten RNA wurde zunächst ein DNase-Verdau nach Anleitung eines DNase-Kits (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) durchgeführt, um die restlichen DNA-Kontaminationen zu beseitigen. Dafür wurden die zu untersuchenden Proben mit folgendem Reaktionsansatz behandelt, der für 15 min bei 37°C in einem Thermocycler inkubiert wurde:

Reaktionsansatz für den DNase-Verdau

8 µl	Probe (ca. 1-3 µg Einsatz aus RNA-Isolierung + A. dest.)
1 µl	RQ1 RNase-freies DNase 10 x Reaktionspuffer
1 µl	<u>RQ1 RNase-frei DNase</u>
10 µl	Endvolumen

Zur Inaktivierung der DNase wurde 1 µl RQ1 DNase Stop Solution (20 mM EDTA, pH 8) beigefügt, 15 min bei 65°C inkubiert und die Proben danach auf Eis gestellt. Im Anschluss an den DNase-Verdau wurde für einen Reaktionsansatz zur Bestimmung eines einzelnen Zielgens 160 ng verdaute RNA eingesetzt.

3.6.3 Durchführung der PCR

Um die Effizienz der Expressionsabnahme der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Rezeptoren zu überprüfen, bedienten wir uns der Real-Time-PCR. Zunächst wurde mittels einer Reversen Transkriptase (Fermentas, Canada) die zu untersuchende RNA in eine einzelsträngige cDNA (*complementary* oder *copy* DNA) umgeschrieben, die in der darauf folgenden PCR als Matrize für die Synthese komplementärer DNA-Sequenzen fungierte. Bei der RT-Reaktion dienten oligo-(dT)₁₅-Primer (Promega, USA), die mit den poly-A-Enden der mRNA-Sequenzen hybridisieren, als Startpunkt für das Enzym Reverse Transkriptase. Die anschließend durchgeführte PCR beruht darauf, dass ein eingesetztes sequenzspezifisches Primerpaar einen bestimmten cDNA-Abschnitt erkennt, mit diesem hybridisiert (*Annealing*) und somit als Startpunkt für eine DNA-Polymerase dient. Diese bildet nun unter Verwendung von Desoxynukleotiden einen zu der cDNA komplementären Strang (*Elongation*). Durch mehrmalige Wiederholung dieses Vorgangs wurde der spezifische DNA-Abschnitt exponentiell vermehrt und anschließend mittels Real-Time-PCR quantifiziert. Hierbei verwendet man DNA-Farbstoffe wie z. B. SYBR[®] Green I, die mit der doppelsträngigen DNA interkalieren, wodurch die Fluoreszenz dieses Farbstoffes ansteigt. Die Zunahme der Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Nach abgelaufener PCR kann eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, anhand derer die Fragmentlänge bestimmt werden kann, was eine Unterscheidung der PCR-Produkte erlaubt.

Nach dem DNase-Verdau (siehe **Abschnitt 3.6.2**) wurden zur Bestimmung jedes einzelnen Zielgens pro Reaktionsansatz 160 ng cDNA eingesetzt. Für die Durchführung der Real-Time-PCR wurde der QuantiTect SYBR Green RT-PCR-Kit und QuantiTect Primer Assays der Firma Qiagen verwendet und folgende Reaktionskomponenten eingesetzt:

Reaktionsansatz für Real-Time-PCR (QuantiTect Primer Assays)

<u>Rezeptor</u>	<u>Katalog-Nr.</u>
FPR:	QT00465703
FPRL-1:	QT00462672
MARCO:	QT00425684

12,5 µl	2 X SYBR Green PCR Master Mix
5 µl	10 X QuantiTect Primer Assay
4 µl	cDNA (" <i>template RNA</i> ", 160 ng)
<u>3,5 µl</u>	<u>RNase freies Wasser</u>
25 µl	Endvolumen

Reaktionsansatz für Real-Time-PCR (GAPDH-Kontrolle)

12,5 µl	2 X SYBR Green PCR Master Mix
1,5 µl	<i>forward primer</i> (TCTACCCACGGCAAGTTCAAC)
1,5 µl	<i>reverse primer</i> (TCTCGCTCCTGGAAGATGGT)
4 µl	cDNA (" <i>template RNA</i> ", 10 ng)
<u>5,5 µl</u>	<u>RNase freies Wasser</u>
25 µl	Endvolumen

3.6.4 Auswertung und Darstellung der Daten der Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR wurde im ABI Prism Sequence Detection System 7000 (Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Hierbei wurden die Proben in einem ersten PCR-Schritt (Denaturierung) für 30 s auf 94°C erhitzt, um die doppelsträngige DNA aufzuschmelzen und in zwei komplementäre Einzelstränge zu trennen. Im zweiten Schritt (*Annealing*) wurde für die Anlagerung der Primer an die beiden Einzelstränge als Starter für die Polymerisation die Temperatur für 45 s auf 60°C herabgesetzt. In einem dritten Schritt fand unter gleichen Bedingungen die Elongation statt, um die Stränge zu komplementieren. Innerhalb des Zyklus wurde die DNA verdoppelt. Insgesamt fanden 40 Zyklen statt, wobei vor dem ersten Zyklus für 15 min denaturiert wurde und im letzten für 7 min bei 72°C elongiert wurde. Für die relative Quantifizierung wurde die Expression der verschiedenen Zielgene auf das Haushaltsgen GAPDH bezogen.

3.7 Doppelfluoreszenzmikroskopie

Dazu wurden am Vortag autoklavierte Deckgläschen (Ø 15 mm) in Zellkulturplatten (12 Vertiefungen) mit Poly-L-Lysin beschichtet. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Vertiefungen zweimal mit PBS gewaschen und DMEM mit 10% FKS vorgelegt. Danach wurden ungefähr $1,5 \times 10^5$ Astrozyten bzw. 5×10^5 Mikroglia ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf den Deckgläschen einmal mit PBS gespült und anschließend 30 min mit Zamboni-Lösung (4% Paraformaldehyd und 0,2% Pikrinsäure in Phosphatpuffer pH 6,9) fixiert. Nach

dreimaligem Waschen mit TPBS wurden die Zellen jeweils 3 min mit eiskaltem Methanol (erst 50%, dann 100%) permeabilisiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit TPBS schloss sich die Inkubation mit den polyklonalen Primär-Antikörpern bei 4°C über Nacht an (rabbit anti-FPR, 1:50, Santa Cruz; rabbit anti-FPRL-1, 1:500, Acris; rat anti-mouse-MARCO, 1:250, Serotec). Der Antikörper gegen FPRL-1 erkennt hierbei dessen extrazelluläre Domäne, sowohl in der Ratte, Maus als auch in der humanen Variante. Es folgte erneut dreimaliges Waschen mit TPBS. Anschließend wurden die Zellen mit dem jeweiligen Sekundär-Antikörper für anderthalb Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (sheep anti-mouse Cy3, Sigma, Germany; goat anti-rabbit oder donkey anti-goat Alexa Fluor 488, beide Molecular Probes, USA)

Desweiteren wurden die Kerne mit Bisbenzimid (Sigma, Germany) angefärbt. Die Deckgläschen mit den Zellen wurden im weiteren Verlauf wieder dreimal mit TPBS gewaschen, mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (70, 80, 90, 100% Ethanol) entwässert, mit Rotihistol I und II entfettet und abschließend mit „Immu-Mount“ (Thermo Electron Cooperation, USA) auf Objektträger eingedeckt. Die fertigen Träger wurden mittels eines Fluoreszenzmikroskops mit Apotom-Technik (Zeiss Axiovert; Zeiss, Göttingen) analysiert.

3.8 Datenanalysen

Alle Experimente wurden wenigstens in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Signifikanz der Differenz zwischen Test- und Kontrollgruppe wurde durch ANOVA (Analyse der Varianz) gefolgt von der Bonferroni-Methode ermittelt. Die Daten der cAMP-Messungen und der Real-Time-PCR wurden mittels des Programms GraphPad Prism 3.0 graphisch dargestellt. Die Proteinbanden auf den ECL-empfindlichen Filmen der Western Blot-Analysen wurden densitometrisch mittels des Computerprogramms PC-BAS 2.0 analysiert.

4. Ergebnisse

4.1 Hemmung der A β ₁₋₄₂- und Fucoidan-induzierten Gliazellaktivierung durch den FPRL-1-Antagonisten WRW4

4.1.1 Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung durch WRW4

Primäre Astrozyten und Mikroglia der Ratte wurden für 5 min mit A β ₁₋₄₂ behandelt und die Auswirkung auf die Aktivierung der MAP-Kinase ERK 1/2 durch Bestimmung der Zunahme an phosphoryliertem ERK1/2 untersucht. Um hierbei eine Beteiligung des G_i-Protein-gekoppelten Rezeptor FPRL-1 zu überprüfen, wurden die Zellen mit dem spezifischen FPRL-1-Antagonisten WRW4 für 30 min präinkubiert. Um eine Beteiligung von Scavenger-Rezeptoren bei der Gliazellaktivierung zu prüfen, untersuchten wir die Wirkung des SR-A-Liganden Fucoidan auf die ERK1/2-Phosphorylierung.

Wie **Abb. 2** demonstriert führt eine Behandlung beider Gliazellarten mit A β ₁₋₄₂ zu einem deutlichem Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 (Bande bei 44 bzw. 42 kDa). Die relativen Intensitätsunterschiede der Banden entsprechen in der densitometrischen Quantifizierung bei beiden Behandlungen einem 2-fachen (Astrozyten, s. **Abb. 2A**) beziehungsweise 3- bis 4-fachen (Mikroglia, s. **Abb. 2B**) Anstieg an phosphoryliertem ERK1/2 (pERK1/2) gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

Eine fünfminütige Behandlung mit dem SR-A-Liganden Fucoidan führte ebenfalls zu einer deutlichen Zunahme der ERK1/2-Phosphorylierung. Es kam zu einem zweifachen (Astrozyten, s. **Abb. 2A**) beziehungsweise vierfachen (Mikroglia, s. **Abb. 2B**) Anstieg der pERK1/2-Menge verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

Eine Präinkubation mit dem spezifischen FPRL-1-Antagonisten WRW4 konnte die A β ₁₋₄₂-induzierte ERK-1/2-Aktivierung in beiden Gliazellarten komplett hemmen. Interessanterweise zeigte sich, dass die Fucoidan-induzierte ERK1/2-Aktivierung ebenfalls durch den FPRL-1-Antagonisten signifikant inhibiert werden konnte (s. **Abb. 2A** u. **2B**).

Dagegen führte die alleinige Behandlung mit WRW4 und dem Kontrollpeptid A β ₄₂₋₁ zu keiner Änderung von pERK1/2. Die Kontrolle der Gesamtmenge an unphosphoryliertem ERK2 ergab eine ERK2-Bande bei 42 kDa mit konstanter Intensität, was bedeutet, dass die basale Proteinexpression von ERK 1/2 durch die Behandlung mit den eingesetzten Substanzen während aller Versuche nicht beeinflusst wurde (s. **Abb. 2A** u. **2B**).

Um herauszufinden, ob A β ₁₋₄₂ und Fucoidan um denselben Signaltransduktionsweg konkurrieren, behandelten wir die Gliazellen mit beiden Substanzen gleichzeitig, wobei mit Fucoidan für 0, 15 oder 30 min präinkubiert wurde. Ohne Präinkubation mit Fucoidan

kam es zu keiner Änderung der ERK1/2-Phosphorylierung verglichen mit einer alleinigen Behandlung mit A β ₁₋₄₂ oder Fucoidan. Jedoch kam es nach einer Präinkubation mit Fucoidan für 15 min zu einer leichten, nach 30 min sogar zu einer vollständigen Hemmung der Phosphorylierung von ERK1/2 in beiden Gliazellarten (s. **Abb. 2A** u. **2B**).

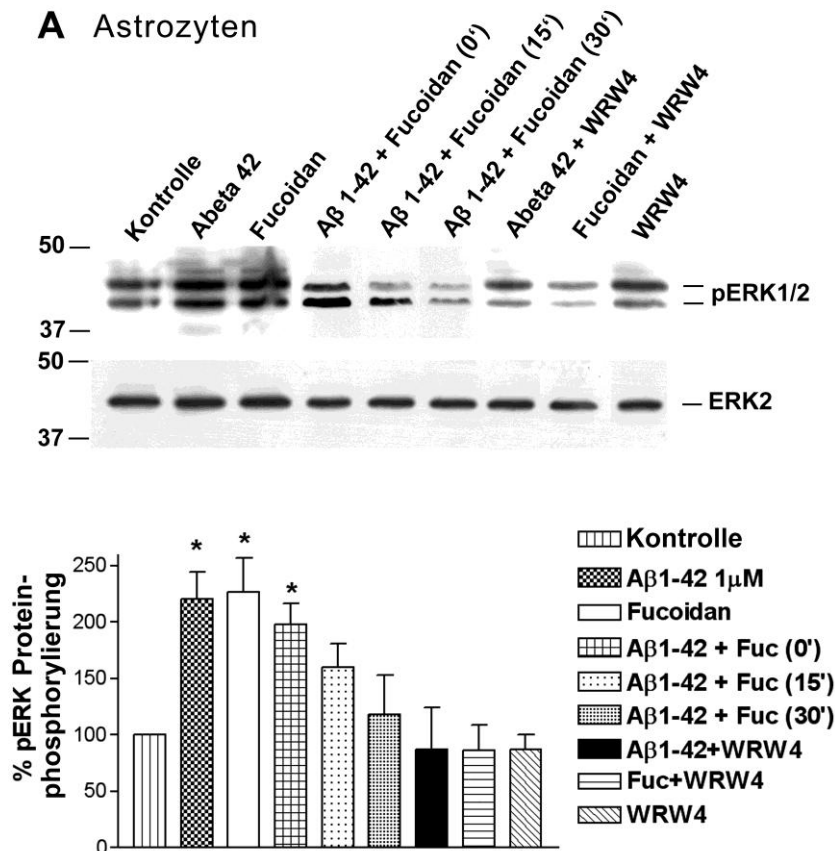


Abb. 2A Hemmung der A β ₁₋₄₂- und Fucoidan-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung durch WRW4 in Astrozyten. Für die Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung wurden Astrozyten jeweils mit 1 μ M A β ₁₋₄₂ oder 100 μ g/ml Fucoidan mit oder ohne 15-minütige Präinkubation mit 10 μ M WRW4 für 5 min bei 37°C behandelt. Für die gleichzeitigen A β ₁₋₄₂- und Fucoidan-Behandlungen wurden die Zellen für 0, 15 oder 30 min mit Fucoidan präinkubiert. Die Zellen wurden lysiert, Proteinaliquots (5 μ g) in SDS-Probenpuffer gelöst und die Menge an gesamten ERK2 und phosphoryliertem ERK1/2 mit Hilfe von Western Blot-Analysen bestimmt. Die Bandenpositionen von phospho-ERK1/2 (pERK1/2), Gesamt-ERK2 (ERK2) und die des Molekularmassen-Markers sind jeweils auf der rechten beziehungsweise linken Seite angezeigt. Die Werte entsprechen Mittelwerten \pm Standardabweichung der pERK1/2-Menge, die in 3 unabhängigen Experimenten mittels densitometrischer Quantifizierung in Astrozyten bestimmt wurden. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede (*, p < 0,05; **, p < 0,001) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

