

---

# **Charakterisierung und Isoform-abhängige Funktionsuntersuchung des Apolipoprotein E in Mikroglia-Zellen im Kontext der Alzheimer- Erkrankung**

Dissertationsschrift zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)

im Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**M.Sc. Christiane Muth**  
aus Röbel/Müritz

Hamburg, 2018

**Vorsitz der Prüfungskommission:**

Prof. Dr. Arp Schnittger

Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg

**Gutachter:**

**1. Prof. Dr. Julia Kehr**

Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg

**2. Prof. Dr. Markus Glatzel**

Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Tag der Disputation:**

26.10.2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>9</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>12</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1 Die Alzheimer Erkrankung – eine neurodegenerative Erkrankung</b> .....	<b>14</b>
1.1.1 Die Geschichte der Alzheimer Erkrankung.....	14
1.1.2 Prävalenz und Epidemiologie .....	15
1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren .....	16
1.1.5 Neuropathologie der Alzheimer Erkrankung .....	18
<b>1.2 Mikroglia – zerebrale Immuneffektorzellen</b> .....	<b>20</b>
1.2.1 Ursprung und Entwicklung.....	20
1.2.2 Die Mikroglia-Aktivierung.....	21
1.2.3 Funktionen von Mikroglia-Zellen.....	23
1.2.4 Die Rolle der Mikroglia in der Alzheimer Erkrankung .....	27
<b>1.3 Der AD-Haupttrisikofaktor ApoE</b> .....	<b>28</b>
1.3.1 Physiologische Funktionen des ApoE.....	28
1.3.2 Genetik und Struktur des ApoE.....	30
1.3.3 ApoE4 als Haupttrisikofaktor der AD .....	31
<b>1.4 Zielsetzung</b> .....	<b>32</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>33</b>
<b>2.1 Laborgeräte und Materialien</b> .....	<b>33</b>
2.1.1 Laborgeräte.....	33
2.1.2 Glas- und Kunststoffverbrauchsmaterialien .....	34
2.1.3 Chemikalien und Enzyme .....	35
2.1.4 Antikörper und Farbstoffe.....	35
2.1.5 Kits .....	36
2.1.6 Stimulatoren.....	37
2.1.7 Software .....	37
<b>2.2. Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>38</b>
2.2.1 Nährmedien .....	38
2.2.2 Zelllinien.....	38
2.2.3 Subkultivierung eukaryontischer Zellen.....	39
2.2.4 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen.....	39

2.2.5 Transwell-Assay (Boyden-Chamber-Assay).....	40
2.2.6 Scratch-Assay.....	40
2.2.7 Transiente Transfektion.....	41
2.2.8 Dual-Luciferase <sup>®</sup> -Reporter-Assay.....	41
2.2.9 Bildgebende Durchflusszytometrie.....	42
2.2.10 Immunfluoreszenzfärbung.....	43
<b>2.3 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>43</b>
2.3.1 RNA-Isolierung.....	43
2.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	44
2.3.2.1 Semiquantitative PCR.....	44
2.3.2.2 PCR zur Modifizierung von Gensequenzen .....	45
2.3.3 Taq-Man <sup>™</sup> -Genexpressions-Assay.....	45
2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese .....	47
2.3.5 Klonierung.....	47
2.3.5.1 Plasmide und Bakterienstämme .....	47
2.3.5.2 Isolierung genomischer DNA aus Zellmaterial .....	48
2.3.5.3 Amplifizierung und Aufreinigung genomischer DNA .....	49
2.3.5.4 Restriktionsverdau .....	49
2.3.5.5 Gelextraktion aus Agarosegelen.....	50
2.3.5.6 Ligation .....	50
2.3.5.7 Transformation.....	51
2.3.5.8 Plasmid-Minipräparation.....	51
2.3.5.9 Plasmid-Medipräparation.....	51
2.3.6 Genmodifizierung mittels CRISPR/Cas9-System (Genome Editing).....	52
2.3.7 Transduktion mit Hilfe lenti-assoziiierter Vektoren.....	53
2.3.8 Massenspektrometrische Proteomik.....	53
2.3.9 Edman-Sequenzierung.....	53
<b>2.4 Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>54</b>
2.4.1 Proteinisolierung.....	54
2.4.2 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
2.4.3 Western Blot.....	56
2.4.5 Immunpräzipitation (IP).....	57
2.4.4 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	57
2.4.5 Subzelluläre Fraktionierung.....	57
<b>2.5 Statistische Analyse von Daten .....</b>	<b>57</b>
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
<b>3.1 Charakterisierung des ApoE im murinen Zellsystem .....</b>	<b>58</b>
3.1.1 Stimulus-abhängige Regulation der ApoE-Expression .....	59

3.1.2 Lokalisationsbestimmung des ApoE.....	60
3.1.3 Untersuchung der ApoE-abhängigen Zellmigration .....	62
<b>3.2 Untersuchung der humanen ApoE-Isoformen unter zell-, protein- und molekulargenetischen Aspekten .....</b>	<b>63</b>
3.2.1 ApoE-basierte Genmodifikation im murinen Zellsystem.....	63
3.2.2 ApoE-abhängige Regulation der Zellmorphologie bzw. der Aktin-Zytoskelett-Reorganisation.....	65
3.2.3 Untersuchung des Migrationsverhaltens von murinen Mikroglia-Zellen in Abhängigkeit der humanen ApoE-Isoformen .....	68
3.2.4 ApoE-Isoform-abhängige Veränderung der Phagozytose von Mikroglia-Zellen <i>in vitro</i> .....	70
3.2.5 Untersuchung relevanter Proteine in der Regulation der ApoE-abhängigen Morphologie, Migration und Phagozytose in murinen N9-Mikroglia-Zellen .....	71
<b>3.3 ApoE als Genregulator .....</b>	<b>73</b>
3.3.1 Verifizierung möglicher ApoE-regulierter Gene.....	73
3.3.2 Untersuchung der ApoE-Bindung an die Promotorbereiche von Mef2a, Bhlhe40 und Tfec .....	74
3.3.3 ApoE-abhängige Regulation der Promotoraktivität von Mef2a, Bhlhe40 und Tfec.....	76
3.3.4 Proteasominhibierung zeigt ein neues spezifisches ApoE-Fragment .....	76
3.3.5 Lokalisationsbestimmung des durch Proteasominhibierung identifizierten ApoE-Fragments .....	78
3.3.6 Charakterisierung des ApoE-Fragments mittels Sequenz-Analysen .....	79
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>81</b>
4.1 Charakterisierung des ApoE im murinen N9-Mikroglia-Zellsystem.....	81
4.2 ApoE-Isoform-abhängige mikrogliale Morphologie, Migration und Phagozytose.....	85
4.3 ApoE als Genregulator .....	88
4.4 Ausblick .....	92
<b>Anhang .....</b>	<b>106</b>
A1 verwendete Plasmide .....	106
A2 Mef2a: wichtiger Faktor in der Mikroglia-Aktivierung.....	108
A3 Aminosäure-Kodierung.....	109
<b>Publikation .....</b>	<b>110</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>111</b>
<b>Eidesstaatliche Erklärung .....</b>	<b>112</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Prozentuale Veränderung ausgewählter Todesursachen	16
Abb. 1.2:	Neuropathologie eines AD-Gehirns	18
Abb. 1.3:	Mikroglia	20
Abb. 1.4:	Morphologie und Aktivierung von Mikroglia-Zellen	22
Abb. 1.5:	Die amöboide Migration	25
Abb. 1.6:	Arten und Ablauf der Endozytose	26
Abb. 1.7:	Entwicklung, Aktivierung und Funktionen von Mikroglia	26
Abb. 1.8:	Cholesterin-Transport im ZNS	29
Abb. 1.9:	ApoE-Proteinstruktur und Isoform-spezifische Unterschiede	30
Abb. 1.10:	Zielsetzung	32
Abb.: 2.1	Prinzip des Transwell-Assay	40
Abb.: 2.2	Prinzip eines Scratch-Assays	40
Abb.: 2.3	Ablaufplan Phagozytose-Assays	42
Abb. 2.4:	Ablauf des CRISPR/Cas-Systems	52
Abb. 3.1:	Stimulierung/Suppression der ApoE-Expression <i>in vitro</i> .	59
Abb. 3.2:	Lokalisationsbestimmung des ApoE in N9-Mikroglia-Zellen.	60
Abb. 3.3:	Untersuchung der Kolokalisation von ApoE mit verschiedenen Kompartimenten in N9-Mikroglia-Zellen.	61
Abb. 3.4:	Regulation des Migrationsverhaltens von N9-Mikroglia-Zellen <i>in vitro</i> durch Behandlung mit verschiedenen Substanzen.	62
Abb. 3.5:	Modell für die PCR zur Modifikation der ApoE3-Gensequenz.	64
Abb. 3.6:	Expression von ApoE2/3/4 und ApoE-Knockout in murinen N9-Zellen.	65
Abb. 3.7:	Morphologische Veränderungen nach Überexpression von ApoE4 bzw. ApoE-Knockout.	66
Abb. 3.8:	Untersuchung der Zellmorphologie mit Hilfe von 3D-Rekonstruktionen.	67
Abb. 3.9:	Untersuchung der Morphologie mittels bildgebender Durchflusszytometrie.	68
Abb. 3.10:	ApoE-abhängiges Migrationsverhalten von N9-Mikroglia-Zellen <i>in vitro</i> .	69
Abb. 3.11:	Untersuchung der ApoE-Isoform-abhängigen Phagozytoseeigenschaften bei N9-Mikroglia-Zellen mittels bildgebender Durchflusszytometrie.	71
Abb. 3.12:	Identifizierung von Effektorproteinen in der ApoE-abhängigen Regulation der Morphologie, Migration und Phagozytose.	72
Abb. 3.13:	Voruntersuchungen zur ApoE-abhängigen Genregulation.	74
Abb. 3.14:	Überprüfung der ApoE-Bindung an die Promotorbereiche von Mef2a, Bhlhe40 und Tfec in HEK293T-Zellen unter ApoE3-Überexpression.	75

Abb. 3.15: Untersuchung der ApoE-abhängigen Regulation der Promotoraktivität mittels Luciferase-Assay.	76
Abb. 3.16: Proteasominhibierung mittels MG132-Behandlung.	77
Abb. 3.17: Lokalisationsbestimmung des ApoE-Fragmentes durch Fraktionierung von N9-Zelllysat.	78
Abb. 3.18: Identifizierung der putativen Peptidsequenz des spezifischen ApoE-Fragmentes.	80
Abb. 4.1: Vorgeschlagenes Modell der ApoE4-vermittelten Migration und Phagozytose-Regulation.	88
Abb. A3: Mef2a: wichtiger Faktor in der Mikroglia-Aktivierung.	108

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Verwendete Geräte	33
Tab. 2.2:	Verwendete Glas- und Kunststoffverbrauchsmaterialien	34
Tab. 2.3:	Primär- und Sekundärantikörper für Western Blotting und Immunzytochemie	35
Tab. 2.4:	Konjugierte Antikörper	36
Tab. 2.5:	Verwendete Kits	36
Tab. 2.6:	Verwendete Stimulatoren	37
Tab. 2.7:	Zelllinien	38
Tab.: 2.8:	Programm der semiquantitativen PCR	44
Tab.: 2.9:	Verwendete Oligonukleotide	44
Tab. 2.10:	Verwendete Oligonukleotide für die spezifische Mutation	45
Tab. 2.11:	Programm für die qPCR im Real-Time-PCR-System	46
Tab. 2.12:	Verwendete TaqMan <sup>TM</sup> -Sonden	46
Tab. 2.13:	Verwendete Plasmide	47
Tab. 2.14:	Verwendete Bakterienstämme	48
Tab. 2.15:	Verwendete Restriktionsenzyme	50
Tab. 2.16:	Zusammensetzung der 1D-Gele	55
Tab. A3:	Aminosäure-Kodierung	109

## Abkürzungsverzeichnis

$\infty$	unendlich
%	Prozent
°C	Grad Celsius
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Mikrogramm pro Mikroliter
$\mu\text{g}/\text{ml}$	Mikrogramm pro Milliliter
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{m}^2$	Quadratmikrometer
$\mu\text{m}/\text{min}$	Mikrometer pro Minute
Ab	Antikörper (engl.: antibody)
Abb.	Abbildung
ABCA1	engl.: ATP-binding cassette transporter A1
AD	Alzheimer Erkrankung (engl.: alzheimer's disease)
A.dest.	Aqua destillate
AKT	Proteinkinase B
ApoD	Apolipoprotein D
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE <sup>-/-</sup> MG-dn $\Phi$	Wildtyp-Mikroglia mit neurodegenerativer Aktivierung und Apolipoprotein-E-Knockout
APP	amyloides Vorläuferprotein (engl.: amyloid precursor protein)
APS	Ammoniumpersulfat
A $\beta$	Amyloid- $\beta$
A $\beta$ <sub>1-42</sub>	Amyloid- $\beta$ <sub>1-42</sub>
Arg	Arginin
ARG1	Arginase 1
ATP	Adenosin-Triphosphat
Bhlhe22	engl.: basic helix-loop-helix family member E22
Bhlhe40	engl.: basic helix-loop-helix family member E40
BDNF	engl.: brain-derived neurotrophic factor
C5a	Komplementfaktor 5a (engl.: complement factor 5a)
ca.	circa
Cas	Abschnitte repetitiver DNA assoziierte Endonuklease
CD	Differenzierungsmarker (engl.: cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl.: complementary desoxyribonuclein acid)
Ch	Kanal (engl.: channel)
ChiP	Chromatin-Immunpräzipitation
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	Abschnitte repetitiver DNA (engl.: clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
CSF	Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit (engl.: cerebrospinal fluid)
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ctrl	Kontrolle
Cy7	Cyanin-7
Cys	Cystein
DAMPS	Schaden-assoziierte molekulare Muster (engl.: damaged-associated molecular pattern)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	engl.: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EOAD	früh einsetzende Alzheimer Erkrankung (engl.: early onset alzheimer's disease)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazellulär-signal regulierte Kinase
et al.	et alii, et aliaea, et alia
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
FAD	familiäre Alzheimer Erkrankung (engl.: familiar alzheimer's disease)
FBS	fetales Kälberserum (engl.: fetal bovine serum)
FPKM	engl.: fragments per kilobase million
Fwd	vorwärts (engl.: forward)
g	Gramm
GapDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
gRNA	engl.: guide ribonucleic acid
GSK3 $\beta$	Glykogensynthase-Kinase 3
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Diwasserstoffmonoxid
HCL	Chlorwasserstoff
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
iba-1	ionisierter Kalzium-Bindeadapter 1
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1 (engl.: insuline-like growth factor 1)
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
kDA	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KO	Knockout
l	Liter
LB	engl.: lysogeny broth
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (engl.: low density lipoprotein)
LDLR	Rezeptor für Lipoproteine niedriger Dichte (engl.: low density lipoprotein receptor)
LOAD	spät einsetzende Alzheimer Erkrankung (engl.: late onset alzheimer's disease)
LPS	Lipopolysaccharid
LXR	Leber-X-Rezeptor
M	Molar
MAPT	engl.: microtubule associated protein tau
Mef2a	engl.: myocyte enhancer factor 2A
MG132	Benzyl N-[(2S)-4-methyl-1-[[[(2S)-4-methyl-1-[[[(2S)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]carbamate
MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplex 1 (engl.: major histocompatibility complex 1)
MHC-II	Haupthistokompatibilitätskomplex 2 (engl.: major histocompatibility complex 2)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: messenger ribonucleic acid)
n	Anzahl
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NaCl	Natriumchlorid
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
NGF	Nervenwachstumsfaktor (engl.: nerve growth factor)
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NT	Neurotrophin
N-Terminus	Amino-Terminus
NFTs	neurofibrilläre Tangles