B Mikroglia

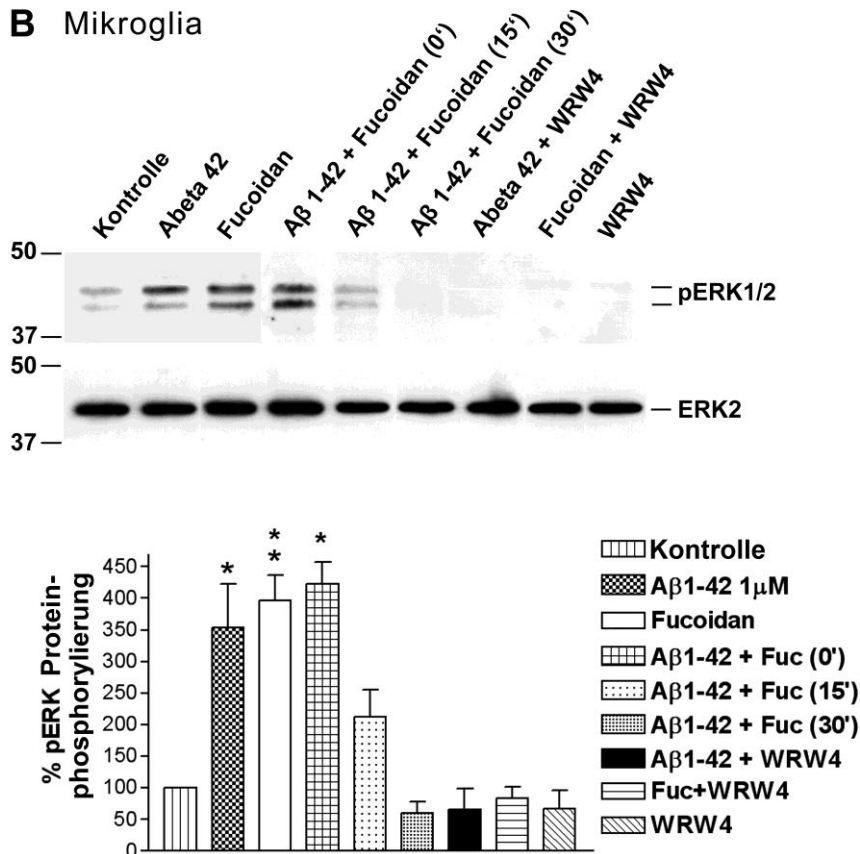


Abb. 2B Hemmung der Aβ₁₋₄₂- und Fucoidan-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung durch WRW4 in Mikroglia. Für die Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung wurden Mikroglia jeweils mit 1 μM Aβ₁₋₄₂ oder 100 μg/ml Fucoidan mit oder ohne 15-minütige Präinkubation mit 10 μM WRW4 für 5 min bei 37°C behandelt. Für die gleichzeitigen Aβ₁₋₄₂- und Fucoidan-Behandlungen wurden die Zellen für 0, 15 oder 30 min mit Fucoidan präinkubiert. Die Zellen wurden lysiert, Proteinaliquots (5 μg) in SDS-Probenpuffer gelöst und die Menge an gesamten ERK2 und phosphoryliertem ERK1/2 mit Hilfe von Western Blot-Analysen bestimmt. Die Bandenpositionen von phospho-ERK1/2 (pERK1/2), Gesamt-ERK2 (ERK2) und die des Molekularmassen-Markers sind jeweils auf der rechten beziehungsweise linken Seite angezeigt. Die Werte entsprechen Mittelwerten ± Standardabweichung der pERK1/2-Menge, die in 3 unabhängigen Experimenten mittels densitometrischer Quantifizierung in Mikroglia bestimmt wurden. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede (*, p<0,05; **, p<0,001) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

4.1.2 Hemmung der cAMP-Senkung durch WRW4

Mit dieser Versuchsreihe sollte geprüft werden, ob die Gliazellaktivierung durch Aβ₁₋₄₂ und Fucoidan in Zusammenhang mit der Aktivierung eines G_i-Proteins steht, indem die durch die Rezeptoraktivierung induzierte Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentration gemessen wurde. Dazu mussten die Gliazellen mit Forskolin vorstimuliert werden.

Wie **Abb. 3A** und **3B** zeigt, führte eine fünfzehnminütige Behandlung der Zellen mit Forskolin (10 μM für Astrozyten beziehungsweise 25 μM für Mikroglia), welches die Adenylatzyklase induziert, zu einem 5-fachen Anstieg (bis zu 5 pmol) der intrazellulären cAMP-Konzentrationen in Astrozyten und Mikroglia verglichen mit den unbehandelten Zellen.

Wurden die Zellen mit $\text{A}\beta_{1-42}$ (1 μM) oder dem SR-A-Liganden Fucoidan (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt, kam es zu einer Abnahme der Forskolin-induzierten cAMP-Akkumulation von ungefähr 80%. Der FPRL-1-Antagonist WRW4 (30 min Präinkubation) konnte sowohl die $\text{A}\beta_{1-42}$ - als auch die Fucoidan-induzierte Aktivierung des G_i -Proteins und die damit verbundene cAMP-Abnahme hemmen.

Analog zu den MAPK-Western Blot-Analysen prüften wir, ob beide Agonisten um denselben Signaltransduktionsweg konkurrieren. Die simultane fünfminütige Behandlung mit $\text{A}\beta_{1-42}$ und Fucoidan hatte keine signifikante Auswirkung auf die Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration. Dagegen führte eine fünfzehnminütige Präinkubation mit Fucoidan nur noch zu einer ungefähr 30%-igen, eine dreißigminütige Präinkubation zu keiner Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration in beiden Gliazellarten (s. **Abb. 3A** u. **3B**).

Eine alleinige Behandlung mit WRW4 oder dem Kontrollpeptid $\text{A}\beta_{42-1}$ hatte keinen Einfluß auf die intrazelluläre cAMP-Akkumulation.

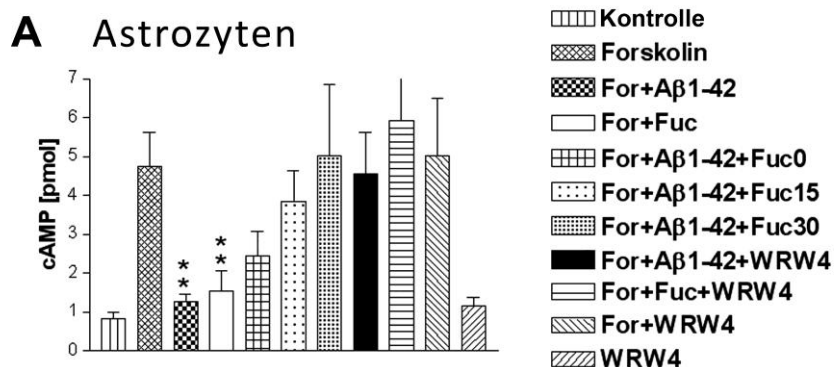


Abb. 3A Hemmung der $\text{A}\beta_{1-42}$ - und Fucoidan-induzierten G_i -Protein-Rezeptoraktivität durch WRW4 in Astrozyten. Für die Untersuchung der Hemmung der Forskolin-induzierten Adenylatzyklase-Aktivität wurden Astrozyten mit 10 μM Forskolin (For), welchem gleichzeitig die Agonisten 1 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ oder 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fucoidan (Fuc) zugesetzt waren jeweils mit und ohne fünfzehnminütige Präinkubation mit WRW4 für 15 min bei 37°C behandelt. Für die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit $\text{A}\beta_{1-42}$ und Fucoidan wurden die Zellen für 0, 15 oder 30 min mit Fucoidan präinkubiert. Die cAMP-Mengen wurden wie im Methodenteil beschrieben bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$) zwischen den Behandlungen mit Forskolin plus Agonist und Forskolin alleine, berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

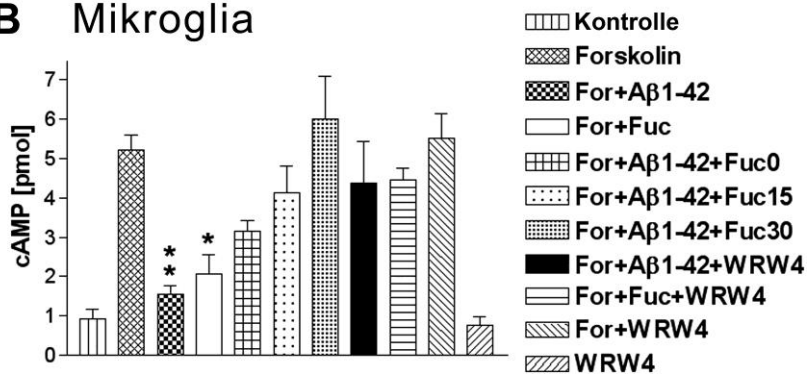
B Mikroglia

Abb. 3B Hemmung der $A\beta_{1-42}$ - und Fucoidan-induzierten G_i -Protein-Rezeptoraktivität durch WRW4 in Mikroglia. Für die Untersuchung der Hemmung der Forskolin-induzierten Adenylatzyklase-Aktivität wurden Mikroglia mit 25 μ M Forskolin (For), welchem gleichzeitig die Agonisten 1 μ M $A\beta_{1-42}$ oder 100 μ g/ml Fucoidan (Fuc) zugesetzt waren jeweils mit und ohne fünfzehnminütige Präinkubation mit WRW4 für 15 min bei 37°C behandelt. Für die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit $A\beta_{1-42}$ und Fucoidan wurden die Zellen für 0, 15 oder 30 min mit Fucoidan präinkubiert. Die cAMP-Mengen wurden wie im Methodenteil beschrieben bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$) zwischen den Behandlungen mit Forskolin plus Agonist und Forskolin alleine, berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

Die Ergebnisse aus den ERK1/2-Western Blot-Analysen und den cAMP-Messungen weisen zusammenfassend darauf hin, dass die $A\beta_{1-42}$ -induzierte Gliazellaktivierung durch den G_i -Protein gekoppelten Rezeptor FRPL-1 vermittelt wird. Die Fucoidan-vermittelte Gliazellaktivierung ist interessanterweise auch von der Funktion von FRPL-1 abhängig. Dies brachte uns zur Hypothese, dass Scavenger-Rezeptoren mit Formyl-Peptid-Rezeptoren in Gliazellen funktionell interagieren können.

4.2 Untersuchung der A β ₁₋₄₂- und Fucoidan-induzierten Signaltransduktion in mit siRNA-transfizierten Astrozyten

4.2.1 Hemmung der Expression von FPR, FPRL-1 und MARCO in Astrozyten durch siRNA

Mit dem nächsten Schritt wollten wir herausfinden, welcher der Formyl-Peptid-Rezeptoren, FPR oder FPRL-1, beziehungsweise ob der Scavenger-Rezeptor MARCO essentiell für die A β ₁₋₄₂- oder Fucoidan-induzierte Signaltransduktion ist.

Dazu transfizierten wir Astrozyten mit *small interfering RNA* (siRNA), die spezifisch gegen die mRNA-Sequenz der Rezeptoren FPR, FPRL-1 und MARCO der Ratte gerichtet war. Die Abnahme der mRNA-Menge wurde mittels SYBR Green Real-Time-PCR bestimmt, wobei GAPDH als endogene Kontrolle verwendet wurde.

Wie **Abb. 4A** zeigt, resultierte die 96-stündige Transfektion mit siRNA für alle drei Rezeptoren in einer signifikanten Reduktion der Menge an Rezeptor-mRNA. Die Transfektion mit Kontroll-siRNA, einem Nukleotid-Duplex gleicher Größe und zufälliger Sequenz, hatte hingegen keine Abnahme der Rezeptor-mRNA zur Folge.

Um eine Abnahme der jeweiligen Rezeptoren auf Proteinebene zu verifizieren, führten wir mit den siRNA-transfizierten Astrozyten Western Blot-Analysen durch (s. **Abb. 4B**) und werteten die jeweiligen Gel-Banden densitometrisch aus. Durch die 96-stündige Behandlung mit siRNA nahm die Proteinexpression für FPR und MARCO um circa 60%, für FPRL-1 um circa 70% ab (s. **Abb 4C**).

Bei der Transfektion von Mikroglia mit siRNA konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse bezüglich der Abnahme von Rezeptor-mRNA und -Proteinen gewonnen werden. Außerdem zeigte die vom Hersteller empfohlene Menge des Transfektionsreagens toxische Wirkung auf die Zellen, weshalb sie für den weiteren Versuchsablauf nicht genutzt werden konnten.

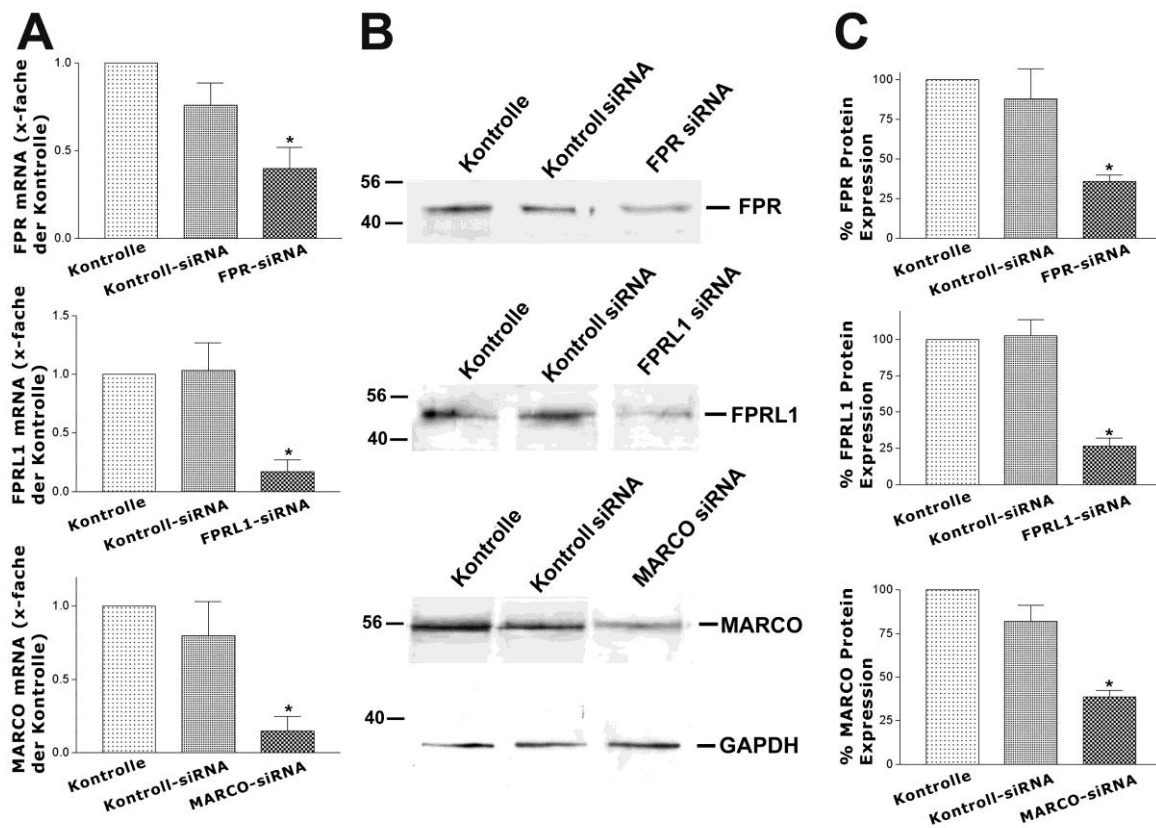


Abb. 4 Hemmung der Expression von FPR, FPRL-1 und MARCO in Astrozyten durch siRNA. Die siRNA für FPR, FPRL-1 und MARCO sowie Kontroll-siRNA wurde in Astrozyten transfiziert und die Abnahme der Rezeptor-mRNA mittels SYBR Green Real-Time-PCR 96 h später (verglichen mit der unbehandelten Kontrolle) bestimmt (A). GAPDH (Haushalts-Gen) wurde als interne Kontrolle verwendet. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Versuchen erhalten, wobei jeder Versuch dreifach ausgeführt wurde. (B) Die FPR-, FPRL-1- und MARCO-Proteinexpression wurde mittels Western Blot bestimmt, wobei zwei weitere Versuche ähnliche Ergebnisse lieferten. Die Banden wurden densitometrisch quantifiziert und die Mittelwerte \pm Standardabweichung graphisch dargestellt. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede (*, $p < 0,05$) im Vergleich zu den Behandlungen mit Kontroll-siRNA, berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

4.2.2 Hemmung der $A\beta_{1-42}$ - und Fucoidan-induzierten Phosphorylierung von ERK1/2 durch Transfektion von FPRL-1-siRNA in Astrozyten

Im nächsten Schritt untersuchten wir, inwiefern sich die Rezeptorabnahme durch siRNA auf die $A\beta_{1-42}$ - beziehungsweise Fucoidan-induzierte Signaltransduktion auswirkt. Hierzu wurden die für 96 h transfizierten Astrozyten mit den FPR- und FPRL-1-Agonisten $A\beta_{1-42}$ oder fMLF beziehungsweise mit dem MARCO-Liganden Fucoidan behandelt. Als Maß für die Rezeptoraktivität wurde die Menge an phosphoryliertem ERK1/2 mittels Western Blot-Analysen bestimmt.

Wie **Abb. 5** zeigt, resultierte die Behandlung jeweils mit $A\beta_{1-42}$, fMLF oder Fucoidan in einer deutlichen Zunahme der ERK1/2-Phosphorylierung in mit Kontroll-siRNA

transfiziert und nicht transfiziert Astrozyten (Kontrolle). Die Transfektion der Astrozyten mit FPRL-1-siRNA hemmte komplett die durch $A\beta_{1-42}$, fMLF- **und** Fucoidan-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung. Die Transfektion mit FPR-siRNA hatte keinen Effekt auf die Signaltransduktion der drei Agonisten. Die Transfektion der Astrozyten mit MARCO-siRNA beeinflusste nicht die $A\beta_{1-42}$ - und fMLF-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung, hemmte jedoch völlig den durch Fucoidan ausgelösten ERK1/2-Signalweg (s. **Abb. 5B**).

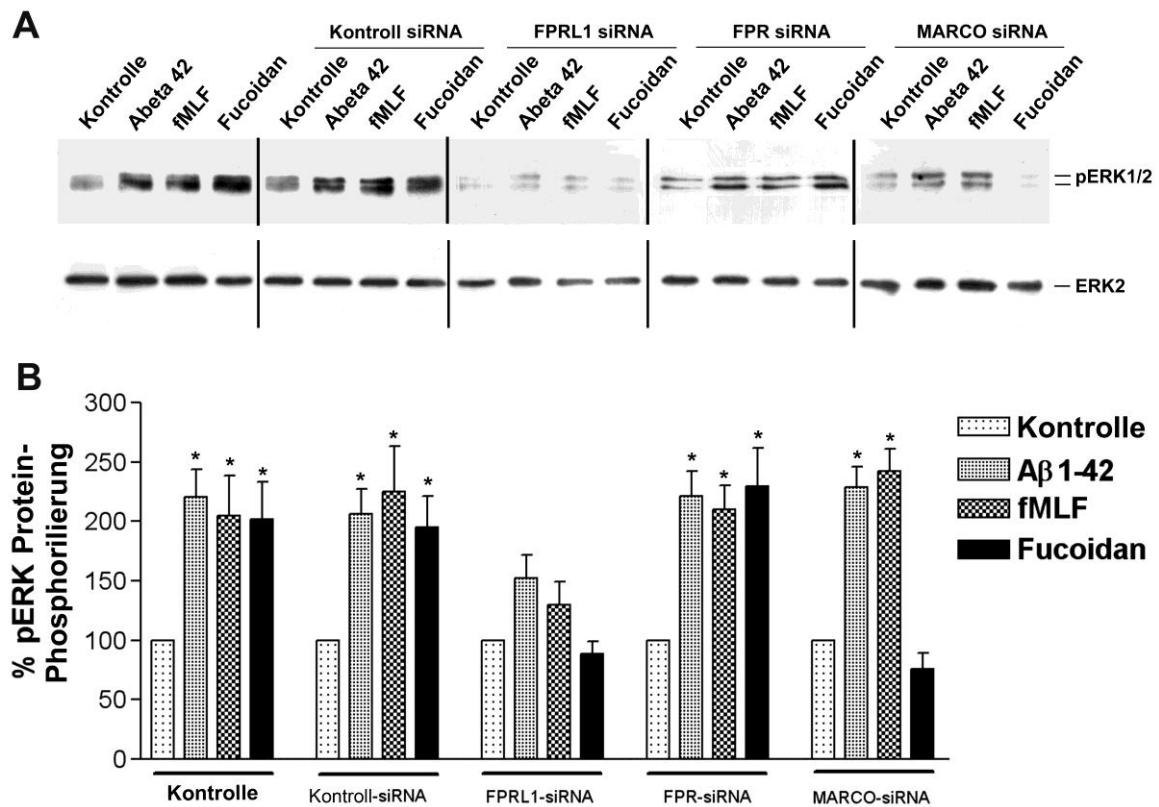


Abb. 5 Hemmung der $A\beta_{1-42}$ - und Fucoidan-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung durch Transfektion mit FPR-, FPRL-1- oder MARCO-siRNA. Nach viertägiger Transfektion wurden die Astrozyten mit $1 \mu\text{M}$ $A\beta_{1-42}$, $1 \mu\text{M}$ fMLF oder $100 \mu\text{g/ml}$ Fucoidan für 5 min bei 37°C behandelt. Die Menge an Gesamt-ERK2 und phosphoryliertem ERK1/2 wurde mittels Western Blot analysiert (A). Die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten wurde mittels densitometrischer Quantifizierung evaluiert (B). Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede (*, $p < 0,05$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

4.3 Interaktion von FPR, FPRL-1 und MARCO in Gliazellen

4.3.1 MARCO interagiert mit FPR und FPRL-1 in Gliazellen

Die Ergebnisse, dass die Fucoidan-induzierte Signaltransduktion zum einen durch den FPRL-1 Antagonisten WRW4, zum anderen durch Transfektion mit FPRL-1-siRNA gehemmt werden kann, lassen mutmaßen, dass die Effekte des Scavenger-Rezeptors MARCO zum Teil durch den G_i-Protein-gekoppelten Rezeptor FPRL-1 vermittelt werden. Um diese Hypothese zu untermauern untersuchten wir, ob die Formyl-Peptid-Rezeptoren in Gliazellen mit MARCO physisch interagieren. Aus diesem Grund führten wir Koimmunopräzipitationen durch. Dazu wurde FPR oder FPRL-1 aus Lysaten von Gliazellen unter Verwendung von anti-FPR- oder -FPRL-1-Antikörpern präzipitiert. Die resultierenden Präzipitate (IP) wurden dann mit Antikörpern gegen FPR, FPRL-1 oder MARCO koimmunopräzipitiert.

Abb. 6 zeigt, dass MARCO in Immunopräzipitaten (IP) von Astrozyten und Mikroglia detektiert werden konnte, was die Vermutung nahe legt, dass FPR und FPRL-1 *in vitro* mit MARCO interagieren. Eine Interaktion zwischen FPR und FPRL-1 konnte nicht nachgewiesen werden.

Desweiteren untersuchten wir die Menge an koimmunopräzipitiertem MARCO in Gliazellen, die zuvor mit A β ₁₋₄₂ oder Fucoidan behandelt wurden. Die resultierenden Banden wurden densitometrisch quantifiziert. **Abb. 6B** zeigt, dass im Falle der FPR-Präzipitate eine Behandlung mit A β ₁₋₄₂ oder Fucoidan keine wesentliche Änderung der koimmunopräzipitierten MARCO-Menge in beiden Gliazellarten zur Folge hatte. Bei den FPRL-1-Präzipitaten kommt es nach Behandlung mit A β ₁₋₄₂ (Astrozyten) bzw. A β ₁₋₄₂ oder Fucoidan (Mikroglia) zu einer signifikanten Zunahme der koimmunopräzipitierten MARCO-Menge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (s. **Abb. 6C**).

In einem weiteren Versuchsansatz untersuchten wir die Agonisten-induzierte Rezeptor-Phosphorylierung. Hier wurde bei den FPR- und FPRL-1-Präzipitaten, die aus zuvor mit A β ₁₋₄₂ oder Fucoidan stimulierten Gliazellen gewonnen wurden, gegen Phosphoserin/-threonin/-tyrosin-Reste detektiert. Im Falle von FPRL-1 resultierte eine Behandlung mit A β ₁₋₄₂ als auch Fucoidan in einer signifikanten Zunahme der Rezeptor-proteinphosphorylierung in beiden Gliazellarten. (s. **Abb. 6C**). Für FPR konnten wir keinen Einfluss der Agonisten auf die Rezeptorphosphorylierung feststellen.

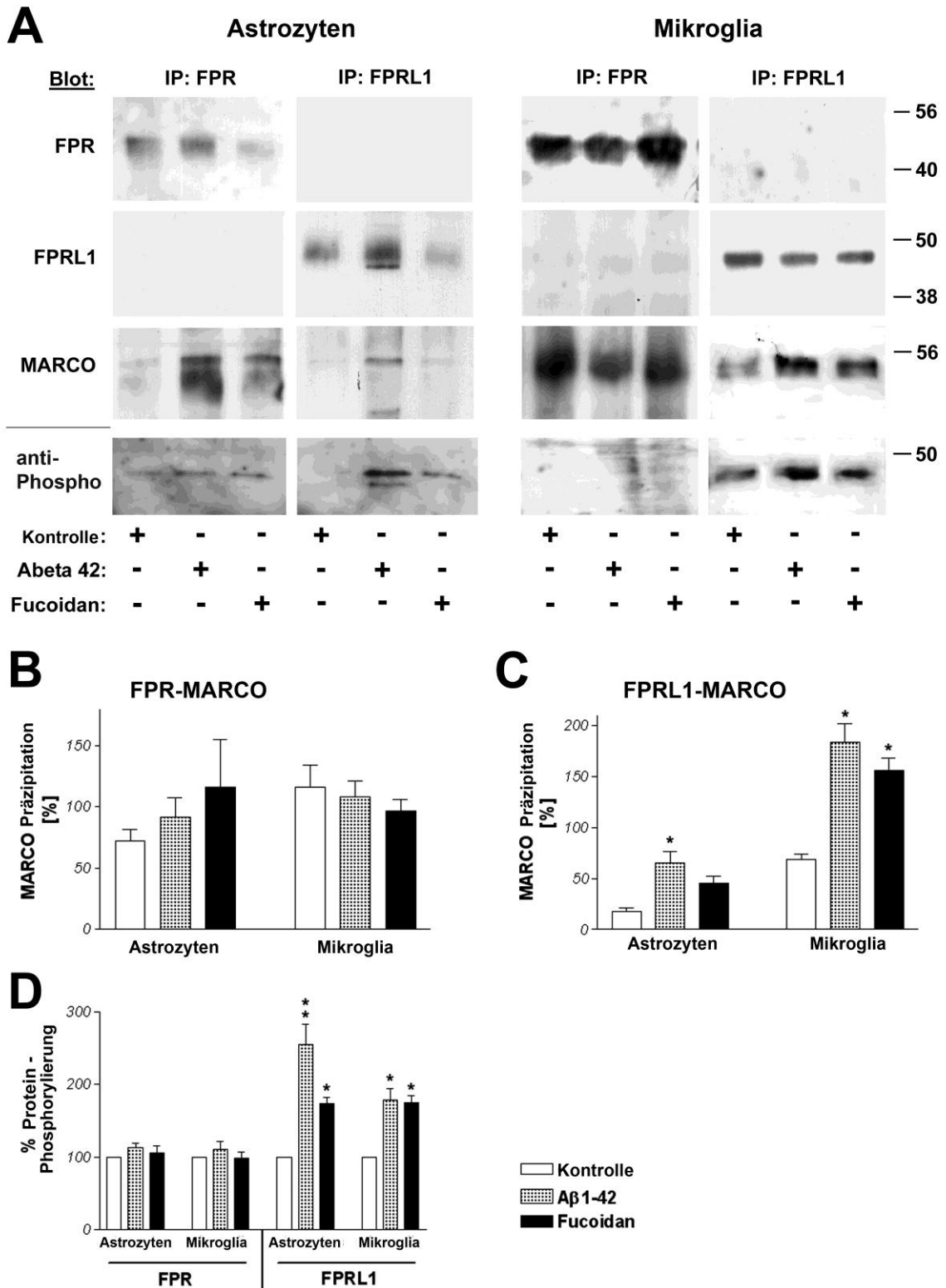


Abb. 6 MARCO interagiert mit FPR und FPRL-1 in Gliazellen. (A) Membranproteine von Astrozyten oder Mikroglia wurden mittels anti-Ratte-FPR- oder anti-Ratte-FPRL-1-Antikörper extrahiert. Die resultierende Immunopräzipitate (IP) wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit anti-FPR-, anti-FPRL-1- oder anti-MARCO-Antikörper detektiert. FPR und FPRL-1 konnten mit MARCO in Astrozyten als auch Mikroglia koimmunopräzipitiert werden. Zwei zusätzliche Experimente lieferten ähnliche Ergebnisse. Die Positionen der Molekularmassen-Marker (in kDa) sind auf der rechten Seite angegeben. Die Höhe der anti-Phospho-Bande

entspricht der Position des präzipitierten Rezeptors (IP). (B) Densitometrische Auswertung der MARCO-Präzipitation in FPR-Immunopräzipitaten nach Behandlung mit A β ₁₋₄₂ oder Fucoidan. (C) Densitometrische Auswertung der MARCO-Präzipitation in FPRL-1-Immunopräzipitaten. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede (*, p<0,05) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test. (D) Densitometrische Auswertung der Rezeptorphosphorylierung (FPR bzw. FPRL-1) nach Behandlung mit A β ₁₋₄₂ oder Fucoidan. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede (*, p<0,05; **, p<0,001) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

4.3.2 Kolokalisation von FPR/FPRL-1 und MARCO in der Fluoreszenzmikroskopie

Um unsere Hypothese der Interaktion von Formyl-Peptid-Rezeptoren und dem Scavenger-Rezeptor MARCO weiter zu erhärten, untersuchten wir mittels Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie die Verteilung von FPR, FPRL-1 und MARCO in Gliazellen. Dazu wurden die jeweiligen Rezeptoren in den Zellen mit Antikörpern markiert und die Kolokalisation in einem „Überlappungsmodus“ (gelbe Partikel) mit Hilfe eines Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskops begutachtet.

Abb. 7A zeigt, dass in Astrozyten immunofluoreszente Partikel für FPR und FPRL-1 mit MARCO kolokalisiert waren. Die Kolokalisation war sowohl an der Zytoplasmamembran als auch intrazellulär zu sehen. Zwischen FPR und FPRL-1 bestand keine Kolokalisation. In Mikroglia (s. **Abb. 7B**) sahen wir Überlappungen von FPR und FPRL-1 mit MARCO in Regionen der Plasmamembran. FPR und FPRL-1 waren in dieser Gliazellart ebenfalls kolokalisiert.