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAKT	Phospho-Proteinkinase B
PAMPS	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl.: pathogen-associated molecular pattern)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PE	Phycoerythrin
PTEN	Phosphatase und Tensin homolog
PURO	Puromycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rev	rückwärts (engl.: revers)
PFA	Paraformaldehyd
pGSK3 $\beta$	Phospho-Glykogensynthase-Kinase 3
pH	negativer dekadischer Logarithmus
qPCR	quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion
RhoA	engl.: ras homolog gene family, member A
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
ROCK1	engl.: rho-associated coiled-coil containing kinases 1
ROCK2	engl.: rho-associated coiled-coil containing kinases 2
ROS	reaktiven Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minuten (engl.: rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-1640
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	engl.: real-time-polymerase-chain-reaction
s	Sekunde(n)
SAD	sporadische Alzheimer Erkrankung (engl.: sporadic alzheimer's disease)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl.: tris-buffered saline)
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20 (engl.: tris-buffered saline with Tween20)
TEMED	Tetramethylendiamin
Tfeb	Transkriptionsfaktor EB
Tfec	Transkriptionsfaktor EC
TGF $\beta$	transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ (engl.: transforming growth factor $\beta$ )
TLR	Toll-like-Rezeptoren
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrosis-Faktor $\alpha$
TO901317	N-(2,2,2-trifluoro-ethyl)-N-[4-(2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-trifluoromethyl-ethyl)-phenyl]-benzenesulfonamide
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	Ultraviolett
V	Volt
VLDL	Lipoproteine sehr niedriger Dichte (engl.: very low density lipoprotein)
Wt	Wildtyp
WT MG-dn $\Phi$	Wildtyp-Mikroglia mit neurodegenerativer Aktivierung
WT MG-n $\Phi$	Wildtyp-Mikroglia
ZNS	zentrales Nervensystem

## Zusammenfassung

Die Alzheimer Erkrankung (AD, engl.: alzheimer's disease) ist die häufigste Form der Demenz und wird zu einem immer größer werdenden Problem in unserer überalterten Gesellschaft. Aktuelle Therapien richten sich gegen die AD spezifischen Amyloid- $\beta$ -Plaques (A $\beta$ -Plaques), verzögern den Krankheitsverlauf jedoch nicht. Neue Untersuchungen konnten die Bedeutung der Mikroglia-Zellen im Erkrankungsprozess in den Fokus der AD stellen. Es wurde gezeigt, dass Mikroglia während der AD-Pathogenese einen krankheitsspezifischen Phänotyp entwickeln, welcher die AD-Progression unterstützt. Das Apolipoprotein E (ApoE) mit der Isoform E4, dem Hauptrisikofaktor an AD zu erkranken, könnte in diesem Phänotypwechsel eine entscheidende Rolle spielen. Eine potentielle ApoE-spezifische Mikroglia-Dysregulation sollte in der vorliegenden Arbeit näher betrachtet werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Charakterisierung von ApoE in der murinen Mikroglia-Zelllinie N9. Hierfür wurden mögliche Stimulatoren der ApoE-Expression untersucht und dessen Einfluss auf die mikrogliale Migration bestimmt. Die Kollokalisationsstudien von ApoE demonstrierten, dass dieses Protein vermutlich im Endoplasmatisches Retikulum (ER) synthetisiert, über den Golgi transportiert und teilweise in den Lysosomen degradiert wird. Anschließend erfolgte die Untersuchung ApoE-Isoform-abhängiger Veränderungen in der Physiologie von Mikroglia-Zellen. Die Isoform ApoE4 beeinflusste sowohl die Morphologie als auch die Migration und Phagozytose von N9-Zellen. Diese ApoE4-abhängige Veränderung des Mikroglia-Verhaltens könnte zum krankheitsbedingten Phänotyp beitragen, welcher vor allem in neurodegenerativen Erkrankungen von Bedeutung ist. Abschließend wurde die potentielle Rolle von ApoE als Transkriptionsfaktor untersucht. Es konnte eine Bindung von ApoE an die Promotorbereiche verschiedener Gene demonstriert werden, welche darüber hinaus zu einer Zunahme der Promotoraktivität führte. Die durchgeführten Experimente konnten zeigen, dass ApoE als Transkriptionsfaktor verschiedene Signaltransduktionswege von Mikroglia-Zellen regulieren und somit die Ausbildung des krankheitsassoziierten Phänotyps auf transkriptionaler Ebene unterstützen könnte. Des Weiteren konnte ein spezifisches intrazelluläres ApoE-Fragment identifiziert werden, welches möglicherweise als Transkriptionsfaktor in N9-Mikrogliazellen fungiert.

Die in dieser Arbeit identifizierte spezifische Dysregulation von Mikroglia-Zellen durch ApoE4 sowie die putative Funktion von ApoE als Transkriptionsfaktor zeigt die intrinsische Bedeutung dieses Proteins, welche vermutlich eine wichtige Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen spielt.

## Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia and is becoming an increasing problem in our overaged society. Current therapies are targeting the AD specific amyloid- $\beta$  plaques (A $\beta$ -plaques), but do not delay the course of the disease. New investigations are able to focus the importance of microglial cells in the disease process of AD. It has been shown that microglia develop a disease-specific phenotype during AD pathogenesis, which supports AD progression. The Apolipoprotein E (ApoE) with their isoform E4, the major genetic risk factor for developing AD, could play a crucial role in this phenotypical change. A potential ApoE-specific microglia dysregulation should be considered in the present work.

The aim of this thesis was the characterization of ApoE in the murine microglia cell line N9. For this purpose, possible stimulators of ApoE expression were investigated and their influence on microglial migration were determined. The colocalization studies of ApoE demonstrated that this protein is thought to be synthesized in the endoplasmic reticulum (ER), transported across the Golgi, and partially degraded in the lysosomes. Subsequently, the study of ApoE isoform-dependent changes in the physiology of microglial cells was carried out. The isoform ApoE4 altered both the morphology and the migration as well as the phagocytosis of N9 cells. This ApoE4-dependent influence of the microglial behavior contributes to the disease-related phenotype, which could be of importance in neurodegenerative diseases. Finally, the potential role of ApoE as a transcriptional factor was investigated. A binding of ApoE to the promoter regions of different genes could be demonstrated, which also increased the promoter activity. The experiments demonstrated that ApoE, as a transcription factor, could regulate different signal transduction pathways of microglial cells and thus support the development of the disease-associated phenotype at the transcriptional level. Furthermore, a specific intracellular ApoE fragment could be identified, which presumably functions as a transcription factor in N9 microglia cells.

The specific dysregulation of microglial cells by ApoE4 as well as the putative function of ApoE as a transcriptional factor identified in this work demonstrated the intrinsic importance of this protein, which may play an important role in neurodegenerative diseases.

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Alzheimer Erkrankung – eine neurodegenerative Erkrankung

Die AD zählt zu den neurodegenerativen Erkrankungen, von welchen weltweit Millionen von Menschen betroffen sind<sup>3</sup>. Neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Huntington oder amyotrophe Lateralsklerose sind gekennzeichnet durch einen fortschreitenden Verlust von Neuronen, verursacht durch die Ablagerung sowie Aggregation körpereigener fehlgefalteter Proteine<sup>4,5</sup>. Dies führt zu verschiedenen kognitiven, neurologischen und psychiatrischen Symptomen (z.B.: Gedächtnis-, Sprach- und Orientierungsstörungen)<sup>6</sup>. Eine Kausaltherapie der AD ist bisher nicht möglich, weshalb die Erkrankung sowohl für die Betroffenen als auch für die Angehörigen, aber auch für unser Gesundheitssystem, eine enorme Herausforderung darstellt. Die grundlegenden Mechanismen der verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen sind trotz umfangreicher Studien bis heute nicht vollständig verstanden.

#### 1.1.1 Die Geschichte der Alzheimer Erkrankung

Die AD wurde erstmals vom deutschen Psychologen und Neuropathologen Alois Alzheimer (1865 - 1915) in seiner Abhandlung „Über eine eigenartige Krankheit der Hirnrinde“ beschrieben<sup>7,8</sup>. In dieser beschreibt Alzheimer den Fall seiner Patientin Auguste Deter, welche 1901 aufgrund auffälliger Eifersuchtsanfälle gegenüber ihres Mannes in eine psychiatrische Klinik eingewiesen wurde. Auguste Deter wurde über 5 Jahre von Alois Alzheimer beobachtet, wobei er Gedächtnisschwächen, Halluzinationen, Größenwahn, Apraxie sowie Sprach- und Verhaltensstörungen feststellen konnte. Nachdem Auguste Deter im Jahr 1906 verstarb, unterzog Alzheimer sie einer Obduktion. Bei dieser stellte er eine schwere Atrophie ihres Gehirns sowie Proteinablagerungen im gesamten Kortex fest. Auguste Deter gilt bis heute als erster dokumentierter Fall der presenilen Demenz<sup>9</sup>. Eine Bildung von Plaques innerhalb der grauen Hirnsubstanz wurde jedoch bereits 1892 durch die Pathologen Blocq und Marinesco beschrieben<sup>10</sup>.

Darüber hinaus postulierte Teofil Simchowicz, der von 1907 - 1910 bei Alois Alzheimer arbeitete, einen Zusammenhang zwischen Plaques und der Amyloid-Demenz<sup>11</sup>. Die offizielle Bezeichnung „Alzheimer Erkrankung“ geht auf Emil Kraepelin

zurück, der in seinem „Lehrbuch der Psychiatrie“ (1910) die Erkrankung erstmals nach Alois Alzheimer benannte<sup>12</sup>.

### 1.1.2 Prävalenz und Epidemiologie

Nach den Herz-/Kreislaufkrankungen, den Tumorerkrankungen und dem Schlaganfall ist die AD die vierthäufigste Ursache von krankheitsbedingten Todesfällen in den westlichen Industriestaaten<sup>13,14</sup> (Abb. 1.1). Weltweit sind mehr als 40 Millionen Menschen an AD erkrankt, wobei ca. 5 Millionen Neuerkrankungen jährlich hinzukommen<sup>15,16</sup>.

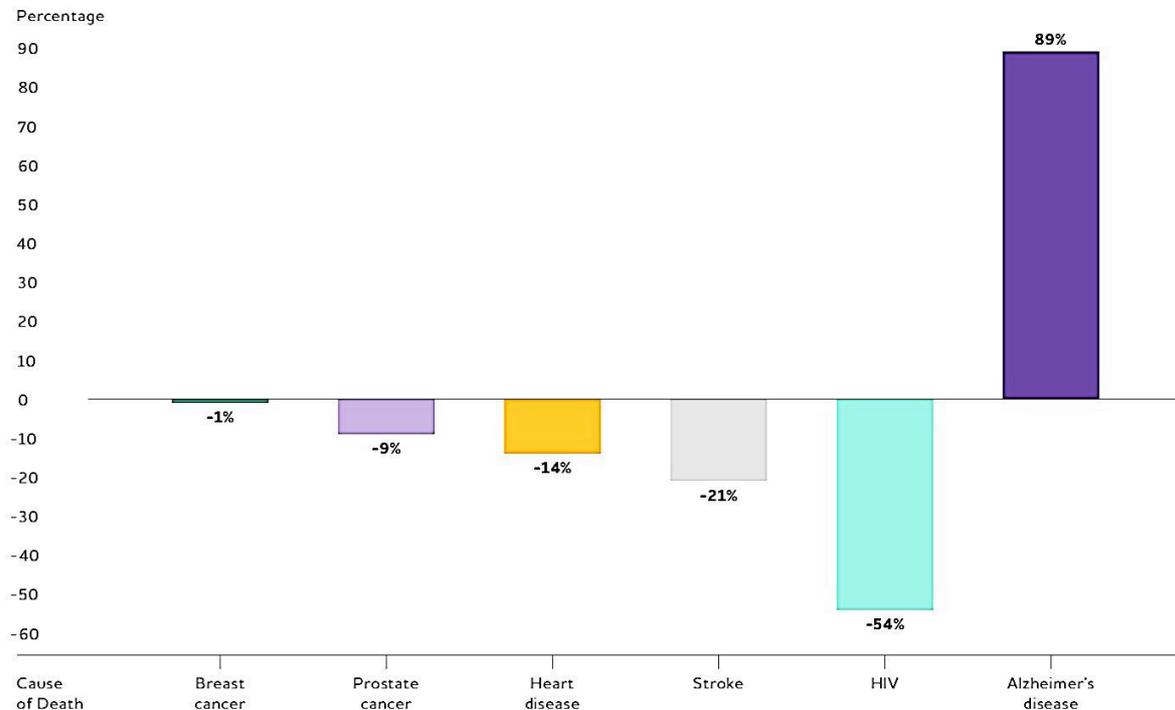
Entsprechend des Alters, in dem die Krankheit ausbricht, können zwei Subtypen unterschieden werden. Wird die AD zwischen dem 60. und 65. Lebensjahr festgestellt, spricht man von der spät einsetzenden AD (LOAD, engl.: late onset AD), von welcher über 90% der Alzheimer-Patienten betroffen sind. Die Ursachen werden zumeist als sporadisch beschrieben. Damit sind komplexe Störungen mit multiplen ursächlichen Genen oder Umweltfaktoren gemeint<sup>17</sup>.

Etwa 1 - 6% der Patienten leiden unter der früh einsetzenden AD (EOAD, engl.: early onset AD), wobei mehr als die Hälfte eine familiäre Anamnese aufzeigen<sup>18</sup>. Diese geht zumeist auf eine autosomal-dominante Vererbung zurück<sup>18,19</sup>.

Darüber hinaus steigt mit zunehmenden Alter das Risiko an AD zu erkranken. Während die Prävalenz bei den unter 65-Jährigen bei 1:1.000 liegt, erkranken bei den über 65-Jährigen eine von zwanzig Personen<sup>20</sup>. Durch das zunehmende Alter der Weltbevölkerung soll laut Prognosen bis zum Jahr 2040 die Anzahl an AD-Neuerkrankungen linear bis zu 80 Millionen pro Jahr ansteigen<sup>21,22</sup>.

Die derzeitigen Therapiemöglichkeiten sind sehr begrenzt und dienen hauptsächlich der Abschwächung der Symptome. Acetylcholinesterase-Hemmer sollen die Acetylcholin-Konzentration im Gehirn der Patienten erhöhen, da dessen Speicher zumeist aufgebraucht sind. Darüber hinaus werden N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-Antagonisten eingesetzt, um eine aberrante neuronale Stimulation zu verhindern<sup>23,24</sup>. Diese Medikamente zeigen jedoch nur wenig positive Effekte, besitzen viele Nebenwirkungen und verzögern den Krankheitsverlauf nicht. Die aktuelle Therapieentwicklung zielt vorwiegend auf den Abbau von Amyloid- $\beta_{1-42}$  ( $A\beta_{1-42}$ ) bzw. hyperphosphoryliertem Tau ab<sup>25</sup>, die pathologischen Hauptmerkmale der AD<sup>44</sup>. Weitere Untersuchungen konzentrieren sich auf die Modulatoren des Alterns, die synaptische Dysfunktion sowie auf die oxidative Schädigung als Therapieoption, wobei ein Behandlungserfolg bis zum heutigen Zeitpunkt ausblieb<sup>24</sup>. Aufgrund der

fehlenden Therapiemöglichkeiten wird die AD somit zu einem immer größer werdenden sozialen sowie gesundheitsökonomischen Problem, insbesondere durch die Überalterung der Gesellschaft.



**Abb. 1.1: Prozentuale Veränderung ausgewählter Todesursachen** übernommen aus <sup>26</sup>. Zwischen 2000 und 2014 nahmen die Todesfälle durch AD um 89% zu, wobei Todesfälle durch Herzerkrankungen, Schlaganfall oder HIV (humanes Immundefizienz-Virus) stark abnahmen. Diese Statistik spiegelt die enorme Zunahme der Todesfälle durch AD in den westlichen Industriestaaten wider<sup>27,28</sup>.