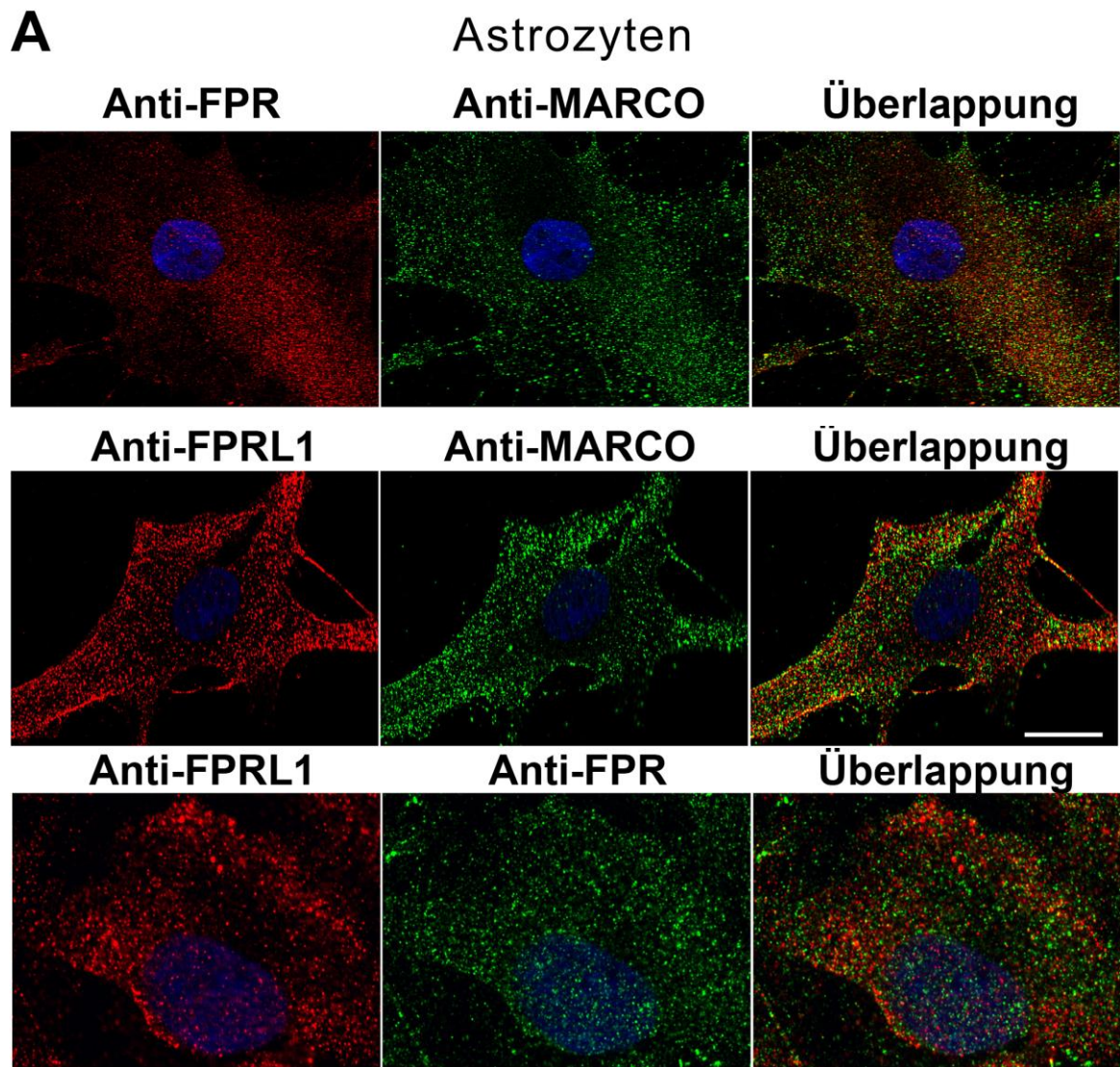


Abb. 7A FPR und FPRL-1 sind mit MARCO in Astrozyten kolokalisiert. Astrozyten wurden fixiert und mit anti-FPR-, anti-FPRL-1 oder anti-MARCO-Antikörpern markiert. Die Verteilung der Rezeptoren wurde mittels Doppelfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Bisbenzimid wurde als Kerngegenfärbung benutzt. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse von drei unabhängig in zweifacher Ausführung durchgeführten Experimenten. Maßstabsbalken: 20 μ m.

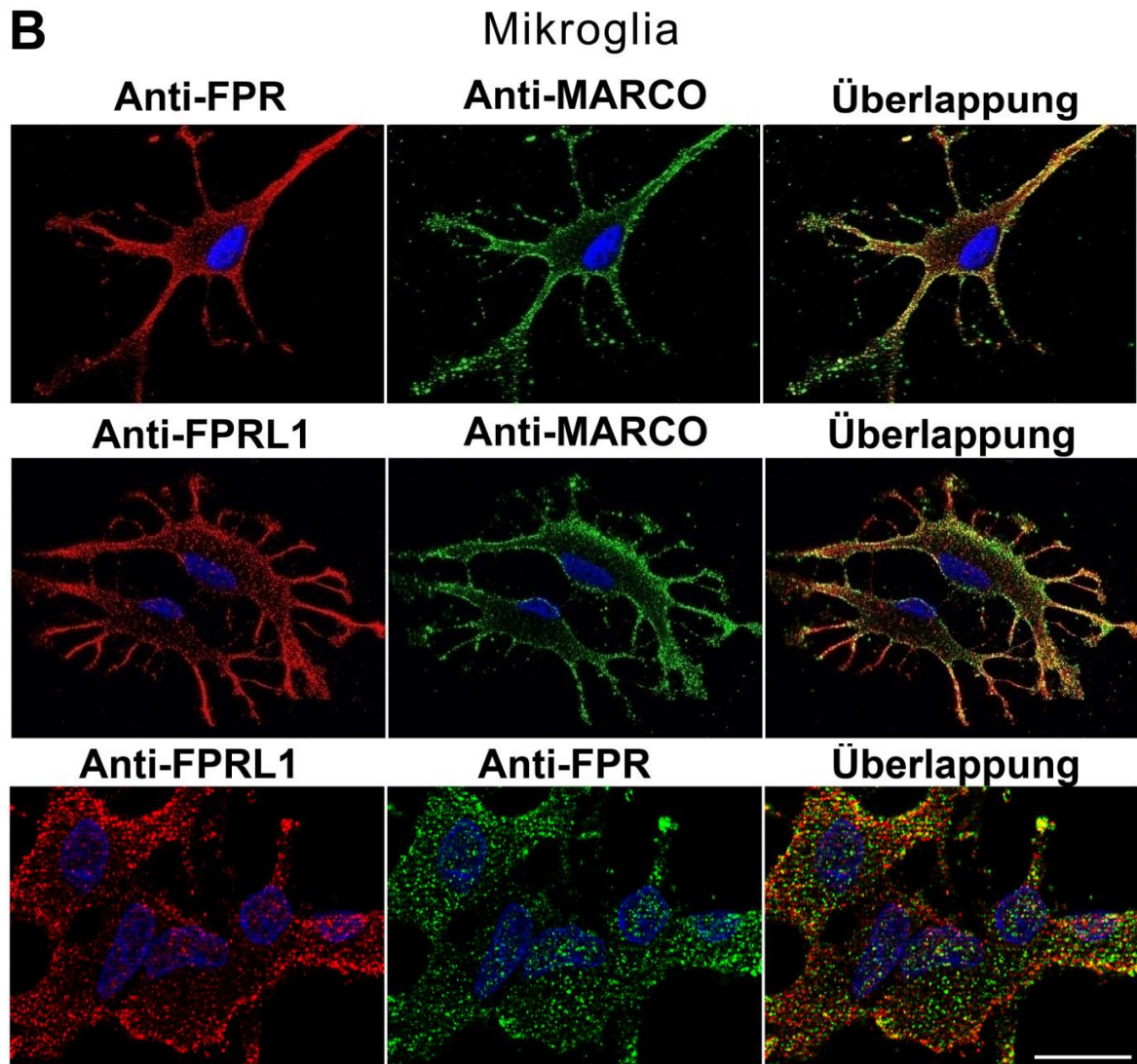


Abb. 7B FPR und FPRL-1 sind mit MARCO in Mikroglia kolokalisiert. Mikroglia wurden fixiert und mit anti-FPR-, anti-FPRL-1 oder anti-MARCO-Antikörpern markiert. Die Verteilung der Rezeptoren wurde mittels Doppelfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Bisbenzimid wurde als Kerngegenfärbung benutzt. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse von drei unabhängig in zweifacher Ausführung durchgeführten Experimenten. Maßstabsbalken: 20 μm .

4.4 MARCO interagiert mit FPRL-1 in transfizierten HEK293-Zellen

Um unsere Ergebnisse der Interaktion von Formyl-Peptid-Rezeptoren und Scavenger-Rezeptor MARCO in Gliazellen der Ratte und die Mitwirkung von FPRL-1 bei der Fucoidan-induzierten Signaltransduktion zu bestätigen, stellten wir stabil transfizierte HEK293-Zellen her, die den humanen FPRL-1 (hFPRL-1) und/oder MARCO (hMARCO) exprimieren.

Eine physische Interaktion von FPRL-1 und MARCO sollte auch in dieser humanen Zellkultur mittels Koimmunopräzipitation nachgewiesen werden. Lysate von HEK293-

Zellen, die hFPRL-1 und hMARCO koexprimieren, wurden mit anti-hFPRL-1-Antikörpern behandelt und aus den resultierenden Präzipitaten ein gegen MARCO gerichteter Immunoblot durchgeführt. **Abb. 8** zeigt, dass MARCO in Immunopräzipitaten (IP) von kotransfizierten HEK293-Zellen detektiert werden konnte. Dies bestätigt, dass FPRL-1 und MARCO physisch miteinander *in vitro* interagieren. Eine vorherige Behandlung der Zellen mit A β ₁₋₄₂ oder Fucoidan führte nicht zu einer Änderung der Menge an koimmunopräzipitiertem MARCO (s. **Abb. 8**).

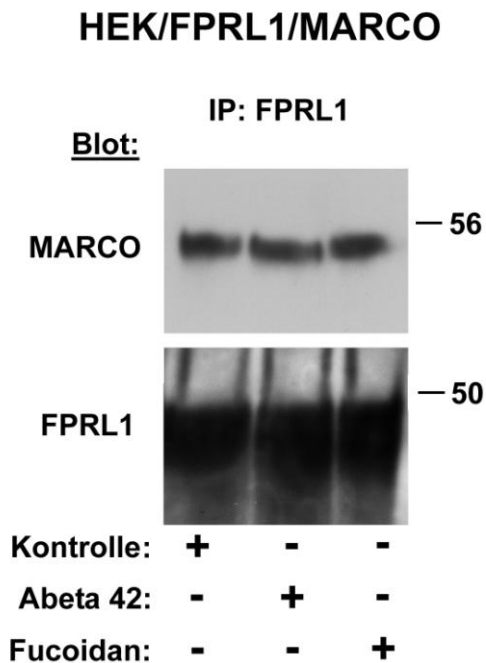


Abb. 8 MARCO interagiert mit FPRL-1 in transfizierten HEK293-Zellen. MARCO interagiert mit Membranproteinen von stabil koexprimierenden hFPRL-1-hMARCO-HEK 293-Zellen, die mittels anti-hFPRL-1-Antikörpern extrahiert wurden. Eine dreißigminütige Vorbehandlung der Zellen mit A β ₁₋₄₂ oder Fucoidan hatte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine Änderung der Menge an koimmunopräzipitiertem MARCO zur Folge. Zwei zusätzliche Experimente lieferten ähnliche Ergebnisse. Die Positionen der Molekularmassen-Marker (in kDa) sind auf der rechten Seite angegeben.

4.5 FPRL-1- und MARCO-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung und Änderung der cAMP-Menge in transfizierten HEK293-Zellen

In einer weiteren Versuchsreihe untersuchten wir die Beteiligung von FPRL-1 und MARCO bei der $A\beta_{1-42}$ - und Fucoidan-induzierten Signaltransduktion in transfizierten HEK293-Zellen.

Zu diesem Zweck wurde HEK293-Zellen hergestellt, die hFPRL-1, hMARCO oder beide Rezeptoren exprimieren und die ERK1/2-Phosphorylierung nach Behandlung mit $A\beta_{1-42}$, fMLF oder Fucoidan untersucht und densitometrisch quantifiziert. In nicht-transfizierten (s. **Abb. 9A/C**) und nur mit hMARCO transfizierten HEK293-Zellen (s. **Abb. 9B/D**) führte eine Behandlung mit $A\beta_{1-42}$, fMLF oder Fucoidan zu keinem Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung. In hFPRL-1-transfizierten HEK293-Zellen (s. **Abb. 9E/G**) induzierte **nur** eine Behandlung mit $A\beta_{1-42}$ und fMLF eine signifikante Zunahme der ERK1/2-Phosphorylierung. In hFPRL-1-hMARCO-koexprimierenden HEK293-Zellen (s. **Abb. 9F/H**) führte eine Behandlung mit $A\beta_{1-42}$, fMLF **und** Fucoidan zu einer signifikanten Zunahme der ERK1/2-Phosphorylierung.

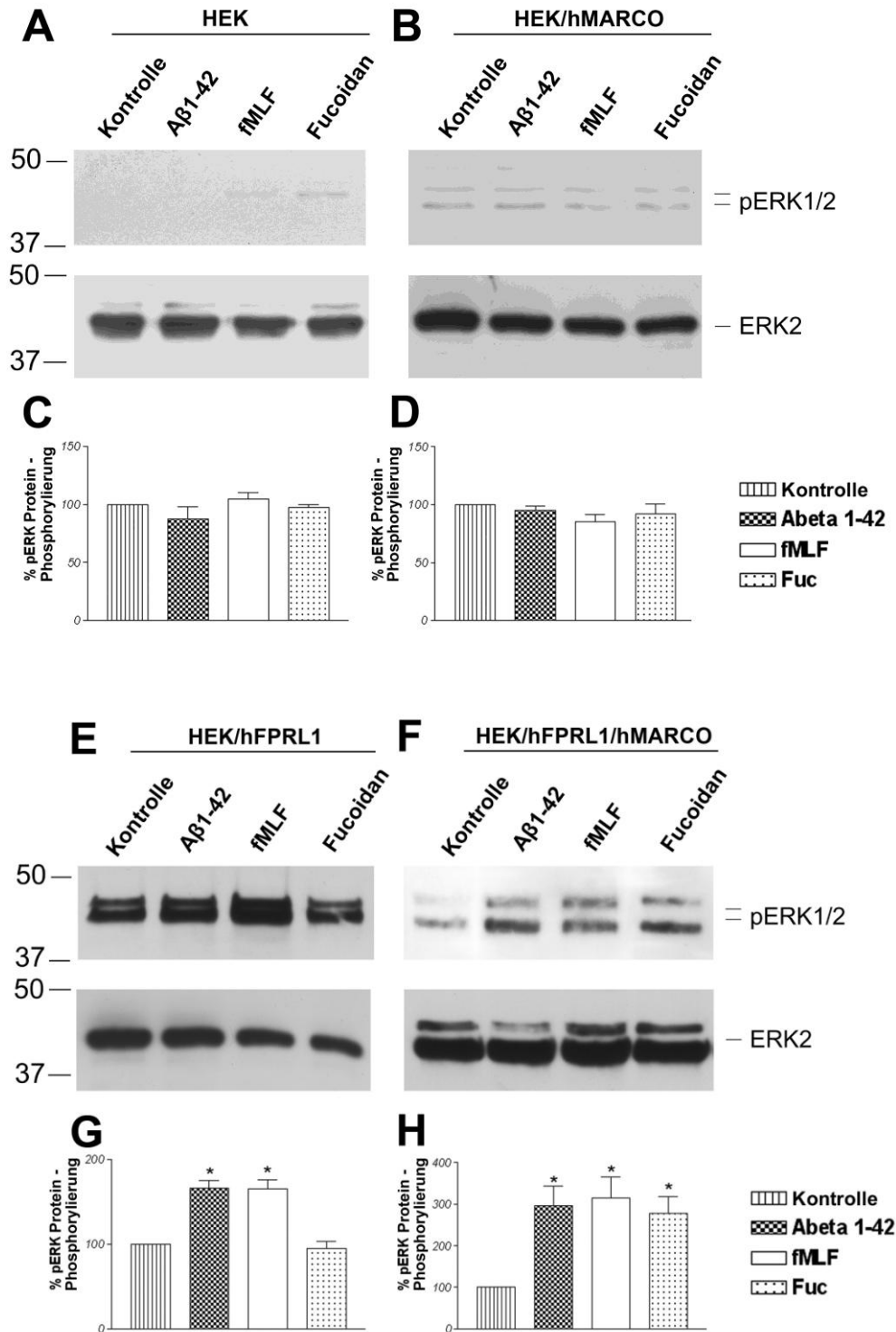


Abb. 9 FPRL-1- und MARCO-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung in transfizierten HEK293-Zellen. Zur Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung wurden untransfizierte (A), hMARCO- (B), hFPRL-1- (E) oder hFPRL-1/hMARCO-exprimierende HEK293-Zellen (F) mit 1 μ M A β ₁₋₄₂, fMLF oder 100 μ g/ml Fucoidan für 5 min bei 37°C behandelt. Die Zellen wurden lysiert, gleiche Proteinmengen (5 μ g) in SDS-Probenpuffer gelöst und die Menge an Gesamt-ERK2 und phosphoryliertem ERK1/2 mittels Western Blot bestimmt. Die Positionen der Molekularmassen-Marker (in kDa) sind auf der linken Seite angegeben. Darunter sind jeweils die densitometrischen Auswertungen dargestellt. Zwei zusätzliche Experimente lieferten ähnliche Ergebnisse. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede (*, $p < 0,05$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

Die Liganden-induzierte Abnahme der Forskolin-induzierten Adenylatzyklase-Aktivität sollte nun auch in den transfizierten HEK293-Zellen untersucht werden.