### 1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Die AD ist eine heterogene, neurodegenerative Erkrankung, welche durch einen fortschreitenden, irreversiblen Verlust von Neuronen gekennzeichnet ist<sup>30,31</sup>. Alzheimer-Patienten leiden unter zunehmenden Gedächtnisstörungen, kognitiven Funktionsverlusten (z.B.: Orientierungs- und Sprachstörungen) sowie Persönlichkeitsveränderungen<sup>32</sup>. Die Progressionszeit variiert nach einem schleichenden Beginn der Erkrankung sehr stark von Patient zu Patient. Die durchschnittliche Prognose für die Überlebenszeit nach Ausbruch der ersten Symptome liegt zwischen 8 und 10 Jahren, kann aber je nach Fortschritt der Erkrankung stark variieren<sup>33</sup>.

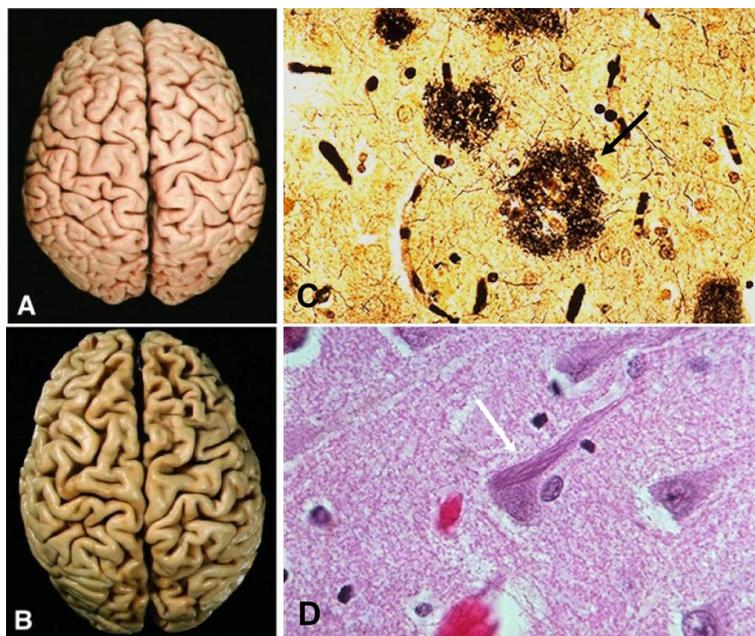
Bei ca. 1 - 3% der an Alzheimer erkrankten Patienten ist die Erkrankung ausschließlich in einer autosomal-dominanten Vererbung einer Genmutation begründet, wobei diese Form als familiäre AD (FAD, engl.: familiar AD) bezeichnet wird. Die FAD wird zumeist vor dem 65. Lebensjahr diagnostiziert und zählt somit zur

EOAD<sup>18,33</sup>. Diese Form der AD kann auf drei verschiedene Genmutationen zurückgeführt werden. Die Mutation im Presenilin-1-Gen auf Chromosom 14 ist für ca. 30 - 70% der FAD-Fälle verantwortlich, wobei die Presenilin-2-Genveränderung auf Chromosom 1 nur bei 5% der FAD-Erkrankten vorkommt. Bei 10 - 15% der Patienten wird die Erkrankung durch eine Mutation im Gen des amyloiden Vorläuferproteins (APP, engl.: amyloid precursor protein) verursacht<sup>34</sup>. Alle drei Mutationen unterstützen die Aggregation von aus APP entstehendem A $\beta$ <sub>1-42</sub><sup>35</sup>, welches unter anderem die Bildung von Tangles (Aggregate aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein) fördert<sup>36</sup> und die Funktion der Mitochondrien sowie die damit verbundene Energieproduktion beeinflusst<sup>37</sup>. Die „Mitochondrial Aging Theory“ gilt als Verbindung zwischen der FAD und der sporadischen AD (SAD, engl.: sporadic AD). Sie besagt, dass bestimmte mitochondriale Grundfunktionen, beispielsweise die mitochondriale Haltbarkeit, vererbt wird. Somit kann die Veränderung der Mitochondrien mit zunehmendem Alter beeinflusst werden<sup>38</sup>. Diese altersbedingten mitochondrialen Veränderungen treiben die Mitochondrienfunktion über einen bestimmten funktionellen Schwellenwert hinaus, wodurch anschließend eine AD-charakteristische Histopathologie einschließlich der Spaltung von APP zu A $\beta$ <sub>1-42</sub> induziert wird<sup>39</sup>. Des Weiteren führt die mitochondriale Dysfunktion zu oxidativem Stress, welcher den Untergang von Neuronen fördert, ein Hauptmerkmal der AD<sup>39</sup>.

Etwa 97 - 99% der AD treten hingegen sporadisch auf, das heißt mit undefinierter Ätiologie. Die SAD setzt zumeist nach dem 65. Lebensjahr ein und zählt daher zur LOAD<sup>34</sup>. Zahlreiche Studien postulieren verschiedene umwelt- und genetisch bedingte Ursachen für die Entwicklung dieser Form. Dazu zählen das zunehmende Alter, Bluthochdruck, Arteriosklerose sowie oxidativer Stress<sup>40</sup>. Der genetische Hauptrisikofaktor für die SAD ist der unterschiedliche Genotyp des Lipid-Transporters ApoE mit seinen drei verschiedenen Isoformen E2, E3 und E4 auf Chromosom 19. ApoE3 liegt bei über 60% der Bevölkerung homozygot vor und wird als „normale“ Genvariante angesehen. ApoE2 verzögert den Ausbruch der FAD<sup>42</sup>. Die Isoform ApoE4 hingegen gilt als genetischer Hauptrisikofaktor an SAD zu erkranken<sup>41</sup>. Wie diese Isoform zu einem erhöhten AD-Risiko führt, ist bis heute jedoch nicht genau definiert.

### 1.1.5 Neuropathologie der Alzheimer Erkrankung

Das Hauptmerkmal der AD ist das fortschreitende Absterben von Neuronen, welches hauptsächlich innerhalb des Cortex beobachtet werden kann und mit einer zunehmenden zerebralen Atrophie sowie einer Schrumpfung der Hirnrinde einhergeht<sup>14</sup> (Abb. 1.2 A, B). Aufgrund der Atrophie kommt es zu einer Erweiterung der Sulci und der Ventrikel, insbesondere im Temporallappen<sup>43</sup>. Die AD ist darüber hinaus durch eine extrazelluläre A $\beta$ -Ablagerung (A $\beta$ -Plaques) sowie durch intrazelluläre neurofibrilläre Bündel, bestehend aus hyperphosphorylierten Tau-Aggregaten (Tangles), neuropathologisch gekennzeichnet<sup>44</sup> (Abb. 1.2 C, D).



**Abb. 1.2: Neuropathologie eines AD-Gehirns** verändert nach <sup>45, 177</sup>. In der Abbildung ist deutlich eine Atrophie des AD-Gehirns (B) im Vergleich zum gesunden Gehirn (A) erkennbar. Des Weiteren ist die AD neuropathologisch durch A $\beta$ -Plaques (C) sowie Tangles aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein (D) mikroskopisch gekennzeichnet.

#### 1.1.5.1 A $\beta$ -Plaques

A $\beta$ -Plaques (Abb. 1.2 C) entstehen insbesondere durch die Aggregation von A $\beta$ <sub>1-42</sub> und stellen ein pathologisches Hauptcharakteristikum der AD dar. Die Peptide entstehen durch die enzymatische Prozessierung des APP durch die  $\beta$ - bzw.  $\gamma$ -Sekretase<sup>46</sup>. APP, welches hauptsächlich in Neuronen exprimiert wird, gehört zur Familie der glykosylierten-Typ-1-integralen Membranproteine<sup>47,48</sup>. Die physiologische Funktion dieses Proteins ist die essentielle Unterstützung der Reizweiterleitung sowie die Informationsverarbeitung. Des Weiteren spielt es eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Signalweiterleitung<sup>49</sup>. Untersuchungen zeigten, dass diverse Mutationen innerhalb des APP-Gens oder in den prozessierenden Sekretasen vorliegen können<sup>50</sup>. Diese führen durch eine Erhöhung der Selbstaggregation des A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Peptids zu unlöslichen A $\beta$ -Fibrillen, welche anschließend die Entstehung von

A $\beta$ -Plaques fördern<sup>277</sup>. Die „Amyloid-Hypothese“ geht davon aus, dass die Produktion und Aggregation von A $\beta$ -Peptiden mit anschließender Plaque-Bildung die Ursache für das Absterben der Neurone während der AD-Progression ist<sup>25</sup>.

Bei den A $\beta$ -Plaques können zwei verschiedene Typen unterschieden werden: neuritische und diffuse Plaques. Neuritische A $\beta$ -Plaques bestehen aus einem Kern von unlöslichen aggregierten A $\beta$ -Fibrillen, welcher in seiner unmittelbaren Nähe mit nicht fibrillären A $\beta$ -Oligomeren assoziiert ist. Des Weiteren ist eine lokale Immunreaktion für neuritische Plaques charakteristisch, welche bei diffusen Plaques nicht zu beobachten ist. Diffuse Plaques hingegen bestehen vorwiegend aus nicht-fibrillären A $\beta$ -Oligomeren, welche darüber hinaus im gesunden Gehirn vorkommen<sup>51</sup>. Aufgrund der lokalen Immunreaktion von neuritischen Plaques sind diese zumeist von dystrophen Dendriten und Axonen, proliferierenden Astrozyten sowie aktivierter Mikroglia umgeben<sup>52</sup>.

### 1.1.5.2 Neurofibrilläre Tangles

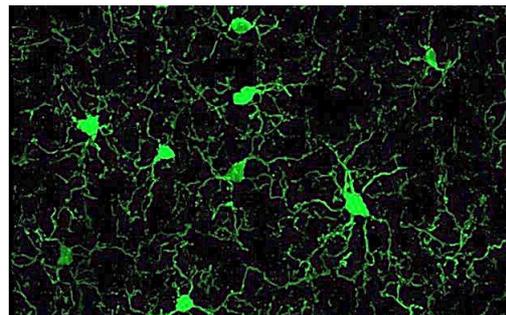
Ein weiteres neuropathologisches Merkmal der AD sind neurofibrilläre Tangles (NFTs)<sup>53</sup>, nicht-membran gebundene Aggregate aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein<sup>54,55</sup> (Abb. 1.2 D). Das Tau-Protein wird durch das MAPT-Gen (engl.: microtubule associated protein tau) auf Chromosom 17 codiert. Durch alternatives Splicing können sechs verschiedene Tau-Isoformen entstehen, welche sich in der Anzahl bestimmter Domänen am N- und C-Terminus unterscheiden. Allen Isoformen gemein ist eine C-terminale Mikrotubuli-Bindungsdomäne<sup>56</sup>. Im gesunden Organismus interagiert das Tau-Protein mit Tubulin und fördert dessen Zusammenlagerung zur Stabilisierung der Mikrotubuli-Struktur. Dafür ist eine Phosphorylierung von Serin- und Theroninresten innerhalb der Mikrotubuli-Bindungsdomäne des Tau-Proteins notwendig<sup>55,57,58</sup>. Im Gehirn von AD-Patienten führt eine unspezifische Hyperphosphorylierung von Serin- und Theroninresten zu einer verminderten Affinität zu Mikrotubuli und induziert gleichzeitig die Selbstaggregation des Tau-Proteins<sup>59,60</sup>. NFTs beinhaltende Neuronen sterben demzufolge aufgrund ihrer gestörten Zellfunktion (Störung des intrazellulären Vesikeltransports, Störung der neuronalen Polarität etc.)<sup>61,62</sup>.

Während A $\beta$ -Plaques und NFTs bekannte Charakteristika für die AD-Pathogenese darstellen, ist der genaue Mechanismus, welcher zum Absterben der Neurone und folglich zur Neurodegeneration führt, unklar. Seit einigen Jahren rücken Mikroglia, die

Immunzellen des Gehirns, immer stärker in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. Es wird vermutet, dass diese Zellen ihren homöostatischen Phänotyp aufgrund der chronischen zerebralen Inflammation ablegen und ein krankheitsspezifisches Genmuster exprimieren, welches die Progression der AD unterstützen könnte<sup>1,2,63,64</sup>.

## 1.2 Mikroglia – zerebrale Immuneffektorzellen

Mikroglia (Abb. 1.3) sind residente Zellen der angeborenen Immunantwort des zentralen Nervensystems (ZNS)<sup>65</sup>. Neben den Astrozyten und den Oligodendrozyten werden Mikroglia zu den Gliazellen gezählt und machen 10 - 15% der Zellpopulation im ZNS aus<sup>67</sup>. Als aktive Sensoren für Störungen bzw. Verletzungen innerhalb ihrer Mikroumgebung verfügen sie über ein vielfältiges Spektrum zur Wiederherstellung einer gesunden Gewebemöostase<sup>68,69</sup>.



**Abb. 1.3: Mikroglia** übernommen aus 66. Dargestellt sind Mikroglia des humanen Gehirns unter Anfärbung des spezifischen mikroglialen Markers iba-1 (ionisierter Kalzium-Binde-Adapter 1; grün).

Erstmals identifiziert wurden Mikroglia-Zellen gleichzeitig von den Wissenschaftlern F. Robertson und F. Nissl. Sie beschrieben die Immuneffektorzellen als „stäbchenförmige, reaktive Neuroglia“<sup>70,71</sup>. Die erstmalige Bezeichnung „Mikroglia“ verwendete der Neuroanatom Pio del Rio-Hortega, der eine umfangreiche und detaillierte Untersuchung dieser Zellen durchführte. In seinem 1932 veröffentlichten Buchkapitel „Microglia“ in der Publikation „Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System“ beschrieb Rio-Hortega erstmals seine Erkenntnisse über die mikrogliale Morphologie und Funktion, welche bis heute die Grundlage vieler Untersuchungen darstellen<sup>72,73</sup>.

### 1.2.1 Ursprung und Entwicklung

Der Ursprung sowie die Entwicklung von Mikroglia-Zellen war über Jahrzehnte Teil einer umfangreichen Diskussion. Zum heutigen Zeitpunkt weiß man, dass Mikroglia-Zellen, im Gegensatz zu den aus dem Neuroektoderm hervorgehenden Astrozyten und Oligodendrozyten, sich aus Vorläuferzellen mesodermalen Ursprungs entwickeln und in das ZNS während der frühen embryonalen Entwicklung einwandern<sup>68,74</sup>. Dort

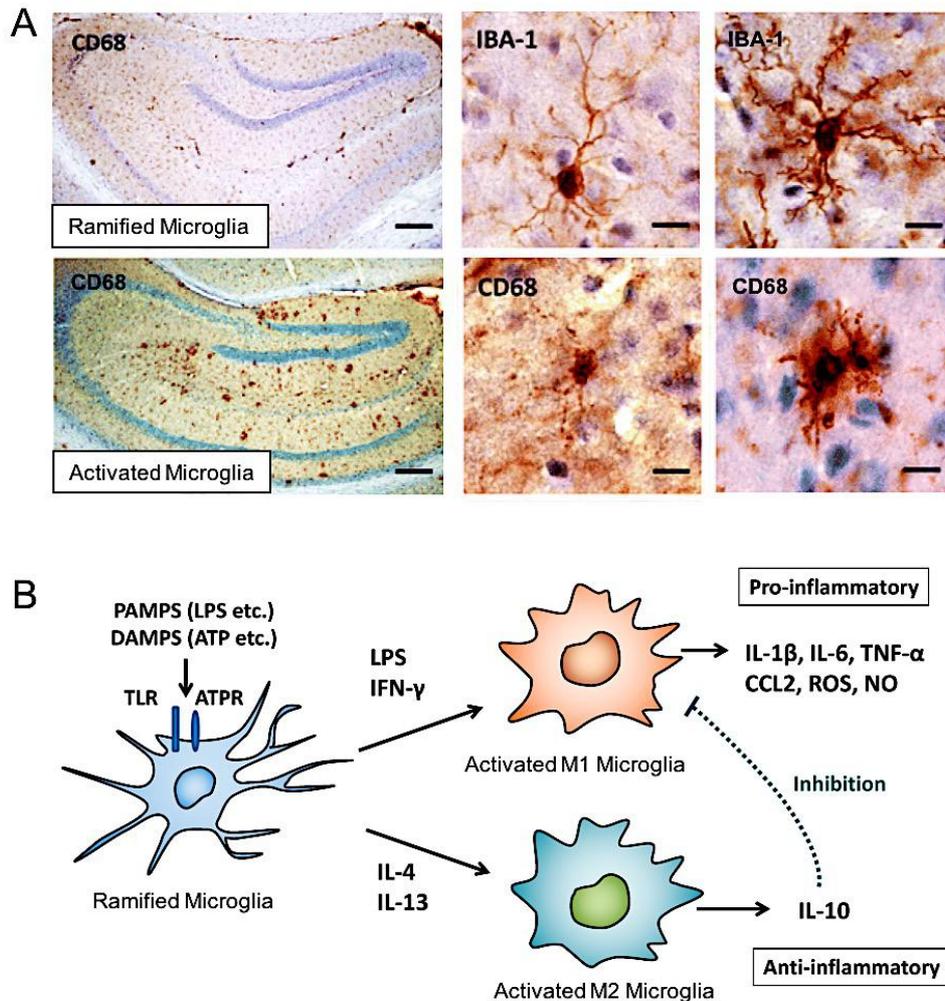
kommt es anschließend zur Differenzierung der Vorläuferzellen zu Mikroglia-Zellen<sup>75,76,77</sup>. Die zunächst unreifen, amöboiden Mikroglia phagozytieren vorwiegend degenerierende Zellen, die durch ontogenetischen Zelltod absterben. Des Weiteren sind unreife Mikroglia zur Absonderung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen befähigt, wodurch sie das Neuritenwachstum, die Gliose sowie die Angiogenese regulieren und somit die Entwicklung des Gehirns unterstützen<sup>78,79</sup>. Anschließend transformieren die zunächst amöboiden Zellen in ruhende Mikroglia<sup>76</sup>, welche im nächsten Kapitel näher beschrieben werden. Darüber hinaus kann es während der frühen postnatalen Phase oder während einer Immunreaktion über den Blutkreislauf zur Einwanderung von Monozyten kommen. Diese entwickeln sich im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen und können sich ebenfalls zu Mikroglia-ähnlichen Zellen ausdifferenzieren<sup>80,81</sup>.

Die Aufrechterhaltung der zerebralen Mikroglipopulation erfolgt bevorzugt durch Selbsterneuerung (engl.: „Self-Renewal“), kann jedoch auch durch die Einwanderung zirkulierender Blutmonozyten aus dem Knochenmark erfolgen<sup>62,67,84</sup>. Im gesunden adulten Gehirn ist diese Austauschrate an Mikroglia-Zellen jedoch so gering, dass die Erneuerung durch eingewanderte Monozyten vernachlässigt werden kann<sup>82,83</sup>.

### 1.2.2 Die Mikroglia-Aktivierung

Die Aktivierung einer Mikroglia-Zelle ist ein hoch komplexer Prozess und von überaus großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung einer gesunden Gewebemöostase des Gehirns<sup>74,85</sup>. Während einer Neuroinflammation kommt es zu einer Entwicklung von einer ruhenden zu einer aktivierten Mikroglia-Zelle<sup>74,85</sup>.

Ruhende oder ramifizierte Mikroglia sind charakterisiert durch einen kleinen Zellkörper sowie die Bildung zahlreicher Zellausläufer von bis zu 100  $\mu\text{m}$ , welche vom kleinen Soma abzweigen<sup>86,87</sup> (Abb. 1.4 A). Diese Zellausläufer sind in der Lage einen direkten Kontakt zu umliegenden Astrozyten, Neuronen oder Blutgefäßen herzustellen<sup>83</sup>. Des Weiteren besitzt jede Mikroglia-Zelle ihr eigenes Territorium von ca. 15 - 30  $\mu\text{m}^2$ , welches sie mit einer Geschwindigkeit von bis zu 1,5  $\mu\text{m}/\text{min}$  und mit Hilfe von Ausstülpungen der Zellausläufer abtasten<sup>80,83</sup>. Untersuchungen demonstrierten, dass Mikroglia *in vitro* keine typische Morphologie des ramifizierenden Zelltypus aufzeigen. Mikrogliale Zelllinien zeigen heterogene Formen, zumeist spindel- oder stäbchenförmige sowie amöboide Formen mit kurzen, dicken Fortsätzen<sup>74,85</sup>.



**Abb. 1.4: Morphologie und Aktivierung von Mikroglia-Zellen. (A) Morphologie ramifizierter und aktivierter Mikroglia-Zellen** <sup>verändert nach 95</sup>. Ruhende iba-1-positive Mikroglia sind durch einen kleinen Zellkörper und verzweigte Zellfortsätze, mit welchen sie permanent ihre Umgebung abtasten, gekennzeichnet. Aktivierte CD68(engl.: cluster of differentiation 68)-positive Mikroglia ziehen ihre Zellfortsätze ein und vergrößern ihren Zellkörper. Sie sind zur Proliferation, Migration sowie zur Phagozytose fähig. **(B) Modell zur Beschreibung vorteil- bzw. unvorteilhafter Mikroglia- Aktivierung** <sup>verändert nach 96</sup>. Bei der Mikroglia-Aktivierung findet eine Transformation von einer ramifizierten zu einer aktivierten Mikroglia-Zelle statt. Ramifizierte Mikroglia werden durch spezifische Signale (DAMPS, engl.: damaged-associated molecular pattern; PAMPS, engl.: pathogen-associated molecular pattern) über TLR (Toll-like-Rezeptoren) oder ATPR (Adenosin-Triphosphat-Rezeptoren) stimuliert. In Gegenwart von beispielsweise LPS (Lipopolysacchariden) polarisieren Mikroglia-Zellen zum M1-Typ und produzieren verschiedene pro-inflammatorische Zytokine bzw. Mediatoren. In Gegenwart von IL-4 (Interleukin-4) oder IL-13 hingegen polarisieren Mikroglia zum M2-Typ, welcher durch die Sekretion von IL-10 vorwiegend der Entzündungshemmung dient.

Abhängig von verschiedenen Faktoren und vom umliegenden Milieu vollziehen Mikroglia eine „klassische“ oder „alternative“ Aktivierung<sup>88,89</sup> (Abb. 1.4 B). Bei dieser Einteilung handelt es sich um ein theoretisches Modell zur vereinfachten Darstellung der Mikroglia-Aktivierung, welches ausschließlich *in vitro* zu beobachten ist<sup>94</sup>. Die klassische Aktivierung wird mit der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, beispielsweise dem Tumor-Nekrosis-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ),

verschiedenen Lipopolysacchariden (LPS) oder reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), assoziiert<sup>90,91</sup>. Mikroglia in diesem Aktivierungszustand werden als „M1-Mikroglia“ bezeichnet. Diese reagieren auf Verletzungen und Infektionen, wobei sie in erster Linie auf das Immunsystem einwirken und eindringende Krankheitserreger phagozytieren. Darüber hinaus sind „M1-Mikroglia“ ebenfalls dazu in der Lage Neuronen durch die Freisetzung pro-inflammatorischer Faktoren sowie neurotoxischer Mediatoren zu schädigen. Aufgrund dieser Tatsache können sie eine aussichtslose Spirale zwischen absterbenden Neuronen und akuten Entzündungsreaktionen auslösen<sup>90,91,92</sup>. Im Anschluss an die klassische Aktivierung erfolgt zumeist eine schnelle entzündungshemmende Phase, die zur Wundheilung und zur Wiederherstellung der Gewebemöostase dient. Diese wird durch die alternative Aktivierung der sogenannten „M2-Mikroglia“ bewerkstelligt. Die alternative Aktivierung ist auf den Aktivierungszustand beschränkt, der durch die Zytokine IL-4 oder IL-13 ausgelöst wird und eng mit den M2-Genen assoziiert ist, welche die Entzündungshemmung, die Gewebereparatur sowie die Rekonstruktion der extrazellulären Matrix fördern<sup>89,91</sup>. Aufgrund ihrer inhibierenden Wirkung auf entzündungsfördernde Immunantworten und die Förderung der Expression von Reparaturgenen stellen M2-Mikroglia einen überaus wichtigen Typus der Immuneffektorzellen dar<sup>93</sup>. Die Morphologie aktivierter Mikroglia-Zellen ist durch ihren vergrößerten Zellkörper mit reduzierten zellulären Ausläufern charakterisiert (Abb. 1.4 A). Zusätzlich erfolgt die Expression von weiteren Zelloberflächenrezeptoren, welche der Sezernierung verschiedener Moleküle, der Migration oder der Phagozytose dienen. Darüber hinaus sind aktivierte Mikroglia-Zellen zur Proliferation befähigt<sup>68,86</sup>.

### 1.2.3 Funktionen von Mikroglia-Zellen

Mikroglia stellen als residente Immunzellen die erste Verteidigungslinie gegen externe Bedrohungen dar und dienen der Erkennung und Beseitigung von apoptotischen Zellen bzw. Zelltrümmern<sup>97,98</sup>. In Abhängigkeit von den vorliegenden Bedingungen und den Signalen, welche sie aus ihrer unmittelbaren Umgebung erhalten, exprimieren Mikroglia verschiedene konstitutive Marker bzw. Rezeptoren (z.B.: iba-1, MHC-I (engl.: major histocompatibility complex 1), MHC-II (engl.: major histocompatibility complex 2), CD68) auf ihrer Oberfläche. Diese sind an der Migration, der Antigenpräsentation, der Phagozytose und anderen funktionellen Aufgaben beteiligt<sup>99,100</sup>.

Die Hauptfunktion ramifizierter Mikroglia unter normalen physiologischen Bedingungen besteht in der Überwachung ihrer Umgebung mit Hilfe ihrer ausgeprägten Prozesse<sup>101</sup>. Des Weiteren sind sie dazu in der Lage in Interaktion mit Blutgefäßen, Neuronen oder anderen Glia-Zellen zu treten, um beispielsweise eine neuronale Aktivität zu induzieren<sup>99, 100</sup>.

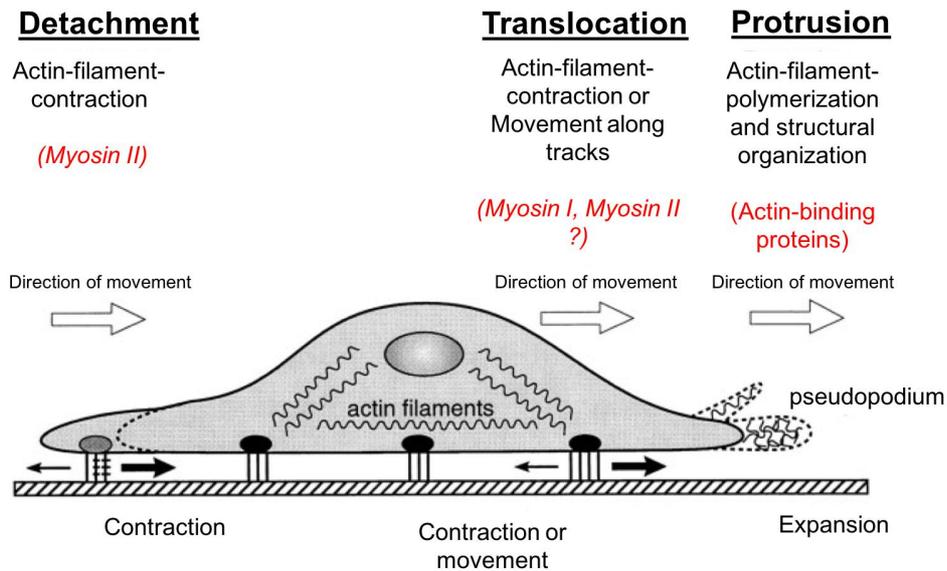
Aktivierte Mikroglia hingegen dienen der Erkennung und Beseitigung von Pathogenen oder Zelltrümmern sowie der Kontrolle des adaptiven Immunsystems, weshalb sie zur Migration, Phagozytose und Antigenpräsentation fähig sind<sup>99,100</sup>.

### 1.2.3.1 Zellmotilität

Die Zellmotilität beschreibt die Fähigkeit einer Zelle ihre Morphologie zu verändern oder aktiv an einen anderen Ort zu migrieren<sup>102</sup>. Die mikrogliale Motilität ist von enormer Bedeutung für die Erkennung pathologischer Zustände<sup>104,108</sup>.

Ramifizierte Mikroglia sind nicht zur aktiven Migration fähig, jedoch können sie ihre Zellfortsätze bewegen und deren Länge variieren. Darüber entsteht eine Zellmotilität, über welche ramifizierte Mikroglia-Zellen dazu in der Lage sind, ihre unmittelbare Umgebung nach externen Pathogenen oder apoptotischen Neuronen abzutasten<sup>83,103</sup>.

Im Gegensatz dazu sind aktivierte Mikroglia aufgrund ihrer veränderten Morphologie zur amöboiden Fortbewegung (Abb. 1.5) fähig<sup>103,104,105,106</sup>. Diese ist zum einen bei der Gehirnentwicklung von entscheidender Bedeutung. Nach der Einwanderung in das ZNS können Mikroglia die neurale Proliferation, Migration und Differenzierung sowie die Bildung neuronaler Netzwerke beeinflussen und somit zur Gestaltung des ZNS beitragen<sup>107</sup>. Des Weiteren sind Mikroglia im adulten Gehirn dazu in der Lage durch das Hirnparenchym zu einer potentiellen Schadenstelle zu migrieren. Dabei wird die Migration durch verschiedene pathologische Signalmoleküle (z.B.: ATP, Cannabinoide, Chemokine, Bradykinin), welche von Neuronen oder anderen Glia-Zellen stammen, induziert<sup>104,105</sup>. Viele Chemokine werden löslich freigesetzt um einen Gradienten für die mikrogliale Migration zu erzeugen<sup>103,104,105,106</sup>. Diese Chemokine werden durch spezifische Chemokin-Rezeptoren auf der Oberfläche von Mikroglia-Zellen erkannt, welche sie nach Identifizierung eines pathologischen Stimulus exprimieren<sup>108</sup>. An der Schadenstelle kommt es dann zur Identifikation des Pathogens bzw. von Zelltrümmern, zur Phagozytose und eventuell zur Antigenpräsentation<sup>99,100</sup>.

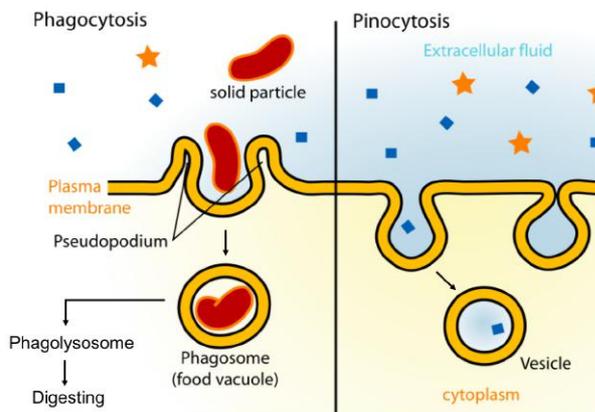


**Abb. 1.5: Die amöboide Migration** verändert nach <sup>109</sup>. Ein Migrations-spezifischer externer Reiz führt zum Abbau von Aktinfilamenten am vorderen Pol der Zelle. Gleichzeitig wird die Neuaggregation von Aktinproteinen verhindert und es kommt zur Entstehung eines Pseudopodiums (= dünne, variable Zellfortsätze durch die Ausstülpung des Zytoplasmas). Durch diese werden hydrostatische Kräfte frei, durch welche die Aktinfilamente ins Pseudopodium gelangen und dort aggregieren. Am gegenüberliegenden Pol der Zelle kommt es zur Kontraktion von Myosin und Aktin unter ATP-Verbrauch, wodurch die Zelle in Migrationsrichtung geschoben wird. (rot: an der Migration beteiligte Proteine).