Hier zeigte sich in Analogie zur Bestimmung der ERK1/2-Aktivierung, dass in nicht-transfizierten HEK293-Zellen und solchen, die nur hMARCO stabil exprimierten, eine Behandlung mit $A\beta_{1-42}$, fMLF oder Fucoidan keinen Einfluss auf die intrazelluläre cAMP-Menge hatte. In hFPRL-1-transfizierten HEK293-Zellen führte nur eine Behandlung mit $A\beta_{1-42}$ und fMLF zu einer Reduktion der Forskolin-stimulierten cAMP-Menge. Jedoch sahen wir in hFPRL-1-hMARCO-koexprimierenden HEK293-Zellen eine Abnahme der Adenylatzyklase-Aktivität nach Behandlung mit $A\beta_{1-42}$, fMLF und Fucoidan (s. Abb. 10).

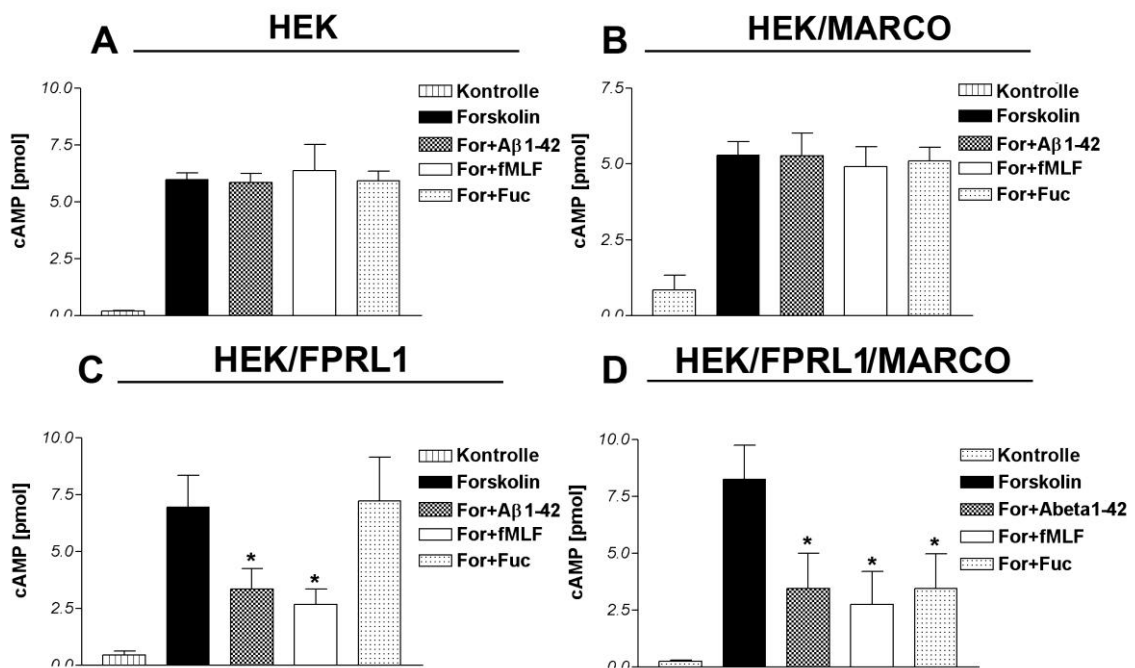


Abb. 10 FPRL-1- und MARCO-vermittelte Änderung der intrazellulären cAMP-Menge in transfizierten HEK293-Zellen. Für die Analyse der Hemmung der Forskolin-stimulierten Adenylatzyklase-Aktivität wurden jeweils untransfizierte (A), hMARCO- (B), hFPRL-1-(C) und hFPRL-1/hMARCO-koexprimierende HEK293-Zellen (D) mit 25 μ M Forskolin, dem gleichzeitig 1 μ M $A\beta_{1-42}$, fMLF oder 100 μ g/ml Fucoidan zugesetzt war, für 15 min bei 37°C behandelt. Die cAMP-Mengen wurden wie im Methodenteil beschrieben bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede (*, $p < 0,05$) zwischen den Behandlungen Forskolin plus Agonist und Forskolin alleine, berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

5. Diskussion

5.1 Vorbemerkung

Die Alzheimersche Krankheit stellt die häufigste Form der Demenz dar und befindet sich nicht zuletzt aufgrund unserer immer älter werdenden Gesellschaft seit Dekaden im Zentrum intensiver Forschung chronisch neurodegenerativer Erkrankungen. Ihre Pathogenese konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden (Übersichtsarbeit in Selkoe, 2001).

Kernhypothese ist eine Dysregulation des $A\beta_{1-42}$ -Metabolismus, der genetisch determiniert ist, aber auch spontan entstehen kann und zu einer intra- und extraneuronalen Ablagerung des vermehrt gebildeten $A\beta$ in Form von fibrillenhaltigen Plaques führt. Die mikroskopischen Veränderungen beeinträchtigen die neuronale Funktion auf subzellulärer Ebene, was schließlich den neuronalen Zelltod zur Folge hat. Für die Neurotoxizität des $A\beta_{1-42}$ werden sowohl direkte als auch indirekte Mechanismen diskutiert. Zu ersteren gehören die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Monji et al., 2001), Änderung der Ionen-Homeostase (Lin et al., 2001) und die Aktivierung bestimmter Kinase-Signalkaskaden (Morishima et al., 2001).

Die Hypothese der indirekten neurotoxischen Wirkung des $A\beta_{1-42}$ fußt auf dem Vorhandensein aktivierter Mikroglia und Astrozyten in unmittelbarer Umgebung der Plaqueablagerungen in Gehirnen von Alzheimer-Patienten. Die Funktion der aktivierten Gliazellen wird kontrovers diskutiert. Einerseits scheinen sie in Folge einer Immunantwort einen chronischen Entzündungsprozess aufrecht zu erhalten, der die Plaqueformation und Produktion proinflammatorischer Zytokine fördert und somit den Krankheitsprozess vorantreibt (Wegiel et al., 2000; Yates et al., 2000). Andererseits besitzen sie die Fähigkeit zur Phagozytose und Degradation der $A\beta$ -Plaques, was dem weiteren Voranschreiten der Krankheit entgegenwirkt (Rogers et al., 2002b; Wyss-Coray et al., 2003). Beide Gliazelltypen sind in der Lage, verschiedene proinflammatorische und neurotoxische Faktoren zu bilden, wie beispielsweise $TGF\beta-1$, $TNF\alpha$, Interleukine, Chemokine und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Farfara et al., 2008). Mikroglia und Astrozyten exprimieren auf ihrer Zelloberfläche eine Vielzahl von Rezeptoren, die in der Lage sind, $A\beta$ zu binden. Durch die Interaktion mit diesen Rezeptoren kommt es entweder zur Phagozytose der $A\beta$ -Ablagerungen oder es können durch die Aktivierung bestimmter intrazellulärer Signalkaskaden die oben beschriebenen proinflammatorischen und neurotoxischen Effekte ausgelöst werden.

Bisher konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, welcher Rezeptor in Gliazellen die Interaktion mit $A\beta$ vermittelt. Als Kandidaten werden in diesem Kontext unter anderem

der Scavenger Rezeptor MARCO (Alarcon et al., 2005) und der G-Protein gekoppelte Rezeptor FPRL-1 (Le et al., 2001a) diskutiert.

Wir untersuchten die Rolle beider Rezeptoren als Mediatoren der Gliazellaktivierung durch $A\beta_{1-42}$ und Fucoidan. Interessanterweise zeigte sich dabei, dass eine Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia durch den SR-A-Liganden Fucoidan durch den FPRL-1 spezifischen Antagonisten WRW4 signifikant inhibiert werden kann. Den funktionellen Zusammenhang beider Rezeptoren wiesen wir weiterhin in siRNA-transfizierten Astrozyten und in transfizierten HEK293-Zellen nach. Schließlich wurde die Hypothese einer funktionellen Interaktion beider Rezeptoren durch den Nachweis einer physischen Interaktion in der Koimmunopräzipitation und einer Kolokalisation in der Fluoreszenzmikroskopie untermauert.

Die Ergebnisse der einzelnen Experimente, besonders die Hypothese der in dieser Arbeit erstmals beschriebenen funktionellen Zusammenarbeit von FPRL-1 und SR-MARCO bei der durch $A\beta_{1-42}$ - oder Fucoidan-induzierten Gliazellaktivierung werden im Folgenden diskutiert.

5.2 Beteiligung von FPRL-1 bei der $A\beta_{1-42}$ -induzierten Gliazellaktivierung

Im Menschen werden bislang drei Typen von Formyl-Peptid-Rezeptoren unterschieden: Der *formyl peptide receptor* (FPR), der durch niedrige Konzentrationen (im pico- und nanomolaren Bereich) des bakteriellen Peptids fMLF aktiviert wird und deshalb als *high affinity receptor* bezeichnet wird, der *low affinity formyl peptide receptor like-1* (FPRL-1), der durch hohe Konzentrationen von fMLF (im mikromolaren Bereich) aktiviert wird (Le et al., 2002) und der FPRL-2, der nicht durch Formyl-Peptide aktiviert wird (Durstin et al., 1994). Letzterer teilt sich mit FPRL-1 einige nicht-formylierte chemotaktische Peptide (Christophe et al., 2001).

FPRL-1 wird als Schlüsselrezeptor bei der Pathogenese von amyloidogenen Erkrankungen wie der systemischen Amyloidose, den Prion-Erkrankungen, wie der Creutzfeld-Jakob-Krankheit diskutiert, da er jeweils durch die krankheitsverursachenden Polypeptide Serum Amyloid A (SAA; (Su et al., 1999)) beziehungsweise humanes Prion-Protein (PrP106-126; (Le et al., 2001b)) aktiviert werden kann. Ebenfalls zeigen Befunde von Le et al. (2001a), dass der Rezeptor eine Rolle in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit spielt. Die Autoren konnten zeigen, dass der G_i -Protein-gekoppelte Rezeptor FPRL-1 bei der $A\beta_{1-42}$ -vermittelten Migration und Aktivierung von humanen Monozyten und von FPRL-1 transfizierten HEK293-Zellen beteiligt ist. Die durch $A\beta_{1-42}$ -induzierte Ca^{2+} -Mobilisation war in diesen Zellen zum einen durch Pertussis-Toxin, welches die Aktivität von inhibitorischen G-Proteinen inhibiert, hemmbar. Zum anderen verringerte

eine Behandlung mit dem bakteriellen fMLF den $A\beta_{1-42}$ -induzierten Ca^{2+} -Einstrom. Da es erst bei Anwendung von hoher Konzentration von fMLF zu einer deutlichen Abschwächung des Ca^{2+} -Signals kam, wurde der *low affinity receptor* FPRL-1 als der für die $A\beta_{1-42}$ -vermittelte Zellaktivierung entscheidende Rezeptor von den Autoren angenommen.

In murinen Makrophagen konnte die $A\beta_{1-42}$ -induzierte Chemotaxis und Superoxidproduktion durch Behandlung mit einem spezifischen FPR2-Agonisten (homolog zum FPRL1) abgeschwächt werden (Tiffany et al., 2001).

Eine mögliche Beteiligung von FPRL-1 bei der $A\beta_{1-42}$ -induzierten Aktivierung von Gliazellen ist bislang nicht untersucht worden. Lorton et al. (2000) zeigten durch Verwendung des spezifischen FPR-Antagonisten fMLPi, dass der *high affinity receptor* FPR an einer $A\beta$ -induzierten IL-1-Freisetzung in LPS-stimulierter Mikroglia beteiligt ist. Desweiteren konnten sie den FPR in den untersuchten Mikrogliazellen immunhistochemisch nachweisen.

Eine Expression von FPRL-1 in Gliazellen ist bislang in Mikroglia, die die Alzheimerläsionen infiltrieren, nachgewiesen worden (Le et al., 2001a). Das Vorkommen von FPRL-1 in Astrozyten ist noch nicht untersucht worden. Le et al. (2000a) zeigten mittels RT-PCR, dass der FPRL-1 in den Astrozytom-Zelllinien SNB75 und U87 exprimiert wird. Die Aktivierung von FPRL-1 mittels fMLF resultierte in diesen Zellen in einer erhöhten Ca^{2+} -Mobilisation und Sekretion von IL-6.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir erstmals die Expression von FPRL-1 auf mRNA- (*real-time* RT-PCR) und Proteinebene (Western Blot) in primären Astrozyten und Mikroglia aus der Ratte zeigen. Unsere Ergebnisse bei der Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration zeigen, dass $A\beta_{1-42}$ ähnlich wie der FPRL-1-Agonist fMLF einen deutlichen Rückgang der Forskolin-stimulierten Adenylatzyklase-Aktivität in primären Gliazellen der Ratte bewirken kann. Dieser Effekt lässt die Aktivierung eines G_i-Protein-gekoppelten Rezeptors wie FPRL-1 vermuten. Die Ergebnisse zeigten dann, dass die $A\beta_{1-42}$ -vermittelte Gliazellaktivierung durch den spezifischen FPRL-1-Antagonisten WRW4 (Tryptophan-Argenin-(Tryptophan)₄) inhibiert werden kann und somit an diesen Rezeptor gebunden ist.

Die Aktivierung eines G_i-Protein-gekoppelten Rezeptors wie FPRL-1 kann durch Aktivierung von nachgeschalteten zytosolischen Proteinkinasen zur Induktion von MAPKs wie ERK1/2 führen. Der ERK-Signalweg reguliert auf komplexe Weise Zellwachstum, -differenzierung und Entzündungsvorgänge (Robinson und Cobb, 1997). Lee et al. (2005) berichten, dass Serum-Amyloid A (SAA) und W-Peptid, ein FPRL-1-Agonist, in THP-1 Monozyten eine ERK-Aktivierung induzieren, was bedeutet, dass MAPKs auch durch Aktivierung von FPRL-1 angesteuert werden können. In Mikroglia

konnte gezeigt werden, dass $A\beta_{1-42}$ die MAPK ERK 1/2 aktiviert und es dadurch zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren kommt, die die Expression proinflammatorischer Gene induzieren (McDonald et al., 1998). Ferner demonstrierten Kim et al. (2004), dass eine IL-1 β -Produktion durch aktivierte Mikroglia, die zur neuronalen Dysfunktion bei der Alzheimer-Demenz beitragen kann, unmittelbar an die Aktivierung des MAPK-Signalweges gekoppelt ist.

Welcher Rezeptor die MAPK-Aktivierung vermittelt, konnte bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht geklärt werden. Wir konnten in dieser Arbeit mittels Western Blot-Analysen zeigen, dass $A\beta_{1-42}$ in primären Astrozyten und Mikroglia der Ratte die MAPK ERK1/2 induziert. Durch Verwendung von WRW4, der die ERK1/2-Phosphorylierung signifikant senkte, demonstrierten wir, dass FPRL-1 an der ERK1/2-Aktivierung maßgeblich beteiligt ist. Dies bestätigt die schon bei den cAMP-Messungen gezeigte Relevanz von FPRL-1 bei der $A\beta_{1-42}$ -induzierten Signaltransduktion in Gliazellen der Ratte.