### 1.2.3.2 Mikrogliale Phagozytose

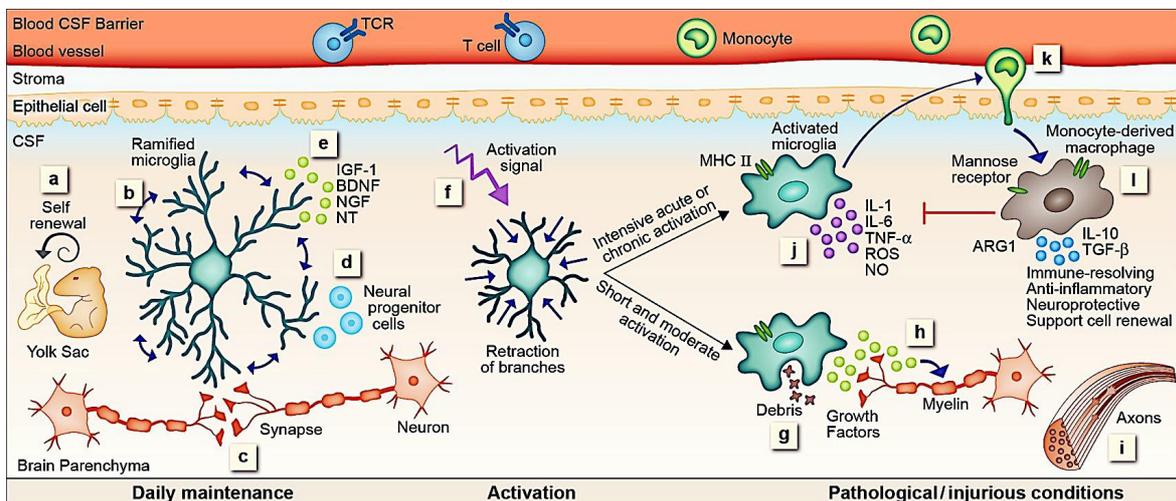
Mikroglia sind professionelle, phagozytierende Zellen des ZNS. Sie sind zur Aufnahme von Mikroorganismen, extrazellulären Partikeln sowie apoptotischen Zellen oder Zelltrümmern in der Lage. Während der Entwicklung des Gehirns dient die Phagozytose (Abb. 1.6), eine Form der Endozytose, der Beseitigung apoptotischer Zellen, welche ein „Eat-me“-Signal produzieren<sup>98,110</sup>. Darüber hinaus sind Mikroglia an der Entfernung nutzloser Synapsen beteiligt<sup>98,111</sup>. Im adulten Gehirn phagozytieren aktivierte Mikroglia hauptsächlich externe Pathogene, geschädigte Zellen bzw. Zelltrümmer oder fehlgefaltete Proteine (z.B.: A $\beta$ -Aggregate). Dafür exprimieren sie verschiedene spezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Pathogene werden vorwiegend durch TLR, Komplement- oder Fresszell-Rezeptoren erkannt<sup>112</sup>. Des Weiteren wird die Phagozytose von Pathogenen mit einer Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren (z.B.: TNF- $\alpha$ , Stickstoffmonoxid-Synthase-2) verbunden, welche eine Entzündungsreaktion hervorrufen<sup>113,114</sup>. Für die Identifizierung apoptotischer Neuronen hingegen werden verschiedene Rezeptorsysteme, einschließlich der asialglykoprotein-ähnlichen, Vitronectin- oder Phosphatidylserin-Rezeptoren benötigt<sup>115</sup>.

Neben der rezeptorvermittelten Phagozytose sind Mikroglia ebenfalls dazu in der Lage, Flüssigkeitstropfen mit darin gelösten Substanzen (z.B.: Proteine aus dem extrazellulären Raum) aufzunehmen. Dieser Vorgang wird als Pinozytose (Abb. 1.6) bezeichnet<sup>112</sup>, über welchen Mikroglia z.B. lösliches Aβ aufnehmen können<sup>117</sup>.



**Abb. 1.6: Arten und Ablauf der Endozytose** verändert nach 118. Die Aufnahme eines Pathogens/Zelltrümmers beginnt mit der Umschließung des Partikels. Anschließend entsteht durch die Ausstülpung der Zellmembran und dem Einschleusen des Partikels ein Phagosom. Nach der Verschmelzung mit einem Lysosom entsteht ein Phagolysosom, in welchem die aufgenommenen Partikel unter der Zuhilfenahme verschiedener Enzyme abgebaut werden. Dabei entstehen ROS sowie NADPH-Oxidasen, die zwar den Abbau von Fremdkörpern unterstützen, jedoch auch das umliegende Gewebe schädigen. Daher ist eine genaue Regulation der Phagozytose von großer Bedeutung<sup>119</sup>. Bei der Pinozytose werden die aufzunehmenden Flüssigkeitstropfen von Membranausläufern umschlossen und in Form von Vesikeln in das Zytosol transportiert<sup>112</sup>.

In der Abbildung 1.7 sind zusammenfassend die Entwicklung, die Aktivierung sowie die Funktionen von Mikroglia-Zellen schematisch dargestellt.



**Abb. 1.7: Entwicklung, Aktivierung und Funktionen von Mikroglia-Zellen** verändert nach 64. Mikroglia entwickeln sich aus Vorläuferzellen mesodermalen Ursprungs (a), welche in das ZNS während der embryonalen Entwicklung einwandern und sich zu ramifizierter Mikroglia ausdifferenzieren (b). Diese tasten mit Hilfe ihrer zellulären Prozesse permanent ihre unmittelbare Umgebung ab und unterstützen die Aufrechterhaltung einer gesunden Gewebemöiostase (Aufrechterhaltung von Synapsen (c)), die Neurogenese (d) und sekretorischen Wachstumsfaktoren (e). Durch bestimmte externe Signale (Pathogen, apoptotische Zelle) werden Mikroglia aktiviert (f). Aufgrund des Reizes entwickeln Mikroglia einen neuroprotektiven Effekt (Entfernung von Pathogenen/Zelltrümmern (g), Unterstützung der Remyelinisierung (h) oder der Regeneration (i)) oder einen neurotoxischen Phänotyp (Produktion von neurotoxischen Substanzen (j)). Eine Rekrutierung von Mikroglia-ähnlichen Monozyten (k), deren genaue Rolle noch nicht klar definiert ist (l), unterstützen vermutlich die Neuroprotektion und Zellerneuerung.

### 1.2.4 Die Rolle der Mikroglia in der Alzheimer Erkrankung

Zahlreiche Studien zeigen, dass Mikroglia an der Pathogenese der AD und weiterer neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt sind. Die spezifische Rolle dieser Zellen ist bis zum aktuellen Zeitpunkt ungeklärt. Einerseits wird vermutet, dass Mikroglia-Zellen eine potentiell neuroprotektive Rolle übernehmen<sup>120,121</sup>. *In vivo* Studien konnten zeigen, dass neu gebildete A $\beta$ -Plaques, welche eine Aktivierung von Mikroglia induzieren<sup>97,122</sup>, innerhalb von wenigen Tagen von aktivierten Mikroglia-Zellen umgeben sind<sup>123</sup>. Mit dem Fortschreiten der AD erhöht sich die Anzahl A $\beta$ -Plaque-assoziiierter Mikroglia konstant bis zu einem entsprechenden Maximum der Plaquegröße<sup>124</sup>. Weitere Untersuchungen demonstrieren, dass Mikroglia das Wachstum von A $\beta$ -Plaques blockieren bzw. teilweise sogar reduzieren. Zusätzlich sind diese Immunzellen dazu in der Lage A $\beta$ -Aggregate zu phagozytieren<sup>125,126,127</sup>. Dies wird durch die mikrogliale Sezernierung A $\beta$ -abbauender Enzyme, wie Neprilysin oder dem Lysin-degradierenden Enzym, bestätigt<sup>123,128</sup>.

Andererseits sind durch Mikroglia induzierte inflammatorische Effekte bekannt, die neurotoxisch wirken. Mikroglia reagieren beispielsweise auf eine A $\beta$ -Stimulation mit einer Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine (z.B.: IL-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$ , IL-6), welche auf Neuronen schädlich wirkende Reaktionen hervorrufen<sup>122</sup>. Durch eine dauerhafte Aktivierung von Mikroglia-Zellen aufgrund von A $\beta$ -Ablagerungen wird somit die chronische Entzündung des Gehirns unterstützt. Darüber hinaus ist bekannt, dass durch die mikrogliale Phagozytose von A $\beta$ -Plaques vermehrt Substanzen freigesetzt werden, die zu oxidativen Schädigungen führen<sup>129,130</sup>.

Eine aktuelle Hypothese über die spezifische Rolle von Mikroglia-Zellen innerhalb der AD-Pathogenese kommt zu dem Schluss, dass Mikroglia ihren Phänotyp während des Krankheitsverlaufes verändern<sup>131,132</sup>. Im gesunden Organismus besitzen Mikroglia eine einzigartige molekulare und funktionelle Gensignatur, welche sie während des AD-Verlaufes verlieren<sup>133</sup>. Eine krankheits-assoziierte Gensignatur konnte bereits identifiziert werden<sup>1,2,64,134</sup>. Interessanterweise ist dabei eine erhöhte Expression des AD-Haupttrisikofaktors ApoE zu beobachten, während homöostatische Gene herunterreguliert sind<sup>2</sup>. Daher könnte ApoE einen kritischen Faktor in der Mikroglia-Aktivierung darstellen und den transkriptionellen Phänotyp von dysregulierten Mikroglia-Zellen beeinflussen.

### 1.3 Der AD-Hauptrisikofaktor ApoE

Das in den frühen 1970er Jahren entdeckte ApoE ist ein multifunktionales Glykoprotein mit einer molekularen Masse von 34 kDa<sup>135</sup>. Während Mäuse nur über eine Genvariante verfügen, existieren im menschlichen Organismus hauptsächlich drei verschiedene polymorphe Allele (ApoE2, ApoE3 und ApoE4), welche unterschiedliche Effekte auf die Lipid- und neuronale Homöostase aufzeigen<sup>136,137</sup>. Die ApoE-Hauptproduzenten neben Astrozyten sind Hepatozyten, wobei die größten Mengen dieses Proteins ins Plasma, in die Lymphe sowie in die Zerebrospinalflüssigkeit sekretiert werden<sup>136</sup>. Analysen unter Verwendung der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion und der In-situ-Hybridisierung konnten zeigen, dass darüber hinaus auch Mikroglia-Zellen ApoE-mRNA exprimieren<sup>138,139</sup>, jedoch können nur sehr geringe ApoE-Mengen in Mikroglia nachgewiesen werden<sup>140</sup>. Des Weiteren wird vermutet, dass das ApoE in Mikroglia-Zellen hauptsächlich von Astrozyten stammt<sup>142</sup> und über die spezifischen LDLR (Rezeptoren für Lipoproteine niedriger Dichte) aufgenommen wird<sup>143,144</sup>. ApoE spielt eine zentrale Rolle im Lipidmetabolismus sowie in der Neurobiologie<sup>136</sup>. Durch eine Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren der LDL-Familie ist es darüber hinaus am Transport von Cholesterol beteiligt<sup>146</sup>. Da ApoE seit vielen Jahren als Risikofaktor verschiedener Krankheiten bekannt ist, rückt es seit den letzten Jahren verstärkt in den Mittelpunkt zahlreicher Untersuchungen, welche die Rolle von ApoE insbesondere in der Pathogenese der AD untersuchen<sup>147,148</sup>.

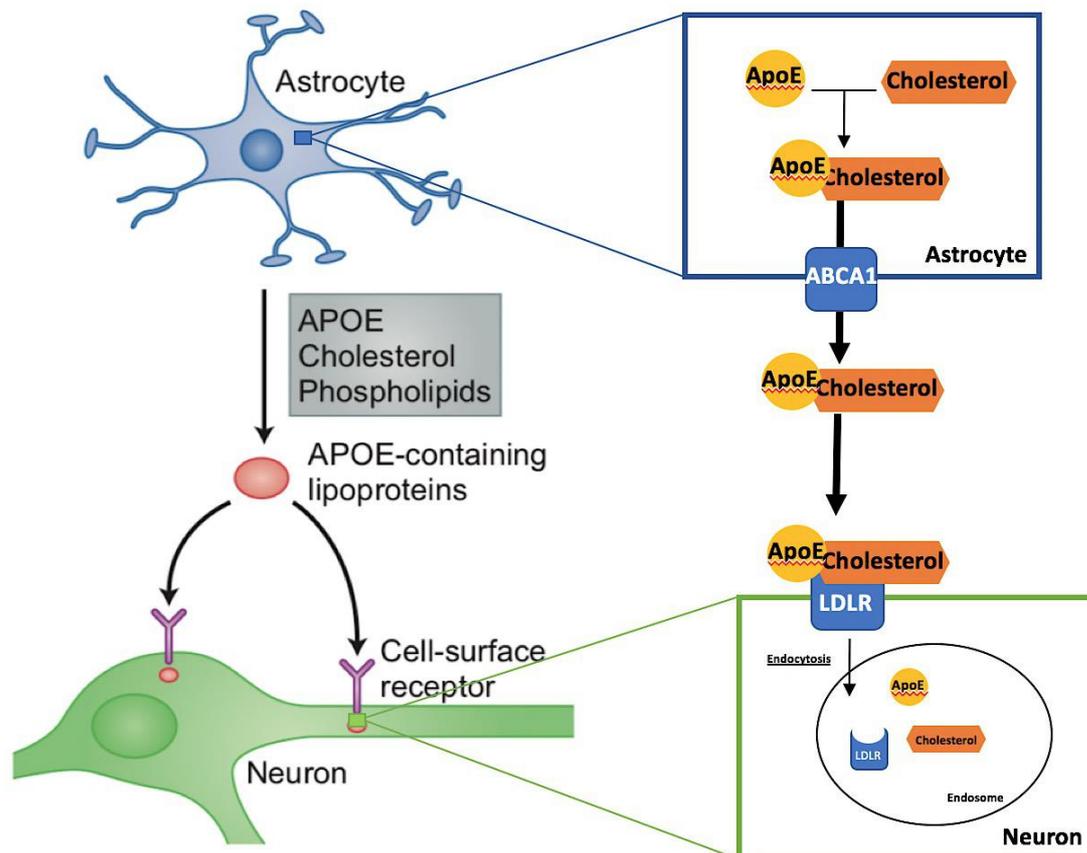
#### 1.3.1 Physiologische Funktionen des ApoE

Die Hauptfunktion von ApoE ist mit Hilfe weiterer Apolipoproteine und Faktoren der Transport von Lipiden oder Cholesterol zwischen verschiedenen Zellen und Geweben des humanen Organismus. Vor allem im Gehirn wird eine große Menge an ApoE synthetisiert und dient dort als Haupttransportmittel im Liquor<sup>159</sup> (Abb. 1.8). Dabei unterstützen die Apolipoproteine als „Emulgatoren“ (= Lipid umschließende Proteine) die Bildung von Lipoproteinen, makromolekulare Strukturen zum Transport von Lipiden und extrazellulären Fluiden. Darüber hinaus dienen sie als Liganden oder Enzymregulatoren<sup>146,149,150,151</sup>.