5.3 Beteiligung von Scavenger-Rezeptoren bei der $A\beta_{1-42}$ -induzierten Glizellaktivierung

Der Begriff „scavenger receptor“ (*scavenger*, engl. für „Strassenfeger“) wurde erstmals vor 30 Jahren aufgrund des Entdeckens einer unidentifizierbaren Hochaffinitäts-Bindungsstelle für acetyliertes LDL auf Makrophagen geprägt (Goldstein et al., 1979). Mittlerweile werden aufgrund verschiedener Charakteristika wie Strukturmerkmale und Ligandenbindungsspektrum mindestens neun verschiedenen Klassen von SRs unterschieden. Aufgrund ihrer Fähigkeit, physikochemisch heterogene Substanzen zu binden, fassen Krieger et al. (2001) SR-A, SR-BI, CD36, LRP (*low density lipoprotein-related receptor protein*) und RAGE (*receptor for advanced glycation products*) als Multiliganden-Rezeptoren zusammen, während Franc et al. (1999) von *pattern-recognition receptors* (PRR, engl. für „mustererkennende Rezeptoren“) sprechen.

Die Vermutung, dass auch Scavenger-Rezeptoren (SR) an der Pathophysiologie der Alzheimer-Demenz beteiligt sind, wird durch mehrere Beobachtungen untermauert. Zum einen werden sie verstärkt in aktivierten mononuklearen Phagozyten und Mikroglia, die die senilen Plaques in Alzheimer-Gehirnen umgeben, exprimiert (Christie et al., 1996), zum anderen vermitteln SR der Klasse A *in vitro* die Adhäsion von Mikroglia der Ratte und humanen Monozyten zu mit $A\beta_{1-42}$ -Fibrillen-beschichteten Oberflächen, was zu einer verstärkten Bildung reaktiver O_2 -Spezies führt (El et al., 1998). SR-A war der erste Subtyp dieser Rezeptorklasse, dem eine Beteiligung an der Endozytose von fibrillärem $A\beta_{1-42}$ in Zellkulturen von muriner Mikroglia und anderen mononukleären Phagozyten nachgewiesen werden konnte (El et al., 1996; Paresce et al., 1996). Darüber hinaus

konnten Chung et al. (2001) zeigen, dass neonatale Mikroglia SR-A-defizienter Mäuse ca. 50% weniger Fluoreszenz-markiertes $A\beta_{1-42}$ bindet als Wildtyp-Mikroglia. Alarcon et al. (2005) verdeutlichten in ihrer Arbeit, dass unter den verschiedenen SR besonders MARCO, der in die Familie der SR-A-Rezeptoren eingereicht wird (Elomaa et al., 1995), bei der Interaktion mit $A\beta_{1-42}$ von Bedeutung ist. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass neutralisierende Antikörper gegen MARCO und SR-A-Liganden wie Poly(I) und Fucoidan die Adhäsion von Astrozyten und Mikroglia an $A\beta_{1-42}$ und die $A\beta_{1-42}$ -Phagozytose inhibieren konnten. Fucoidan, ein gerinnungshemmender Inhaltsstoff aus braunem Seetang (*Laminaria japonica*), ist ein aus L-Fucose-Einheiten aufgebautes, stark verzweigtes sulfatisiertes Polysaccharid.

An welche Signalwege eine Aktivierung von Scavenger-Rezeptoren in Astrozyten und Mikroglia gekoppelt ist, speziell nach Interaktion mit $A\beta_{1-42}$, und welche Klasse von SR mit den Liganden interagiert, ist bislang ungeklärt beziehungsweise wird kontrovers diskutiert.

Es gibt Hinweise darauf, dass der SR-A-Ligand Fucoidan in murinen Makrophagen den MAPK-Weg aktivieren und die Sekretion von TNF- α und IL-1 β induzieren kann (Hsu et al., 2001).

Bamberger et al. (2003) konnten zeigen, dass eine 30-minütige Präinkubation mit Fucoidan (300 $\mu\text{g/ml}$) mehrere $A\beta_{1-25}$ -induzierte Effekte in THP-1-Monozyten (humane akute Leukämiezelllinie) hemmen konnte. Dabei handelte es sich um die ERK1/2-Phosphorylierung, die Produktion von IL-1 β und die Generierung von ROS. Da Fucoidan ein SR-Ligand ist, zogen die Autoren die Schlußfolgerung, dass Scavenger-Rezeptoren die $A\beta$ -induzierten Effekte vermitteln. Die Autoren hypothetisieren für die $A\beta$ -induzierte Signaltransduktion in Mikroglia ein Modell, in dem fibrilläres $A\beta$ durch einen Multi-Rezeptor-Komplex bestehend aus SR-A, dem SR-B CD 36, dem $\alpha\beta 1$ -Integrin und dem Integrin-assoziierten CD 47, gebunden wird, die weitere intrazelluläre Signaltransduktion und daran gekoppelte IL-1 β - und ROS-Produktion aber SR-A-unabhängig vermittelt wird. Die Beteiligung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors wie FPRL-1 an der durch den Rezeptorkomplex vermittelten Zellantwort schließen sie im Widerspruch zu unseren Ergebnissen aus, da eine Behandlung der Zellen mit Pertussis-Toxin keinen Einfluss auf die Signaltransduktion und Zytokinproduktion hatte. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf die Verwendung unterschiedlicher Formen von $A\beta$ zurückzuführen sein.

Unsere Untersuchungen beschäftigten sich nun mit dem Einfluß auf die $A\beta_{1-42}$ -induzierte ERK1/2-Phosphorylierung und Änderung des cAMP-Spiegels in Gliazellen aus neonatalen Ratten. Eine fünfminütige Behandlung mit Fucoidan führte sowohl in Astrozyten als auch Mikroglia zu einer deutlichen Phosphorylierung von ERK 1/2. Ferner konnten wir zeigen, dass Fucoidan eine $A\beta_{1-42}$ -induzierte ERK1/2-Aktivierung hemmen

konnte. Eine gleichzeitige Behandlung der Astrozyten beziehungsweise Mikroglia mit $A\beta_{1-42}$ und Fucoïdan hatte keine nennenswerten Unterschiede bezüglich der Phosphorylierung von ERK1/2 zur Folge, verglichen mit Gliazellen, die nur mit $A\beta_{1-42}$ stimuliert wurden. Jedoch kam es nach einer fünfzehnminütigen Präinkubation mit Fucoïdan zu einer leichten, nach einer dreißigminütigen aber zu einer deutlichen Abnahme der ERK 1/2-Aktivierung in Astrozyten als auch Mikroglia (s. **Abb. 2A** und **B**). Dieser Effekt lässt sich durch den Mechanismus der Desensibilisierung (Empfindlichkeitsverlust) erklären. Durch die vorausgegangene Aktivierung des ERK1/2-Signalweges durch Fucoïdan kommt es zu einer Abschwächung des $A\beta_{1-42}$ -induzierten Signals, welches ebenfalls die ERK1/2-Phosphorylierung aktiviert. Hingegen ist bei der simultanen Behandlung der Gliazellen mit $A\beta_{1-42}$ und Fucoïdan der ERK1/2-Signalweg noch nicht desensibilisiert.

Interessanterweise zeigte sich, dass eine Behandlung mit Fucoïdan zu einer Hemmung der Forskolin-induzierten cAMP-Konzentration sowohl in Astrozyten als auch Mikroglia führt. Die Ergebnisse zeigen, daß an der Fucoïdan-induzierten Signaltransduktion ein inhibitorisches G-Protein beteiligt ist. Darüberhinaus ließ sich die Fucoïdan-induzierte Inhibition des cAMP-Spiegels durch eine Präinkubation der Zellen mit dem FPRL-1-Antagonisten WRW4 aufheben. Ebenfalls konnte die Fucoïdan-induzierte ERK1/2 Phosphorylierung in Astrozyten als auch in Mikroglia durch WRW4 gehemmt werden. Insgesamt lassen die Ergebnisse vermuten, daß der G_i -Protein-gekoppelte FPRL-1 an der Fucoïdan-induzierten Signaltransduktion beteiligt ist.

5.4 Zusammenspiel von SR-MARCO und FPRL-1

Um nun den Einfluß des SR-MARCO als auch der Formyl-Peptid-Rezeptoren auf die $A\beta_{1-42}$ - und Fucoïdan-induzierte Signaltransduktion zu untersuchen, setzen wir Rezeptorspezifische siRNA zur Herunterregulation der Rezeptoren in den Gliazellen ein. Weiterhin verwendeten wir Rezeptor-überexprimierende HEK293-Zellen.

In den mit FPRL-1-siRNA präinkubierten Astrozyten konnte sowohl der $A\beta_{1-42}$ - als auch der Fucoïdan-induzierte Anstieg von phosphoryliertem ERK1/2 (pERK1/2) signifikant inhibiert werden. Hingegen zeigten die mit siRNA für SR-MARCO behandelten Astrozyten nur eine Hemmung der Fucoïdan-induzierten Signaltransduktion, während die $A\beta_{1-42}$ -vermittelte ERK 1/2-Aktivierung weiterhin bestand. In den siRNA-Experimenten regulierten wir auch den *high affinity receptor* FPR selektiv herunter. Dies hatte jedoch weder auf die $A\beta_{1-42}$ - noch auf die Fucoïdan-induzierte ERK1/2-Aktivierung einen Einfluss und zeigt, dass dieser Formyl-Peptid-Rezeptor dabei eine untergeordnete Rolle spielt.

Die Ergebnisse konnten in den Rezeptor-überexprimierenden HEK293-Zellen verifiziert werden. Fucoïdan konnte in den HEK-Zellen, die nur mit MARCO oder FPRL-1 alleine transfiziert sind, keine Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität übermitteln. Erst bei einer Kotransfektion von MARCO und FPRL-1 kam es zu einer deutlichen Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Auch die Fucoïdan-induzierte ERK1/2-Aktivierung ist nur in den HEK-Zellen möglich, die auch den G_i-Protein-gekoppelten Rezeptor FPRL-1 exprimieren. Insofern scheint also insgesamt die A β ₁₋₄₂-induzierte Signaltransduktion FPRL-1-abhängig zu erfolgen, während für die Fucoïdan-induzierte Aktivierung der FPRL-1 als auch MARCO vorhanden sein müssen.

Um zu überprüfen, ob die vermeintlich funktionell zusammenhängenden Rezeptoren FPRL-1 und MARCO auch physisch miteinander interagieren, untersuchten wir eine mögliche Interaktion zwischen den Proteinen in der Koimmunopräzipitation. Die Ergebnisse zeigten, dass FPR beziehungsweise FPRL-1 mit MARCO in Gliazellen der Ratte physisch interagiert. Zwischen FPR und FPRL-1 konnten wir hingegen keine Interaktion feststellen. Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass FPR und FPRL-1 mit MARCO *in vitro* physisch assoziiert sind.

Hierfür sprechen ebenfalls die Ergebnisse der Doppelfluoreszenz-Mikroskopie, in denen FPR und FPRL-1 jeweils mit MARCO in Astrozyten und Mikroglia auf zellulärer Ebene kolokalisiert sind.

Die Ergebnisse der Koimmunopräzipitation lieferten außer dem Nachweis eines physischen Zusammenhangs zwischen FPRL-1 und MARCO auch einen weiteren Beleg für die funktionelle Zusammenarbeit der beiden Rezeptoren. Dies zeigten wir durch den Nachweis einer Agonisten-induzierten Phosphorylierung des präzipitierten FPR beziehungsweise FPRL-1. Die Agonisten-induzierte Phosphorylierung von GPCRs gehört zu den wichtigen Mechanismen, welche die Rezeptoraktivität regulieren. Sie kann durch *second messenger*-aktivierte-Kinasen oder durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) erfolgen. Zu ersteren gehören zum Beispiel die durch cAMP aktivierte Proteinkinase A und die durch Diacylglycerol (DAG) und Ca²⁺ aktivierte Proteinkinase C. Prossnitz et al. (1995) konnten zeigen, dass die Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten am Carboxy-Terminus von FPR besonders von der Aktivität der GRK2 abhängig ist. Die Phosphorylierung des aktivierten Rezeptors führt zur Bindung von β -Arrestinen und damit zur Entkopplung des Rezeptors von seinen G-Proteinen. Die an die negativ geladenen Phosphatreste gebundenen β -Arrestine fungieren ferner als „*scaffold*“-Moleküle (= Gerüst), indem sie direkt an intrazelluläre Proteine wie zum Beispiel die MAPK ERK1/2 binden. Diese werden dann nicht mehr über die gekoppelten G-Proteine, sondern direkt über den Rezeptor stimuliert (Huet et al., 2007).

In unseren Experimenten sahen wir keine Zunahme der Phosphorylierung von FPR nach Stimulation mit Fucoïdan oder $A\beta_{1-42}$ in Astrozyten und Mikroglia, während für den FPRL-1 die Behandlung zu einer Zunahme der Phosphorylierung führte. Die Aktivierung von SR-A-Rezeptoren wie MARCO durch Fucoïdan führt also zu einer Phosphorylierung des G_i -gekoppelten FPRL-1. In den mit FPRL-1 und MARCO kotransfizierten HEK293-Zellen konnten wir zwar eine physische Interaktion der beiden Rezeptoren nachweisen, nach $A\beta_{1-42}$ - bzw. Fucoïdan-Stimulation kam es jedoch im Unterschied zu den Gliazellen zu keiner signifikanten Zunahme der Interaktion. Dies zeigt die zellphysiologische Spezifität der Rezeptorinteraktion, die entscheidend für die Pathophysiologie des M. Alzheimer und anderer neurodegenerativer Erkrankungen sein kann.

Basierend auf unseren Ergebnissen stellen wir die Hypothese auf, dass $A\beta_{1-42}$ über den FPRL-1 die Signaltransduktion induziert und durch den Rezeptor internalisiert wird (Brandenburg et al., 2008) (s. **Abb. 11A**). Fucoïdan bindet an MARCO und die anschließende Signaltransduktion wird durch MARCO als auch FPRL-1 vermittelt (=Transaktivierung; s. **Abb. 11B**)

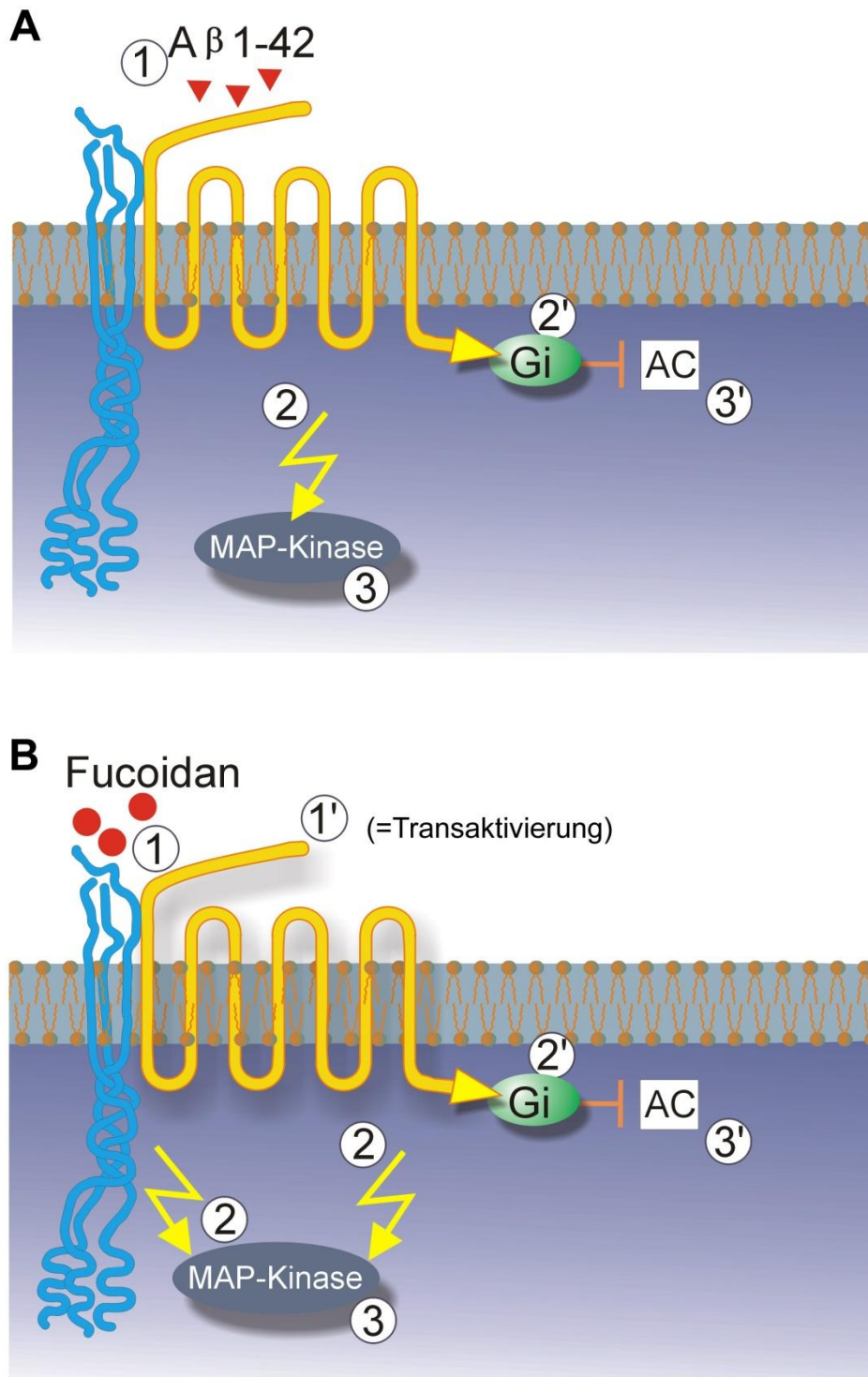


Abb. 11 Model der A β_{1-42} - und Fucoidan-induzierten Signaltransduktion in Gliazellen. (A) A β_{1-42} bindet an FPRL-1 (gelb dargestellt, 1), induziert die Signaltransduktion (2 und 3 für MAP-Kinase und 2' und 3' für Adenylatzyklase (AC)) und wird durch den Rezeptor internalisiert. Die A β_{1-42} -induzierte Signaltransduktion wird nicht durch die Interaktion mit MARCO beeinflusst. (B) Bezüglich der Fucoidan-induzierten Signaltransduktion stellen wir die Hypothese auf, dass Fucoidan an MARCO bindet und die darüber induzierte Signaltransduktion von FPRL-1 abhängig ist (2 und 3 für MAP-Kinase und 2' und 3' für Adenylatzyklase (AC)). Eine Aktivierung von MARCO durch Fucoidan induziert eine weitere Interaktion mit FPRL-1 und Stimulation von Signaltransduktionswegen (1' = Transaktivierung). (Quelle: eigener Entwurf)

Eine derartige Rezeptorinteraktion kann erklären, warum Formyl-Peptid-Rezeptoren mit einer so großen Bandbreite an strukturell unterschiedlichen Liganden interagieren können, die mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer-Demenz oder Prion-Erkrankungen, aber auch mit infektiösen Erkrankungen wie HIV oder bakteriellen Infektionen, assoziiert sind (Le et al., 2002). Bezüglich der $A\beta_{1-42}$ -induzierten Signaltransduktion in Astrozyten und HEK293-Zellen konnten wir keine Interaktion von FPRL-1 und MARCO nachweisen. Wir können jedoch nicht ausschließen, dass es weitere Interaktionspartner gibt, die außer FPRL-1 oder mittels Transaktivierung mit demselben, eine $A\beta_{1-42}$ -induzierte Signaltransduktion in Gliazellen vermitteln.

Andere mögliche Interaktionspartner für $A\beta$ sind beispielsweise der SR-BI (Husemann et al., 2001) oder CD36 aus der Klasse der SR-BII (Coraci et al., 2002; El Khoury et al., 2003). Beide Arbeitsgruppen machten die Beobachtung, dass eine Ausschaltung des jeweiligen Rezeptors in transgenen Mausmodellen oder die Blockade mit Antikörpern nur geringen bis gar keinen Einfluss auf eine $A\beta$ -vermittelte Endozytose, Zytokin- oder ROS-Produktion in muriner Mikroglia hatte. Fucoidan, das SR wahrscheinlich unspezifischer bindet, war jedoch in der Lage, zumindest die Adhäsion und Aufnahme von $A\beta$ zu verhindern. Die Funktion einzelner Scavenger-Rezeptoren bei der Interaktion mit $A\beta$ scheint nicht entscheidend zu sein. Es kann jedoch möglich sein, dass sie wie im Falle bei der von uns untersuchten Fucoidan-induzierten Signaltransduktion in Gliazellen unterstützend in die Interaktion mit eingreifen und so das Ligandenspektrum von spezifischeren Rezeptoren wie dem FPRL-1 erweitern.

Auch der Rezeptor für verstärkt glykosylierte Endprodukte (RAGE) (Origlia et al., 2009) und die *low-density receptor related proteins* (LRP) (Arelin et al., 2002; Laporte et al., 2004) werden unter dem Begriff der Scavenger-Rezeptoren geführt und gelten mittlerweile als mögliche Interaktionspartner von $A\beta$ und Vermittler verschiedener Effekte, wie Migration von Mikroglia und Generierung potentiell neurotoxischer Substanzen. Es ist möglich, dass auch RAGE oder LRP die $A\beta_{1-42}$ -induzierte Gliazellaktivierung vermitteln. Diese könnte über direkte Rezeptorinteraktion oder wie im Falle der Fucoidan-induzierten Signaltransduktion indirekt mittels Transaktivierung über FPRL-1 von statten gehen. An welche Rezeptoren $A\beta_{1-42}$ genau bindet, müssen Bindungsstudien zeigen. Desweiteren sollten zukünftige Studien klären, ob die verschiedenen $A\beta$ -Formen unterschiedliche Rezeptoren aktivieren und somit darüber die unterschiedliche Neurotoxizität erklärt werden kann.

Die Identifikation von Rezeptorinteraktionen bei der $A\beta_{1-42}$ -induzierten Gliazellaktivierung kann einen Beitrag zum Verständnis der Komplexität der Alzheimer-Krankheit leisten und nicht zuletzt neue spezifischere pharmakologische Interventionspunkte schaffen.

6. Zusammenfassung

Gliazellen rücken bei der Entschlüsselung der Pathophysiologie von neurodegenerativen Erkrankungen wie dem M. Alzheimer immer mehr ins Zentrum des Interesses. Es wird aber kontrovers diskutiert, ob ihre Aktivierung Folge der Wechselwirkung mit fehlgefalteten Proteinen wie $A\beta_{1-42}$ ist, oder ob eine bereits bestehende Gliazellaktivierung zu neurodegenerativen Prozessen disponiert beziehungsweise diese vorantreibt. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass aktivierte Mikroglia und Astrozyten proinflammatorische und neurotoxische Kaskaden anstoßen können, was letztendlich in den neuronalen Zelltod mündet.

Die Suche nach Oberflächenstrukturen, mit denen $A\beta_{1-42}$ interagiert und so dessen inflammatorische und neurotoxische Wirkung vermittelt, ergab, dass möglicherweise die Scavenger Rezeptoren oder die G-Protein-gekoppelten Formyl-Peptid-Rezeptoren an dieser Aufgabe beteiligt sind. Für beide Rezeptoren gibt es Hinweise auf eine Beteiligung bei der Adhäsion und Internalisierung von $A\beta_{1-42}$ und ferner bei der Sekretion proinflammatorischer Substanzen und reaktiver O_2 -Spezies.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Bedeutung des FPRL-1 für die Aktivierung von primären Astrozyten und Mikroglia der Ratte. Interessanterweise konnte eine durch einen SR-Liganden (Fucoidan) ausgelöste Aktivierung durch einen FPRL-1-Antagonisten (WRW4) gehemmt werden. In weiteren Experimenten konnten wir zeigen, dass die Fucoidan-induzierte Gliazellaktivierung auf die Funktion beider Rezeptoren, FPRL-1 und SR-MARCO, angewiesen ist. Wir konnten durch weitere Untersuchungen belegen, dass SR-MARCO und FPRL-1 funktionell und physisch bei einer Liganden-induzierten Gliazellaktivierung kooperieren, ohne dass eine direkte Beteiligung von MARCO an der $A\beta_{1-42}$ -induzierten Signaltransduktion vorliegt.

Unsere Ergebnisse führen uns zu dem Schluss, dass eine Gliazellaktivierung nicht durch einen einzelnen Rezeptor bedingt sein muss. Bezüglich der $A\beta_{1-42}$ -induzierten Gliazellaktivierung sprechen unsere Ergebnisse dafür, dass FPRL-1 alleine die Signaltransduktion vermitteln kann (s. **Abb. 11A**). Bezüglich der Fucoidan-induzierten Gliazellaktivierung schlagen wir ein Modell vor, in dem Fucoidan an MARCO bindet, darüber eine Rezeptor-Transaktivierung auslöst und die Signaltransduktion G_i -Protein abhängig über FPRL-1 vermittelt wird (s. **Abb. 11B**).

Das Modell kann erklären, warum FPRL-1 ein so strukturell breites Ligandenspektrum besitzt. Die Aufklärung weiterer Rezeptorinteraktionen von FPRL-1 mit anderen Rezeptoren wie LRP oder RAGE bei der Interaktion mit $A\beta_{1-42}$ kann von großem Interesse sein, da sie neue pharmakologische Targets bei der Herstellung von Alzheimer-Medikamenten sein können.

7. Literaturverzeichnis

Alarcon R, Fuenzalida C, Santibanez M, von BR. Expression of scavenger receptors in glial cells. Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound beta-amyloid. *J Biol Chem* 2005; 280: 30406-30415

Andreani M, Olivier JL, Berenbaum F, Raymondjean M, Bereziat G. Transcriptional regulation of inflammatory secreted phospholipases A(2). *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 149-158

Arelin K, Kinoshita A, Whelan CM, Irizarry MC, Rebeck GW, Strickland DK, Hyman BT. LRP and senile plaques in Alzheimer's disease: colocalization with apolipoprotein E and with activated astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 2002; 104: 38-46

Bamberger ME, Harris ME, McDonald DR, Husemann J, Landreth GE. A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J Neurosci* 2003; 23: 2665-2674

Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 1993; 7: 111-118

Barrow CJ, Yasuda A, Kenny PT, Zagorski MG. Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J Mol Biol* 1992; 225: 1075-1093

Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol* 2007; 28: 5-11

Beyreuther K, Dyrks T, Hilbich C, Monning U, König G, Multhaup G, Pollwein P, Masters CL. Amyloid precursor protein (APP) and beta A4 amyloid in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 1992; 379: 159-182

Bickel H. [Dementia syndrome and Alzheimer disease: an assessment of morbidity and annual incidence in Germany]. *Gesundheitswesen* 2000; 62: 211-218

Boulay F, Tardif M, Brouchon L, Vignais P. The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry* 1990; 29: 11123-11133

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254

Brandenburg LO, Konrad M, Wruck C, Koch T, Pufe T, Lucius R. Involvement of formyl-peptide-receptor-like-1 and phospholipase D in the internalization and signal transduction of amyloid beta 1-42 in glial cells. *Neuroscience* 2008; 156: 266-276

Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 223-261

Christie RH, Freeman M, Hyman BT. Expression of the macrophage scavenger receptor, a multifunctional lipoprotein receptor, in microglia associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1996; 148: 399-403

Christophe T, Karlsson A, Dugave C, Rabiet MJ, Boulay F, Dahlgren C. The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH₂ specifically activates neutrophils through FPRL1/lipoxin A₄ receptors and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2. *J Biol Chem* 2001; 276: 21585-21593

Chugani DC, Kedersha NL, Rome LH. Vault immunofluorescence in the brain: new insights regarding the origin of microglia. *J Neurosci* 1991; 11: 256-268

Chung H, Brazil MI, Irizarry MC, Hyman BT, Maxfield FR. Uptake of fibrillar beta-amyloid by microglia isolated from MSR-A (type I and type II) knockout mice. *Neuroreport* 2001; 12: 1151-1154

Cochran E, Bacci B, Chen Y, Patton A, Gambetti P, Uffliger-Gambetti L. Amyloid precursor protein and ubiquitin immunoreactivity in dystrophic axons is not unique to Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1991; 139: 485-489

Coraci IS, Husemann J, Berman JW, Hulette C, Dufour JH, Campanella GK, Luster AD, Silverstein SC, El-Khoury JB. CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on

microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am J Pathol* 2002; 160: 101-112

Cullen BR. RNA interference: antiviral defense and genetic tool. *Nat Immunol* 2002; 3: 597-599

Delidow BC, Lynch JP, Peluso JJ, White BA. Polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* 1996; 58: 275-292

DeWitt DA, Perry G, Cohen M, Doller C, Silver J. Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1998; 149: 329-340

Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 321-339

Dickson DW, Lee SC, Mattiace LA, Yen SH, Brosnan C. Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* 1993; 7: 75-83

Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia* 2001; 36: 180-190

Dumery L, Bourdel F, Soussan Y, Fialkowsky A, Viale S, Nicolas P, Reboud-Ravaux M. beta-Amyloid protein aggregation: its implication in the physiopathology of Alzheimer's disease. *Pathol Biol (Paris)* 2001; 49: 72-85

Durstin M, Gao JL, Tiffany HL, McDermott D, Murphy PM. Differential expression of members of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human phagocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 201: 174-179

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

El KJ, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* 1996; 382: 716-719

El KJ, Hickman SE, Thomas CA, Loike JD, Silverstein SC. Microglia, scavenger receptors, and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1998; 19: S81-S84

Elomaa O, Kangas M, Sahlberg C, Tuukkanen J, Sormunen R, Liakka A, Thesleff I, Kraal G, Tryggvason K. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell* 1995; 80: 603-609

Fanger BO. Adaptation of the Bradford protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopyranoside detergents. *Anal Biochem* 1987; 162: 11-17

Farfara D, Lifshitz V, Frenkel D. Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 762-780

Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 2007; 28: 138-145

Franc NC, White K, Ezekowitz RA. Phagocytosis and development: back to the future. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 47-52

Gao JL, Lee EJ, Murphy PM. Impaired antibacterial host defense in mice lacking the N-formylpeptide receptor. *J Exp Med* 1999; 189: 657-662

Gearing M, Wilson RW, Unger ER, Shelton ER, Chan HW, Masters CL, Beyreuther K, Mirra SS. Amyloid precursor protein (APP) in the striatum in Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993; 52: 22-30

Gether U, Kobilka BK. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 17979-17982

Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 120: 885-890

Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 333-337

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36: 59-74

Griffin GE, Leung K, Folks TM, Kunkel S, Nabel GJ. Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF-kappa B. *Nature* 1989; 339: 70-73

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 1986; 261: 6084-6089

Hampton RY, Golenbock DT, Penman M, Krieger M, Raetz CR. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* 1991; 352: 342-344

Haworth R, Platt N, Keshav S, Hughes D, Darley E, Suzuki H, Kurihara Y, Kodama T, Gordon S. The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *J Exp Med* 1997; 186: 1431-1439

Hsu HY, Chiu SL, Wen MH, Chen KY, Hua KF. Ligands of macrophage scavenger receptor induce cytokine expression via differential modulation of protein kinase signaling pathways. *J Biol Chem* 2001; 276: 28719-28730

Huet E, Boulay F, Barral S, Rabiet MJ. The role of beta-arrestins in the formyl peptide receptor-like 1 internalization and signaling. *Cell Signal* 2007; 19: 1939-1948

Husemann J, Loike JD, Anankov R, Febbraio M, Silverstein SC. Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia* 2002; 40: 195-205