Des Weiteren ist ApoE beteiligt an der homöostatischen Kontrolle der Plasma- und Gewebelipidkonzentration<sup>151,152</sup>. Dazu bindet ApoE mit hoher Affinität, welche sich je nach Isoform unterscheidet, an Lipoproteinrezeptoren an der Zelloberfläche. Anschließend vermittelt es eine Interaktion zwischen ApoE-haltigen Lipoproteinen

und Lipoproteinkomplexen mit LDLR, LDLR-verwandten Proteinen, VLDLR (Rezeptoren für Lipoproteine sehr niedriger Dichte), dem ApoE-Rezeptor-2 oder dem Glykoprotein-Rezeptor 330<sup>151,152</sup>. Über die Wechselwirkung mit diesen Rezeptoren und Heparansulfat-Proteoglykan fördert ApoE unter anderem den Abbau von Plasma-Proteinen, insbesondere von VLDL (Lipoproteine sehr niedriger Dichte)<sup>153,154,155</sup>.

Des Weiteren spielt ApoE eine wichtige Rolle in neurobiologischen Prozessen sowie neurodegenerativen Erkrankungen. Beispielsweise erfolgt nach Nervenverletzungen eine Erhöhung der ApoE-Expression, welche neuronale Reparaturen unterstützt indem es Lipide zu regenerierenden Axonen und Schwannschen-Zellen während der Remyelinisierung transportiert<sup>156,157,158</sup>.

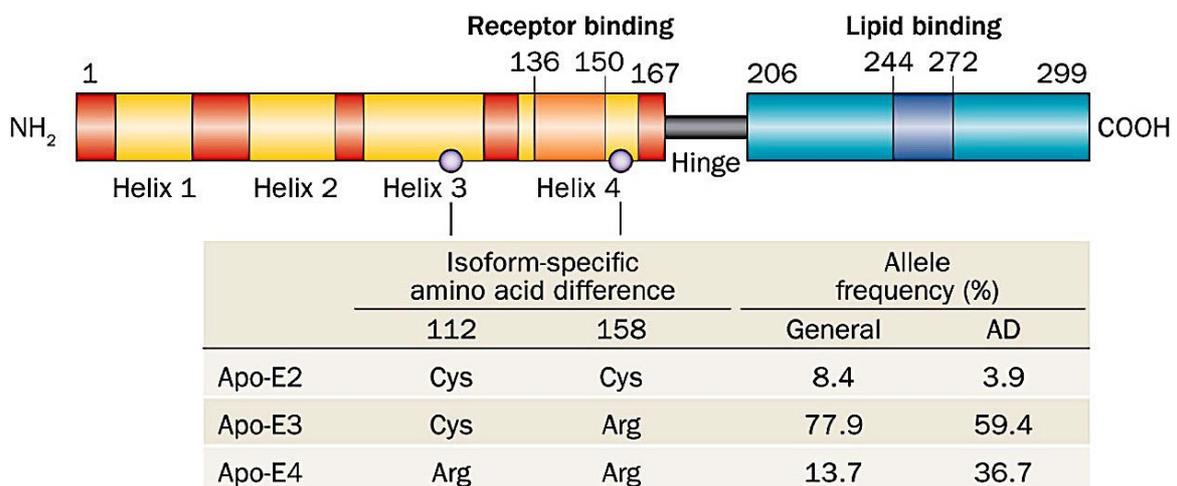


**Abb. 1.8: Cholesterol-Transport im ZNS** verändert nach <sup>278</sup>. Glia-Zellen (hauptsächlich Astrozyten, aber auch Mikroglia) sezernieren ApoE, welches Cholesterin bindet und somit ApoE-enthaltende Lipoproteine bildet. Diese werden über den Transporter ABCA1 (engl.: ATP-binding cassette transporter A1) zu neuronalen Zellen transportiert, über LDLR aufgenommen und rezeptorvermittelt endozytiert. Folglich wird Cholesterin an die Neuronen abgegeben. Einige ApoE-Rezeptoren fungieren darüber hinaus als Signalrezeptoren.

### 1.3.2 Genetik und Struktur des ApoE

Das ApoE-Gen befindet sich beim Menschen auf Chromosom 19 und besteht aus vier Exons und drei Introns mit insgesamt 3597 Basenpaaren<sup>160,161</sup>. Die Transkription von ApoE wird durch den Leber-X-Rezeptor (LXR), ein Regulator der Cholesterin-, Fettsäure- und Glukosehomöostase, und den Peroxisomenproliferator-aktivierten Rezeptor  $\gamma$  aktiviert<sup>162</sup>. Das translatierte Protein besteht aus 299 Aminosäuren und enthält mehrere amphipathische  $\alpha$ -Helices (Abb. 1.9)<sup>160</sup>.

Es existieren hauptsächlich drei verschiedene Isoformen (ApoE2, ApoE3 und ApoE4), welche sich jeweils in nur ein bis zwei Aminosäuren voneinander unterscheiden<sup>163</sup>. Der Unterschied beschränkt sich auf die Aminosäure an Position 112 und/oder 158, an welcher entweder ein Cystein oder ein Arginin vorhanden ist<sup>160</sup>. Dieser Polymorphismus beeinflusst sowohl die Proteinstruktur als auch die Fähigkeit an Lipide und Rezeptoren zu binden<sup>164,165</sup>. Die Isoform E4, der genetische Hauptrisikofaktor an SAD zu erkranken<sup>41</sup>, ist assoziiert mit einer erhöhten AD-Prävalenz sowie einem niedrigeren Erkrankungsalter<sup>166,167</sup>. Das Erkrankungsrisiko und das mittlere Erkrankungsalter bei klinischem Beginn liegt bei ApoE4-homozygoten Patienten bei 91% und 68 Jahren, bei ApoE4-heterozygoten Patienten bei 47% und 76 Jahren und bei 20% und 84 Jahren bei Patienten, die keinen ApoE4-Genotyp besitzen<sup>166</sup>.



**Abb. 1.9: ApoE-Proteinstruktur und Isoform-spezifische Unterschiede** übernommen aus 147. Das ApoE-Protein besteht aus 299 Aminosäuren und enthält mehrere amphipathische  $\alpha$ -Helices. Eine Gelenkregion verbindet die N- und C-terminalen Bereiche. Die N-terminale Region bildet ein antiparalleles Vier-Helix-Bündel, wodurch die unpolaren Bereiche des Proteins innerhalb liegen. Die C-terminale Domäne hingegen besteht aus drei  $\alpha$ -Helices, welche eine hydrophobe Oberfläche bilden und mit der N-terminalen Domäne durch Wasserstoffbrücken und Salzbrücken wechselwirken. Die C-terminale Region enthält darüber hinaus eine LDLR-Bindungsstelle<sup>169</sup>. Des Weiteren sind in der Tabelle die Unterschiede der ApoE-Isoformen dargestellt (Unterschiede in Aminosäuren und prozentuale Wahrscheinlichkeit des auftretenden Allels).

### 1.3.3 ApoE4 als Hauptrisikofaktor der AD

Bisherige Studien konnten ApoE4 als Hauptrisikofaktor der SAD identifizieren<sup>41</sup>. Die Isoform E4 spielt vor allem im A $\beta$ -spezifischen Metabolismus der AD eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass ApoE mit A $\beta$ -Plaques kolokalisiert<sup>170</sup>. Dahingehend wurde gezeigt, dass die ApoE-Isoformen die A $\beta$ -Ablagerung beeinflussen, um senile Plaques zu bilden und die zerebrale Amyloidangiopathie zu fördern<sup>171</sup>. A $\beta$ -Ablagerungen in Form von senilen Plaques sind vermehrt bei ApoE4-Trägern zu beobachten<sup>172</sup>. Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen ApoE4 und einer erhöhten A $\beta$ -Aggregation mit zusätzlich verlangsamten Abbau gezeigt werden<sup>168,173</sup>.

ApoE beeinflusst neben der A $\beta$ - auch die Tau-Pathologie. Während ApoE2 und ApoE3 zusammen mit dem Tau-Protein die Mikrotubuli stabilisieren und es vor Hyperphosphorylierung schützen<sup>174</sup>, spielt ApoE4 eine entgegengesetzte Rolle. Studien fanden heraus, dass ein ApoE4-Fragment, welches durch proteolytische Spaltung entsteht, die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins sowie die Zytoskelett-Zerstörung als auch die mitochondriale Dysfunktion in Neuronen unterstützt. Dies führt anschließend zum Absterben und zur Ablagerung von Neuronen<sup>156,175,176</sup>.

Aufgrund der ApoE4-spezifischen Förderung der Bildung von A $\beta$ -Plaques und NFTs kommt es zu zerebralen Entzündungsreaktionen und folglich zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Diese geht einher mit einer Überaktivierung von Mikroglia-Zellen und trägt somit zur Pathogenese der AD bei<sup>178,179</sup>. Im Vergleich zu ApoE3 induziert ApoE4 eine robustere pro-inflammatorische Aktivität in Astrozyten und Mikroglia<sup>181</sup>. Eine Studie konnte demonstrieren, dass eine intravenöse Verabreichung von LPS in ApoE4-transgenen-Mäusen zu einer stärkeren Entzündungsreaktion führt als in ApoE3-transgenen-Mäusen<sup>182,183</sup>. Dies zeigt die entzündungsfördernde Funktion der Isoform ApoE4, welche die Überaktivierung sowie die Entwicklung des dysregulierten, krankheits-assoziierten Phänotyps der Mikroglia-Zellen fördern könnte.

## 1.4 Zielsetzung

Die AD ist die häufigste Form der Demenz und bedingt durch die zunehmende Überalterung der Gesellschaft steigt die Anzahl an jährlichen Neuerkrankungen stetig. Aktuelle Therapien zielen vorwiegend auf den Abbau von  $A\beta_{1-42}$  ab, zeigen jedoch nur wenige positive Effekte und verzögern den Krankheitsverlauf nicht. Zahlreiche Untersuchungen konnten die Bedeutung der Neuroinflammation, bei der Mikroglia eine wichtige Position einnehmen, in den Kontext der AD stellen. Im gesunden Gehirn besitzen Mikroglia-Zellen eine homöostatische und funktionelle Gensignatur<sup>133</sup>. Diese verändert sich während des Verlaufs der AD zu einem krankheitsspezifischen Phänotyp<sup>1</sup>, welcher die Progression dieser Erkrankung möglicherweise unterstützt. Während dieses Prozesses kommt es des Weiteren zu einer Expressionszunahme von ApoE. **Daher könnte ApoE ein kritischer Faktor bei der mikroglialen Aktivierung sein und die Expressionssignatur von dysfunktionalen Mikroglia bei neurodegenerativen Erkrankungen beeinflussen (Abb. 1.10).** Insbesondere die Rolle der verschiedenen humanen ApoE-Isoformen in diesem Prozess ist bisher unklar.



**Abb. 1.10: Zielsetzung.** Aufgrund von bereits durchgeführten Untersuchungen<sup>2</sup> ist zu vermuten, dass ApoE die Entwicklung von einer gesunden aktivierten hin zu einer pathogenen aktivierten Mikroglia-Zelle, welche die AD-Pathogenese unterstützt, beeinflusst.

Schlussfolgernd ergeben sich die folgenden Fragestellungen für die vorliegende Arbeit:

1. Ist eine Untersuchung der ApoE-spezifischen Mikroglia-Physiologie im murinen N9-Zellkulturmodell möglich?
2. Liegt eine spezifische Beeinflussung des mikroglialen krankheitsassoziierten Phänotyps durch die ApoE-Isoformen vor?
3. Ist eine ApoE-spezifische Regulation der Physiologie von Mikroglia-Zellen auf transkriptionaler Ebene möglich?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Laborgeräte und Materialien

#### 2.1.1 Laborgeräte

Tab. 2.1: Verwendete Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Autoklav	Technoklav50	Technorama, Fernwald
Bildgebendes Durchflusszytometer	Image Stream® <sup>X</sup> Mark II	Merck, Darmstadt
Block-Heizgerät	Thermo-Mixer C	Eppendorf, Hamburg
Blotting Modul	Mini Protean	BioRad, München
Blotting Modul	Mini Trans	BioRad, München
Drucker	P93D	Mitsubishi, Ratingen
Durchflusszytometer	Aria IIu	BD Bioscience, USA
Durchflusszytometer	Canto II	BD Bioscience, USA
Feinwaage	CP3202S	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	ApoTome	Zeiss, Oberkochen
Gelkammer (DNA)	Mini-Sub Cell GT	BioRad, München
Imaging System	Odyssey® CLx	Licor, Bad Homburg
Inkubator	Heraeus	Thermo Scientific, USA
Invers-Mikroskop	Axiovert S100	Zeiss, Oberkochen
Konfokalmikroskop	TCS SP8	Leica, Wetzlar
Kühlzentrifuge	Eppendorf 5804R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge	Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge	Eppendorf F45-24-11	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	RCT basic IKAMAG	IKA-Werke GmbH, Staufen
Mikroplatten-Lesegerät	Safire <sup>2</sup>	TECAN, Männedorf
Mikroplatten-Lesegerät	Tecan Infinite M200	Tecan Group AG, Schweiz
Mikrowelle	Micromat	AEG, Frankfurt am Main
Netzgerät (DNA-Gele)	EPS200	Pharmacia Biotech, Freiburg

Netzgerät (Proteingele)	Power Pac Basis	BioRad, München
PCR Cycler	MyCycler Thermal	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	CG 840	Schott, Mainz
Photometer	Biophotometer Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipette reference	100 – 1.000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette reference	10 – 100 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette reference	1 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetteboy	Integra Bioscience, Schweiz
Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3	Thermo Scientific, USA
Tiefkühler (-80°C)	UF80-450S	Colora Messtechnik GmbH, Ulm
Tiefkühler (-80°C)	TSX Serie	Thermo Scientific, USA
Tischzentrifuge	Mini MC 6	Sarstedt, Nürnbrecht
Überkopfschüttler	Rotator	LabMarket, Mannheim
UV-Flächenstrahler	N90	Benda, Wiesloch
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Zellzähler (automatisiert)	Countess™ II	Thermo Scientific, USA

## 2.1.2 Glas- und Kunststoffverbrauchsmaterialien

Tab. 2.2: Verwendete Glas- und Kunststoffverbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
6 well-Platte	Thermo Scientific, USA
12 well-Platte	Thermo Scientific, USA
48 well-Platte	Thermo Scientific, USA
96 Micro Well Optical Bottom Plates	Nunc, Wiesbaden
96 Well Platten Nunc MaxiSorb	Thermo Scientific, USA
Corning® Costar® Transwell Culture Assay, Porengröße 8 µm	Merck, USA
Culture Inserts 2-well in µ-dish ibiTreat	ibidi, München
Einwegpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	BD Bioscience, USA
Kryoröhrchen Cryo Pure Tubes	Sarstedt, Nürnbrecht
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt
Mikrotiterplatten für qRT-PCR MicroAmp®	Applied Biosystems, Darmstadt

Nitrozellulose-Membran	BioRad, München
PCR-Reaktionsgefäße	Rapidozym, Berlin
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1.000 µl)	Eppendorf, Hamburg
PVDF-Membran	BioRad, München
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (50 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sterile Filter (30 µm)	Sysmex Europe GmbH, Norderstedt
Whatman-3MM Papier	Whatman, Großbritannien
Zellkulturflasche T75	Sarstedt, Nürnberg
µ-slide VI <sup>0,4</sup> ibiTreat	ibidi, München

### 2.1.3 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammten (sofern nicht anders angegeben) von den folgenden Firmen: Merck (Darmstadt), Promega (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Hamburg) und Thermo Fisher Scientific (USA). Restriktionsenzyme (Tab. 2.14) wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt) bezogen.

### 2.1.4 Antikörper und Farbstoffe

Tab. 2.3: Primär- und Sekundärantikörper für Western Blotting und Immunzytochemie

Bezeichnung	Firma	Katalognr.
	Primärantikörper	
goat-anti ApoE	Merck, USA	AB947
mouse-anti-Actin, clone C4	Merck, USA	MAB1501
mouse-anti-alpha-Tubulin	Merck, USA	T9026
mouse-anti-RhoA	Santa Cruz, USA	sc-17794
mouse-anti-Rock1	Santa Cruz, USA	sc-17794
rabbit-anti-β-Catherin	Cell signalling, USA	9582
rabbit-anti-Alpha-Tubulin E3	Cell signaling, USA	2144S

rabbit-anti Histon H3	Cell signaling, USA	9715
rabbit-anti-PDI	Stress Marq, Kanada	SPC-114
	Sekundärantikörper	
donkey-anti-mouse Alexa 790	Thermo Fisher Scientific, USA	A11371
goat-anti-mouse Alexa 680	Thermo Fisher Scientific, USA	A28183
goat-anti-rabbit Alexa 680	Thermo Fisher Scientific, USA	A21109
goat-anti-rabbit Alexa 790	Thermo Fisher Scientific, USA	A27041
rabbit-anti-goat Alexa 680	Thermo Fisher Scientific, USA	A27020

Tab. 2.4: Konjugierte Antikörper

Bezeichnung	Fluorochrom	Firma	Katalognr.
CD11b (M1/70)	PE-Cy7	Thermo Fischer Scientific, USA	25-0112-81
Phalloidin	Alexa 555	Thermo Fischer Scientific, USA	A34055
PKH67	GFP	Merck, USA	PKH67GL-1KT

### 2.1.5 Kits

Tab. 2.5: Verwendete Kits

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
Dual-Luciferase <sup>®</sup> Reporter Assay	Luciferase-Assay	Promega, USA
GeneJET PCR Purification Kit	PCR-Aufreinigung	Thermo Fisher Scientific, USA
Guise-it <sup>™</sup> CRISPR/Cas9 System	Klonierung	Takara, Japan
NucleoBond <sup>®</sup> XtraMedi	Plasmidisolierung	Machery-Nagel, Düren
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid Transfection- grade	Plasmidisolierung	Machery-Nagel, Düren
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA	RNA-Isolierung	Machery-Nagel, Düren
Pierce Agarose ChIP	Chromatation- Immunopräzipitation	Thermo Fisher Scientific, USA
Pierce Co-Immunoprecipitation	Immunopräzipitation	Thermo Fisher Scientific, USA
QuickChange Lightning Site- Directed Mutagenesis Kit	DNA-Mutagenese	Agilent Technologies, USA

Subcellular Protein Fractionation	Subzelluläre Fraktionierung	Thermo Fisher Scientific, USA
Viromer <sup>®</sup> Yellow	Transfektion	lipocalyx, Halle

### 2.1.6 Stimulatoren

Für die im Folgenden beschriebenen zellbiologischen Experimente wurden die nachfolgenden Stimulatoren verwendet:

**Tab. 2.6: Verwendete Stimulatoren**

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
ApoE (aus humanem Plasma)	3 µg/ml	rPeptide, USA
humanes TGFβ1 (transformierender Wachstumsfaktor β-1)	10 – 50 ng/ml	MACS Miltenyi Biotec, USA
muriner Komplementfaktor 5a (C5a) (rekombinant)	20 ng/ml	R&D Systems, USA
Prostaglandin J <sub>2</sub>	1 – 5 µM	Sigma-Aldrich, USA
TO901317	0,6 – 3 µM	Sigma-Aldrich, USA

### 2.1.7 Software

Zur Erstellung der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Computer-Programme verwendet:

- AxioVision (Zeiss)
- FACS Diva 6 (BD Pharmingen)
- Fiji (GPL v2)
- IDEAS<sup>®</sup> 6.2 (Merck)
- Image Studio 5.2 (Licor)
- IMARIS (Bitplane)
- INSPIRE<sup>®</sup> (Merck)
- LAS AF Lite (Leica)
- Microsoft Office 2016 (Excel, Powerpoint, Word)
- Prism5 (GraphPad)
- QuantStudio<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific)

## 2.2. Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Nährmedien

Das Kultivieren der eukaryontischen Zellen erfolgte mit spezifischen Nährmedien (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI)), welche auf einer Lösung aus Glukose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen basieren. Darüber hinaus enthalten sie für die Zellen wichtige Inhaltsstoffe wie Mineralien und Hormone. Zu den hier verwendeten Medien erfolgte eine Zugabe von 10% fetalem Kälberserum (FBS). Alle Nährmedien enthielten den pH-Indikator Phenolrot, mit deren Hilfe der pH-Wert im Kulturmedium sowie die Zellgesundheit abgeschätzt werden kann.

### 2.2.2 Zelllinien

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Zelllinien verwendet:

**Tab. 2.7: Zelllinien**

Zelllinie	Spezifität	Medium
<b>Murine Zelllinien</b>		
N9.Wt	immortalisierte Mikroglia-Zellen	RPMI mit GlutaMAX™ + FBS
N9.ApoE2	immortalisierte Mikroglia-Zellen mit Expression des humanen ApoE Isoform 2 (eigene Arbeit)	RPMI mit GlutaMAX™ + FBS + Puromycin (2 µg/ml)
N9.ApoE3	immortalisierte Mikroglia-Zellen mit Expression des humanen ApoE Isoform 3 (eigene Arbeit)	
N9.ApoE4	immortalisierte Mikroglia-Zellen mit Expression des humanen ApoE Isoform 4 (eigene Arbeit)	
N9.ApoEKO	immortalisierte Mikroglia-Zellen, Knockout des ApoE (eigene Arbeit)	
Neuro2a	albino Neuroblastoma-Zellen	DMEM + FBS
<b>Humane Zelllinien</b>		
HEK293T	epitheliale embryonale immortalisierte Nierenzellen	DMEM + FBS

### **2.2.3 Subkultivierung eukaryontischer Zellen**

Bei Erreichen einer entsprechend hohen Zellzahl in den Kulturflaschen (konfluente Bedeckung des Bodens) wurden die Zellen passagiert. Dafür erfolgte zunächst die Entnahme des verbrauchten Mediums mit Hilfe einer Glaspipette und einer Absaugvorrichtung. Zur Entfernung des verbleibenden Nährmediums wurden die Zellen mit 5 - 10 ml 1 x Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, pH 7,4) gewaschen. Durch die Zugabe von 0,5 - 1 ml Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-Lösung und einer anschließenden Inkubation von 5 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, erfolgte die Ablösung der Zellen von der Zellkulturflasche. Für die folgende Subkultivierung wurde eine definierte Menge der Zellsuspension auf eine neue, zuvor mit 5 - 10 ml Medium gefüllte Zellkulturflasche passagiert und weiter im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

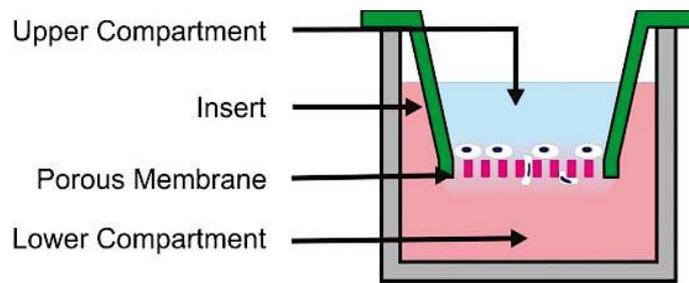
### **2.2.4 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen**

Zur längerfristigen Lagerung der verschiedenen Zelllinien können diese bei -80°C bzw. in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Dazu wurden die Zellen zunächst mit einer Trypsin/EDTA-Lösung von der Zellkulturflasche gelöst. Um die Zellen vor den beim Einfrieren entstehenden Eiskristallen zu schützen, wurden die Zellen in Medium mit 10% zugesetztem Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend in 2-ml-Kryo-Röhrchen überführt und in einem speziellen Behälter (Mr. Frosty Cryo 1°C Freezing Container, NALGENE) mit Isopropylalkohol bei -80°C langsam tiefgefroren. Zur langfristigen Lagerung erfolgte anschließend die Überführung der tiefgefrorenen Zellen in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank.

Das Auftauen eukaryontischer Zellen sollte im Vergleich zum Einfrieren in möglichst kurzer Zeit durchgeführt werden, um eine Schädigung der Zellen durch das sich im Medium befindende DMSO zu vermeiden. Dazu wurden die Kryo-Röhrchen mit den gefrorenen Zellen in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtes Nährmedium überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1.200 rpm für 5 min. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2.5 Transwell-Assay (Boyden-Chamber-Assay)

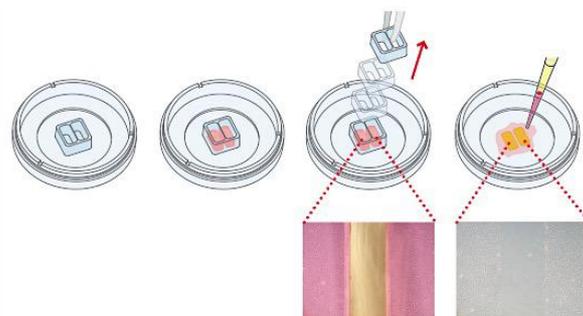
Zur Untersuchung gerichteter Zellmigration *in vitro* wurde ein Transwell-Assay durchgeführt. Dafür wurden zunächst 600  $\mu\text{l}$  Medium mit oder ohne den entsprechenden Chemoattraktant (20 ng/ml muriner Komplementfaktor 5a) in das untere Well gegeben und  $5 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu\text{l}$  Medium in das obere Well auf die poröse Membran ausgesät (Abb. 2.1). Das Assay wurde anschließend für 2 h bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Durch den Chemoattraktant kommt es zu einer mehr oder weniger schnellen zielgerichteten Bewegung der Zellen. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium sowie die stationären Zellen des oberen Wells entfernt und die Inserts dreimal für 5 min mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Das Fixieren der durch den Filter migrierten Zellen erfolgte für 20 min mit 4% Paraformaldehyd (PFA) bei 37°C. Nach der Permeabilisierung der Zellmembran mit 0,2% Triton-X-100 für 10 min wurden die Zellkerne der migrierten Zellen mit 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (ApoTom, Zeiss), indem fünf repräsentative Bilder pro Well aufgenommen und mit Hilfe des Programmes Fiji und dem Plugin „cell-counter“ ausgezählt wurden.



**Abb. 2.1: Prinzip des Transwell-Assay** übernommen von 184. Migrationsfähige Zellen können vom oberen Well durch die poröse Membran in das untere Well migrieren.

### 2.2.6 Scratch-Assay

Zur Untersuchung allgemeiner Zellmigration *in vitro* wurde ein Scratch-Assay mit Hilfe spezieller Inserts der Firma ibidi (München) durchgeführt (Abb. 2.2). Dafür wurden zunächst  $5 \times 10^4$  Zellen pro Insertöffnung in einem Volumen von 70  $\mu\text{l}$  Medium ausgesät. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  wurde das Insert vorsichtig



**Abb. 2.2: Prinzip eines Scratch-Assays** übernommen von 185. Die Aussaat der Zellen erfolgt in beide Kammern des speziellen Inserts. Nach 24 h Inkubation wurde das Inert vorsichtig entfernt und die Zellmigration über mehrere Tage fotodokumentiert.

entfernt und 2 ml Medium (evtl. mit entsprechendem Agens, 3 µg/ml humanes ApoE) zu den Zellen gegeben. Anschließend erfolgte eine Fotodokumentation über 72 h. Die Quantifizierung wurde mit der Software Fiji und dem Plugin „MRI Wound Healing Tool“ durchgeführt.

### **2.2.7 Transiente Transfektion**

Die Transfektion beschreibt das Einbringen von fremder DNA oder RNA mit Hilfe von Plasmiden in eine eukaryontische Zelle<sup>116</sup>. Da die Hauptaufgabe von Mikroglia-Zellen die Phagozytose ist und sie daher vorwiegend zur Degradation von Plasmiden neigen, stellt die Transfektion dieser Zellen eine Herausforderung dar. Aus diesem Grund wurde für die transiente Transfektion bei Mikroglia-Zellen nach Vergleich mehrerer verschiedener Transfektionsmethoden (Lipofektion, Magnetofektion, Nanopartikel) das Transfektions-Kit „Viromer<sup>®</sup>Yellow“ (lipocalyx, Halle) verwendet.

In Vorbereitung auf die Transfektion wurden 24 h zuvor  $2,5 \times 10^5$  Zellen in eine 6-Well-Platte ausgesät. Am Tag der Transfektion erfolgte zunächst ein Mediumwechsel und eine Verdünnung der einzubringenden Plasmid-DNA in 270 µl Yellow-Puffer (22 ng/µl). Anschließend wurden 28,8 µl Puffer zu 1,2 µl Viromer-Reagenz gegeben und für 5 s gevortext. Die verdünnte Plasmid-DNA konnte dann zum Viromer-Reagenz gegeben und durch Auf- und Abpipettieren miteinander vermischt werden. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurden 200 µl des Reaktionsgemisches vorsichtig auf die Zellen getropft. Es erfolgte ein erneuter Mediumwechsel nach etwa 4 h und eine anschließende Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 48 h.

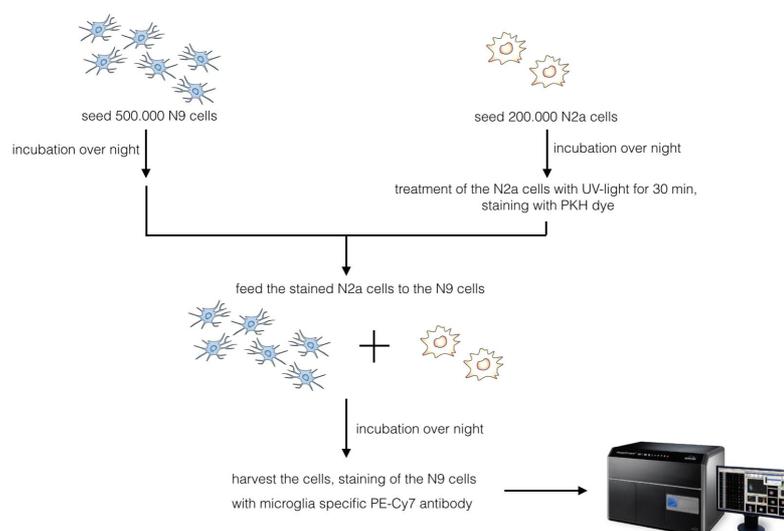
### **2.2.8 Dual-Luciferase<sup>®</sup>-Reporter-Assay**

Zur Quantifizierung der Promotoraktivität unter ApoE-Kontrolle wurde ein Luciferase-Assay mit Hilfe des entsprechenden Kits der Firma Promega (USA) durchgeführt. Das Assay dient der Untersuchung der Promotoraktivität durch die Messung der Lichtintensität des Luciferase-Enzyms, welches unter der Kontrolle des putativen Promotors steht. Dafür wurden zunächst  $2,5 \times 10^5$  Zellen in eine 6-Well-Platte ausgesät und nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit zwei verschiedenen Plasmiden transient transfiziert. Bei den Plasmiden handelte es sich zum einen um das pGL3\_basic (mit zuvor durch Klonierung eingebrachter putativer Promotorsequenz) zur Untersuchung der spezifischen Promotoraktivität und zum anderen um das pRL\_SV40 zur Quantifizierung der Transfektionseffizienz (siehe Anhang A1). Nach 48-stündiger Inkubation wurde zunächst das Medium entfernt und

die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellyse erfolgte mit 500  $\mu$ l 1 x „Passive Lysis Puffer“ auf dem Schüttler für 25 min. Anschließend wurde das Zelllysate in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 14.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die Messung des Überstandes erfolgte mit Hilfe eines 96-Well-Platten-Lesegeräts (Tecan Infinite M200, Tecan Group AG, Schweiz) und 20  $\mu$ l des Zelllysates entsprechend den Herstellerangaben.