Husemann J, Loike JD, Kodama T, Silverstein SC. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) mediates adhesion of neonatal murine microglia to fibrillar beta-amyloid. *J Neuroimmunol* 2001; 114: 142-150

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT, Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993; 32: 4693-4697

Joachim CL, Mori H, Selkoe DJ. Amyloid beta-protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease. *Nature* 1989; 341: 226-230

John GR, Lee SC, Song X, Rivieccio M, Brosnan CF. IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. *Glia* 2005; 49: 161-176

Johnstone M, Gearing AJ, Miller KM. A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol* 1999; 93: 182-193

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987; 325: 733-736

Kidd M. Alzheimer's Disease--An electron microscopical study. *Brain* 1964; 87: 307-320

Kim SH, Smith CJ, Van Eldik LJ. Importance of MAPK pathways for microglial pro-inflammatory cytokine IL-1 beta production. *Neurobiol Aging* 2004; 25: 431-439

Koo EH, Park L, Selkoe DJ. Amyloid beta-protein as a substrate interacts with extracellular matrix to promote neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 4748-4752

Kraal G, van der Laan LJ, Elomaa O, Tryggvason K. The macrophage receptor MARCO. *Microbes Infect* 2000; 2: 313-316

Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 601-637

Krieger M, Stern DM. Series introduction: multiligand receptors and human disease. *J Clin Invest* 2001; 108: 645-647

Laporte V, Lombard Y, Levy-Benezra R, Tranchant C, Poindron P, Warter JM. Uptake of Abeta 1-40- and Abeta 1-42-coated yeast by microglial cells: a role for LRP. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 451-461

Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1990; 39: 151-170

Le Y, Gong W, Tiffany HL, Tumanov A, Nedospasov S, Shen W, Dunlop NM, Gao JL, Murphy PM, Oppenheim JJ, Wang JM. Amyloid (beta)42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. *J Neurosci* 2001a; 21: RC123

Le Y, Hu J, Gong W, Shen W, Li B, Dunlop NM, Halverson DO, Blair DG, Wang JM. Expression of functional formyl peptide receptors by human astrocytoma cell lines. *J Neuroimmunol* 2000; 111: 102-108

Le Y, Li B, Gong W, Shen W, Hu J, Dunlop NM, Oppenheim JJ, Wang JM. Novel pathophysiological role of classical chemotactic peptide receptors and their communications with chemokine receptors. *Immunol Rev* 2000; 177: 185-194

Le Y, Murphy PM, Wang JM. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol* 2002; 23: 541-548

Le Y, Yazawa H, Gong W, Yu Z, Ferrans VJ, Murphy PM, Wang JM. The neurotoxic prion peptide fragment PrP(106-126) is a chemotactic agonist for the G protein-coupled receptor formyl peptide receptor-like 1. *J Immunol* 2001b; 166: 1448-1451

Lee HY, Kim MK, Park KS, Bae YH, Yun J, Park JI, Kwak JY, Bae YS. Serum amyloid A stimulates matrix-metalloproteinase-9 upregulation via formyl peptide receptor like-1-mediated signaling in human monocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 989-998

Lee SJ, Liyanage U, Bickel PE, Xia W, Lansbury PT, Jr., Kosik KS. A detergent-insoluble membrane compartment contains A beta in vivo. *Nat Med* 1998; 4: 730-734

Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* 1998; 273: 18677-18680

Lin H, Bhatia R, Lal R. Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J* 2001; 15: 2433-2444

Lorton D. beta-Amyloid-induced IL-1 beta release from an activated human monocyte cell line is calcium- and G-protein-dependent. *Mech Ageing Dev* 1997; 94: 199-211

Lorton D, Schaller J, Lala A, De NE. Chemotactic-like receptors and Abeta peptide induced responses in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000; 21: 463-473

Lue LF, Rydel R, Brigham EF, Yang LB, Hampel H, Murphy GM, Jr., Brachova L, Yan SD, Walker DG, Shen Y, Rogers J. Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia* 2001a; 35: 72-79

Lue LF, Walker DG, Rogers J. Modeling microglial activation in Alzheimer's disease with human postmortem microglial cultures. *Neurobiol Aging* 2001b; 22: 945-956

Luttrell LM, van BT, Hawes BE, Koch WJ, Krueger KM, Touhara K, Lefkowitz RJ. G-protein-coupled receptors and their regulation: activation of the MAP kinase signaling pathway by G-protein-coupled receptors. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1997; 31: 263-277

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 4245-4249

Mattiace LA, Davies P, Dickson DW. Detection of HLA-DR on microglia in the human brain is a function of both clinical and technical factors. *Am J Pathol* 1990; 136: 1101-1114

McCarthy KD, de VJ. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 1980; 85: 890-902

McDonald DR, Bamberger ME, Combs CK, Landreth GE. beta-Amyloid fibrils activate parallel mitogen-activated protein kinase pathways in microglia and THP1 monocytes. *J Neurosci* 1998; 18: 4451-4460

McDonald DR, Brunden KR, Landreth GE. Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide production in microglia. *J Neurosci* 1997; 17: 2284-2294

McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999; 46: 860-866

Monji A, Utsumi H, Ueda T, Imoto T, Yoshida I, Hashioka S, Tashiro K, Tashiro N. The relationship between the aggregational state of the amyloid-beta peptides and free radical generation by the peptides. *J Neurochem* 2001; 77: 1425-1432

Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, Davis RJ, Shirasaki Y, Greenberg ME. Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* 2001; 21: 7551-7560

Neve RL, McPhie DL, Chen Y. Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein(1). *Brain Res* 2000; 886: 54-66

Origlia N, Arancio O, Domenici L, Yan SS. MAPK, beta-amyloid and synaptic dysfunction: the role of RAGE. *Expert Rev Neurother* 2009; 9: 1635-1645

Paresce DM, Ghosh RN, Maxfield FR. Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron* 1996; 17: 553-565

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 639-650

Plant LD, Boyle JP, Smith IF, Peers C, Pearson HA. The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci* 2003; 23: 5531-5535

Prossnitz ER, Kim CM, Benovic JL, Ye RD. Phosphorylation of the N-formyl peptide receptor carboxyl terminus by the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* 1995; 270: 1130-1137

Prossnitz ER, Ye RD. The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 1997; 74: 73-102

Reiter E, Lefkowitz RJ. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17: 159-165

Resnick D, Freedman NJ, Xu S, Krieger M. Secreted extracellular domains of macrophage scavenger receptors form elongated trimers which specifically bind crocidolite asbestos. *J Biol Chem* 1993; 268: 3538-3545

Rhein V, Eckert A. Effects of Alzheimer's amyloid-beta and tau protein on mitochondrial function -- role of glucose metabolism and insulin signalling. *Arch Physiol Biochem* 2007; 113: 131-141

Rivieccio MA, John GR, Song X, Suh HS, Zhao Y, Lee SC, Brosnan CF. The cytokine IL-1beta activates IFN response factor 3 in human fetal astrocytes in culture. *J Immunol* 2005; 174: 3719-3726

Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 180-186

Rogers J, Lue LF, Walker DG, Yan SD, Stern D, Strohmeier R, Kovelowski CJ. Elucidating molecular mechanisms of Alzheimer's disease in microglial cultures. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2002a; 25-44

Rogers J, Strohmeier R, Kovelowski CJ, Li R. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia* 2002b; 40: 260-269

Rosenstiel P, Lucius R, Deuschl G, Sievers J, Wilms H. From theory to therapy: implications from an in vitro model of ramified microglia. *Microsc Res Tech* 2001; 54: 18-25

Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001; 81: 741-766

Selkoe DJ, Abraham CR, Podlisny MB, Duffy LK. Isolation of low-molecular-weight proteins from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1986; 46: 1820-1834

Shigematsu K, McGeer PL, Walker DG, Ishii T, McGeer EG. Reactive microglia/macrophages phagocytose amyloid precursor protein produced by neurons following neural damage. *J Neurosci Res* 1992; 31: 443-453

Su SB, Gong W, Gao JL, Shen W, Murphy PM, Oppenheim JJ, Wang JM. A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. *J Exp Med* 1999; 189: 395-402

Suh YH, Checler F. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 469-525

Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Sakaguchi H, Kruijt JK, Higashi T, Suzuki T, van Berkel TJ, Horiuchi S, Takahashi K, Yazaki Y, Kodama T. The multiple roles of macrophage scavenger receptors (MSR) in vivo: resistance to atherosclerosis and susceptibility to infection in MSR knockout mice. *J Atheroscler Thromb* 1997; 4: 1-11

Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Jr., Eckman C, Golde TE, Younkin SG. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 1994; 264: 1336-1340

Terry RD, Gonatas NK, Weiss M. Ultrastructural studies in Alzheimer's presenile dementia. *Am J Pathol* 1964; 44: 269-297

Tiffany HL, Lavigne MC, Cui YH, Wang JM, Leto TL, Gao JL, Murphy PM. Amyloid-beta induces chemotaxis and oxidant stress by acting at formylpeptide receptor 2, a G protein-coupled receptor expressed in phagocytes and brain. *J Biol Chem* 2001; 276: 23645-23652

Wegiel J, Wang KC, Tarnawski M, Lach B. Microglia cells are the driving force in fibrillar plaque formation, whereas astrocytes are a leading factor in plaque degradation. *Acta Neuropathol* 2000; 100: 356-364

Wilson CA, Doms RW, Lee VM. Intracellular APP processing and A beta production in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 787-794

Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 2003; 9: 453-457

Yankner BA, Benowitz LI, Villa-Komaroff L, Neve RL. Transfection of PC12 cells with the human GAP-43 gene: effects on neurite outgrowth and regeneration. *Brain Res Mol Brain Res* 1990; 7: 39-44

Yates SL, Burgess LH, Kocsis-Angle J, Antal JM, Dority MD, Embury PB, Piotrkowski AM, Brunden KR. Amyloid beta and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J Neurochem* 2000; 74: 1017-1025

Yazawa H, Yu ZX, Takeda, Le Y, Gong W, Ferrans VJ, Oppenheim JJ, Li CC, Wang JM. Beta amyloid peptide (A β 42) is internalized via the G-protein-coupled receptor FPRL1 and forms fibrillar aggregates in macrophages. *FASEB J* 2001; 15: 2454-2462

Younkin SG. Evidence that A β 42 is the real culprit in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995; 37: 287-288

8. Abkürzungen

AD	Alzheimer Demenz
AP	Adapterprotein
APP	Amyloid-Precursor-Protein
A β -Peptid	Amyloid-beta-Peptid
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DAG	Diacylglycerol
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-related kinase</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FAD	familiäre Alzheimer Demenz
fA β	fibrilläres A β
fMLF	Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
FPR	<i>formyl peptide receptor</i>
FPRL-1	<i>formyl peptide receptor like-1</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
G $_i$ -Protein	inhibitorisches GTP-bindendes Protein
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible NO-synthase</i>
JNK	<i>c-Jun-N-terminal kinase</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LRP	<i>low density lipoprotein-related receptor protein</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MARCO	<i>macrophage receptor with collagenous structure</i>
MCP	<i>monocyte chemoattractant peptide</i>
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
MeOH	Methanol
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>

MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSR	<i>macrophage scavenger receptor</i>
nf A β	<i>non-fibrillar Aβ = sAβ = soluble Aβ</i>
NFT	<i>neurofibrillary tangles</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NP	<i>neuritic plaques</i>
NSAID	<i>non steroidal anti inflammatory drug</i>
NT	<i>neuropil threads</i>
oxLDL	<i>oxidiertes low density lipoprotein</i>
p38	<i>p38 mitogen activated kinase</i>
PBM	periphere Blutmonozyten
PI3-K	Phosphoinositol-3-Kinase
PK	Proteinkinase
PL	Phospholipase
Poly(I)	Poly-Inosin-Säure
PrP	Prion Protein
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
P/S	Penicillin-Streptomycin-Lösung
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
RAGE	<i>receptor for advanced glycation products</i>
ROS	reaktive O ₂ -Spezies
RT-PCR	<i>reverse transkriptase-polymerase chain reaction</i>
SAA	Serum-Amyloid A
SDAT	senile Demenz vom Alzheimer Typ
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SR	Scavenger-Rezeptor
SRC kinase	<i>sarcoma kinase</i>
STM	sieben transmembran Regionen
TGF	<i>tissue growth factor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
WRW4	Tryptophan-Argenin-(Tryptophan) ₄
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. Anhang

1. Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Ralph Lucius für die interessante Themenstellung und für die Begleitung während dieses Projektes bedanken. Für die Überlassung des Arbeitsplatzes in seinem Institut sowie für seine freundliche Führung bedanke ich mich ebenfalls recht herzlich bei Herrn Professor Dr. Jobst Sievers.

Besonders möchte ich die hervorragende Betreuung, Unterstützung und unermüdliche Hilfsbereitschaft von Herrn Dr. rer. nat. Lars-Ove Brandenburg herausheben. Er stand mir sowohl während der praktischen Phase im Labor als auch in der nicht minder intensiven Zeit des Niederschreibens meiner Ergebnisse stets mit Rat und Tat zur Seite. Außerdem gilt mein besonderer Dank den medizintechnischen Assistentinnen Rosemarie Sprang, Patrycja Kozak and Regine Worm für die exzellente labortechnische Unterstützung.

Für die stetige Aufmunterung und Unterstützung während der schriftlichen Phase dieser Arbeit danke ich von ganzem Herzen meiner geliebten Freundin Jenny Dräger und meinem ehemaligen Mitbewohner Jonas Volger. Nicht zuletzt gebührt meinen Eltern besonderer Dank, ohne die mein Medizinstudium und diese Promotion nicht möglich gewesen wären. Die Arbeit sei meinem verstorbenen und an M. Alzheimer erkrankten Großvater Dr. med. Gustav Konrad gewidmet.

2. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Maximilian Konrad
Anschrift	Holtener Strasse 120, 24105 Kiel
Geburtstag und -ort	06.04.1981 in Zweibrücken
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

08/1987 – 07/1991	Grundschule Bruchmühlbach-Miesau
08/1991 – 06/2000	Saarpfalzgymnasium Homburg/Saar Leistungskurse: Englisch, Biologie, Chemie
06/2002	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

08/2000 – 07/2001	Tätigkeit im Rettungsdienst beim Deutschen Roten Kreuz Homburg/Saar als staatlich geprüfter Rettungssanitäter
-------------------	--

Hochschulausbildung

10/2001 – 02/2004	Studium der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum
04/2004 – 03/2005	Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen
03/2005	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2005 – 06/2009	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
02/2006 – 01/2008	Experimentelle Durchführung der vorliegenden Dissertation am Anatomischen Institut der Universität zu Kiel unter der Leitung von Prof. Dr. Ralph Lucius
02/2008 – 01/2009	Praktisches Jahr: Erstes Tertial: Neurochirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Zweites Tertial: Chirurgie

a) Texas Heart Institute, Houston, USA

b) St. Joseph's Health Center, Toronto, Kanada

Drittes Tertial: Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus
Kiel

06/2009

Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

07/2009

Approbation als Arzt

Berufliche Erfahrung

seit 08/2009

Assistenzarzt im KKH Eckernförde/Rendsburg, Abteilung
für Allgemein- und Viszeralchirurgie

Veröffentlichungen

Brandenburg L. O., Konrad M., Wruck C., Koch T., Lucius R. & Pufe T. 2010, "Functional and physical interactions between Formyl-Peptide-Receptors and Scavenger Receptor MARCO and their involvement in Amyloid beta 1-42 (A β 1-42)-induced signal transduction in Glial Cells", *Journal of Neurochemistry*, Published Online: 5 Feb 2010, Epub ahead of print

Brandenburg L. O., Konrad M., Wruck C., Koch T., Pufe T., & Lucius R. 2008, "Involvement of formyl-peptide-receptor-like-1 and phospholipase D in the internalization and signal transduction of amyloid beta 1-42 in glial cells", *Neuroscience*, vol. 156, no. 2, pp. 266-276.