### 2.2.9 Bildgebende Durchflusszytometrie

Für die Untersuchung der putativen ApoE-Isoform-abhängigen Phagozytose (Abb. 2.3) von Mikroglia-Zellen, welche gestresste oder apoptotischen Zellen aufnehmen können, wurden zunächst  $5 \times 10^5$  N9-Zellen und  $2 \times 10^5$  Neuro2a-Zellen in T75-Kulturflaschen ausgesät. Am nächsten Tag wurde in den Neuro2a Zellen mittels UV-Bestrahlung für 30 min und einer Inkubation für 2 h im Inkubator die Apoptose der Zellen ausgelöst. Anschließend erfolgte die Färbung der apoptotischen Neuro2a-Zellen mit dem Membranfarbstoff PKH67 (Merck, USA) entsprechend den Herstellerangaben. Jeweils  $3 \times 10^5$  der gefärbten Neuro2a- wurden zu den N9-Zellen gegeben. Nach einer erneuten Inkubation über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert, filtriert (Porengröße: 30  $\mu$ m) und anschließend mit 4% PFA für 20 min auf Eis fixiert. Daraufhin erfolgte die Färbung der N9-Zellen mit dem Mikroglia-spezifischen konjugierten Antikörper CD11b-PE-Cy7 (Thermo Fisher Scientific, USA) für 20 min auf Eis. Nach erneutem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Messung und Analyse des Phagozytose-Verhaltens mit Hilfe des bildgebenden Durchflusszytometers (Image Stream<sup>®</sup>X Mark II, Merck, USA).



**Abb. 2.3: Ablaufplan des Phagozytose-Assays**<sup>verändert nach 280</sup>. Ablauf des Experimentes zur Untersuchung des Phagozytose-verhaltens von murinen N9-Zellen.

Für die Ermittlung des Zellkernvolumens wurden  $5 \times 10^6$  N9-Zellen trypsiniert, mit 4% PFA für 20 min fixiert und anschließend filtriert (Porengröße: 30  $\mu\text{m}$ ). Nach Permeabilisierung der Zellen mittels Triton-X-100 (0,2%) für 10 min konnten die Zellkerne mit 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DAPI angefärbt und mit Hilfe der bildgebenden Durchflusszytometrie analysiert werden.

Bei jedem Experiment wurden 5.000 Zellen pro Probe gemessen und mit Hilfe der IDEAS-Software quantifiziert.

### **2.2.10 Immunfluoreszenzfärbung**

Für die mikroskopische Untersuchung der murinen Mikroglia-Zellen wurden zunächst  $4 \times 10^3$  Zellen pro Kanal in einem „ $\mu$ -Slide VI<sup>0.4</sup> ibiTreat“ (ibidi, München) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 4% PFA für 20 min bei 37°C fixiert. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte mit Hilfe von 0,2% Triton-X-100 für 10 min auf dem Schüttler. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 1 x TBST (Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween20) erfolgte das Blocken unspezifischer Bindestellen mit Blocking-Puffer (Protein-Free Blocking-Buffer-TBST, GBioscience, Thermo Fisher Scientific, USA) für 1 h auf dem Schüttler. Es folgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Nach drei Waschschritten mit 1 x TBST für jeweils 10 min erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei RT für 1,5 h. Abschließend erfolgte das Eindeckeln der Proben mit DAPI Fluoromount-G® (Southern Biotech, USA), welches bereits den Farbstoff DAPI zur Färbung der Zellkerne enthielt. Die fixierten und gefärbten Proben wurden anschließend mit dem konfokalen Mikroskop TCS SP8 (Leica, Wetzlar) dokumentiert und mit dem Programm Fiji quantifiziert. Des Weiteren wurden aus z-stack-Aufnahmen mit Hilfe der Software IMARIS 3D-Modelle der Zellen erstellt.

## **2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1 RNA-Isolierung**

Die Isolierung der RNA aus Kulturzellen (ca.  $1 \times 10^7$  Zellen) erfolgte mit Hilfe des Kits „NucleoSpin<sup>®</sup>RNA“ (Machery-Nagel, Düren) entsprechend den Herstellerangaben. Die isolierte RNA wurde in 40  $\mu\text{l}$  Ribonuklease-freiem H<sub>2</sub>O eluiert und bei -80°C gelagert. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte mit Hilfe eines Photometers (Biophotometer Plus, Eppendorf, Hamburg).

## 2.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

### 2.3.2.1 Semiquantitative PCR

Die semiquantitative PCR dient der Quantifizierung der Genexpression sowie der Amplifizierung von molekularen Fragmenten zur Klonierung, welche anschließend mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft wurden.

Die semiquantitative PCR wurde mit folgendem Reaktionsansatz und Programm durchgeführt:

#### Reaktionsansatz semiquantitative PCR

<i>PCR-Mastermix 2x</i>	<i>10,0 µl</i>
<i>Primer Fwd (10 µM)</i>	<i>1,0 µl</i>
<i>Primer Rev (10 µM)</i>	<i>1,0 µl</i>
<u><i>DNA</i></u>	<u><i>1,0 µl</i></u>
<i>A.dest.</i>	<i>ad 20,0 µl</i>

**Tab. 2.8: Programm der Semiquantitativen PCR**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1 – Denaturierung	95°C	5 min	1
2 – Denaturierung	95°C	30 s	35
3 – Anlagerung	T <sub>M</sub> (Primer) – 3°C	30 s	
4 – Elongation	72°C	30 s	
5 – Elongation	72°C	5 min	1
6 – Lagerung	4°C	∞	-

Für die Quantifizierung der Genexpression bzw. der Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

**Tab. 2.9: Verwendete Oligonukleotide**

Gen/Fragment	Sequenz
Bhlhe40 Fwd	5'- atatctcgagcgttgtccaacacgtgag -3'
Bhlhe40 Rev	5'- atataagcttcagcgcacagactggcgggtg -3'
mApoE Fwd	5'- ggacagggggagccctataa -3'
mApoE Rev	5'- ggggtcagttgttcctccag -3'
Mef2a Fwd	5'- atatctcgagccgccgtcatcttcttctg -3'
Mef2a Rev	5'- atataagcttcgcgccgccggagcc -3'

mGapDH Fwd	5'- cccttaagaggggatgctgcc -3'
mGapDH Rev	5'- actgtgccgttgaatttgc -3'
Tfec Fwd	5'- atctcgagtcctgagatacctaacacatgaaatgagacc -3'
Tfec Rev	5'- ataagcttaggaagaagaatgacacagcagtttc -3'

### 2.3.2.2 PCR zur Modifizierung von Gensequenzen

Für die Modifizierung des kommerziell erworbenen ApoE3-Genes (pBabePuro-ApoECDs-Plasmid, Addgene, USA) wurde nach Restriktion und Klonierung in pcDNA3.1 (Anhang A1) mit Hilfe des "QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit" (Agilent, USA) und geschicktes Primerdesign entsprechend den Herstellerangaben eine gezielte Mutation eingefügt, um die Gensequenzen für ApoE2 bzw. ApoE4 zu erhalten. Für die zielgerichtete Mutation wurden die folgenden Oligonukleotide verwendet:

**Tab. 2.10: Verwendete Oligonukleotide für die spezifische Mutation**

Gen/Fragment	Sequenz
ApoE3 zu ApoE2	Fwd: 5'- ggtacactgccaggcacttctgcaggtcatc -3' Rev: 5'- gatgacctgcagaagtgcctggcagtgacc -3'
ApoE3 zu ApoE4	Fwd: 5'- caggcgccgcgcacgtcctcca -3' Rev: 5'- tggaggacgtgcgcgccgcctg -3'

### 2.3.3 Taq-Man™-Genexpressions-Assay

Das „TaqMan™-Genexpression-Assay“ (Applied Biosystem, Darmstadt) ist ein vorgefertigtes Assay zur gezielten Quantifizierung, Überprüfung und Validierung von spezifischer RNA. Zuerst erfolgte mit Hilfe des „TaqMan™ Transcription Reagents“ – Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) entsprechend den Herstellerangaben eine Two-Step-Real-Time-PCR (Two-Step-RT-PCR) zur Umwandlung der isolierten RNA (500 ng) in cDNA.

Anschließend wurde eine quantitative Real-Time-PCR (qPCR) durchgeführt. Während der Elongationsphase der qPCR erfolgt die quantitative Messung der spezifischen cDNA mit Hilfe von Fluoreszenz-Signalen, die in Echtzeit erfasst werden. Diese Signale entstehen durch den Abbau der eingesetzten Sonden. Die TaqMan™-Sonde (Hydrolyse-Sonde) besteht aus einem „Quencher“ und einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff. Die Taq-Polymerase, welche zusätzlich zur

Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, baut während der Synthese des Gegenstranges das 5'-Ende dieser Sonde ab. Dadurch entfernen sich Quencher und Fluorophor voneinander und eine steigende Reporter-Fluoreszenz entsteht und kann gemessen werden. Die Stärke der Fluoreszenz nimmt dabei mit der Menge an PCR-Produkten zu. Für die qPCR wurde der folgende Ansatz verwendet:

#### Reaktionsansatz qPCR

<i>TaqMan<sup>TM</sup> Gene Expression Master Mix</i>	5,0 $\mu$ l
<i>TaqMan<sup>TM</sup> -Genexpression-Assay</i>	0,5 $\mu$ l
<i>cDNA</i>	2,0 $\mu$ l
<i>A.dest</i>	10,0 $\mu$ l

Von jeder Probe wurden technische Triplikate in eine 396-Well-Platte pipettiert, mit einer speziellen Folie versiegelt und kurz zentrifugiert. Die Messung der Ansätze erfolgte in der „QuantStudio<sup>TM</sup> 5“ Real-Time-PCR-Maschine der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) nach dem folgenden Programm:

**Tab. 2.11: Programm für die qPCR im Real-Time-PCR-System**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	50°C	2 min	1
2	95°C	10 min	1
3a	95°C	15 s	40
3b	60°C	60 s	
4	4°C	$\infty$	-

Für das TaqMan<sup>TM</sup>-Genexpressions-Assay wurden die folgenden Sonden der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) verwendet:

**Tab. 2.12: Verwendete TaqMan<sup>TM</sup>-Sonden**

Gen	Assay ID	Firma	Katalognummer
ApoE (murin)	Mm01307193_g1	Thermo Fisher Scientific, USA	# 4331182
ApoE (human)	Hs00171168_m1		
Rock1 (murin)	Mm00485745_m1		
GapDH (murin)	Mm99999915_g1		
GapDH (human)	Hs02786624_g1		

### 2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung und Analyse von Nukleinsäuren. Je höher dabei die Agarosekonzentration ist, desto kleiner sind die Poren, die sich im Gel befinden. Daher variierte die Agarosekonzentration der Gele, welche mit 1 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) bei 100°C gelöst wurden, in Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Fragmente, zwischen 1% und 2%. Die Auftrennung der negativ geladenen Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe eines elektrischen Feldes in einer Gelelektrophorese-Kammer, wobei kleinere Moleküle das Feld schneller durchwandern können. Zur Markierung der Lauffront und um ein Einsinken der Proben in das Gel zu ermöglichen, wurden diese mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurden verschiedene Längenstandards verwendet (1.000 - 10.000 Basenpaare, „Gene Ruler“, Thermo Fisher Scientific, USA). Die Auftrennung erfolgte bei 120 V unter Verwendung von 1 x TAE-Laufpuffer für 20 - 60 min. Anschließend konnten die Nukleinsäuren mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid angefärbt und bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht bzw. dokumentiert werden.

#### 50 x TAE-Puffer (pH 8,0)

<i>Tris (2 M)</i>	<i>252,2 g</i>
<i>EDTA (0,5 M)</i>	<i>100,0 ml</i>
<i>Essigsäure</i>	<i>57,1 ml</i>
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	<i>ad 1.000,0 ml</i>

### 2.3.5 Klonierung

#### 2.3.5.1 Plasmide und Bakterienstämme

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen wurden die in den nachfolgenden Tabellen aufgeführten Plasmide und Bakterienstämme verwendet.

**Tab.: 2.13: Verwendete Plasmide**

Plasmid	Merkmale	Herkunft
pGL3_basic	P <sub>Luc+</sub> , Ampicillin-Resistenz, SV40 pA, synth. pA, f1-ori, high copy	Promega (USA)
pRL_SV40	P <sub>Rluc+</sub> , Ampicillin-Resistenz, SV40 pA, f1-ori, high copy	Promega (USA)

pGL3_Mef2a	basierend auf pGL3_basic, exprimiert putativen Mef2a-Promotorbereich	eigene Arbeit
pGL3_Tfec	basierend auf pGL3_basic, exprimiert putativen Tfec-Promotorbereich	
pGL3_Bhlhe40	basierend auf pGL3_basic, exprimiert putativen Bhlhe40-Promotorbereich	
pcDNA3.1(-)	Leerplasmid, basierend auf pcDNA3.1	Addgene (USA)
pcDNA3.1_ApoE2/3/4	basierend auf pcDNA3.1, exprimiert die humanen ApoE Isoformen 2, 3 oder 4	eigene Arbeit

Tab.: 2.14: Verwendete Bakterienstämme

Bakterium	Genotyp	Herkunft
<i>E.coli</i> XL10 Gold	ultrakompetent, endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMRmrr) 173 tetR F'[proAB lacIqZΔM15 Tn10(TetR Amy CmR)]	Agilent Technologies (Australien)

### 2.5.3.2 Isolierung genomischer DNA aus Zellmaterial

Zur Isolierung genomischer DNA wurden zunächst ca.  $2 \times 10^6$  Zellen mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 200  $\mu$ l DNA-Isolations-Puffer, welcher 2  $\mu$ l Proteinase K (20 mg/ml) enthielt, aufgenommen und über Nacht bei 56°C und 1.000 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm (RT). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 200  $\mu$ l Isopropanol versetzt und für 15 min bei 13.000 rpm (RT) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen (5 min, 13.000 rpm, RT) und bei RT getrocknet. Die DNA konnte anschließend in 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und die Konzentration mittels Photometer (Biophotometer Plus, Eppendorf, Hamburg) bestimmt werden.

#### DNA-Isolations-Puffer

<i>Tris-HCL</i> (1 M, pH 8,5)	5,0 ml
<i>EDTA</i> (0,5 M)	0,5 ml
<i>SDS</i> (10%)	1,0 ml
<i>NaCl</i> (5 M)	2,0 ml
<i>A.dest</i>	ad 50,0 ml

### 2.3.5.3 Amplifizierung und Aufreinigung genomischer DNA

Die Amplifizierung der verschiedenen Fragmente wurde mit den in Tabelle 2.9 aufgeführten spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Die PCR erfolgte wie in 2.3.2 beschrieben. Im Anschluss an die PCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.3.4) zur Überprüfung des amplifizierten Fragments durchgeführt. Es erfolgte des Weiteren eine Aufreinigung des PCR-Produktes mit Hilfe des „GeneJET PCR Purification Kit“ (Thermo Scientific, USA) entsprechend den Herstellerangaben.

### 2.3.5.4 Restriktionsverdau

In Vorbereitung auf die Ligation des amplifizierten Fragments in den entsprechenden Vektor erfolgte ein Restriktionsverdau nach dem folgenden Ansatz:

#### Restriktionsverdauansatz DNA-Fragment

<i>DNA-Fragment</i>	<i>200 ng</i>
<i>Enzym I</i>	<i>1 µl</i>
<i>Enzym II</i>	<i>1 µl</i>
<i>Puffer</i>	<i>2 µl</i>
<i>A.dest</i>	<i>ad 30 µl</i>

#### Restriktionsverdauansatz Vektor

<i>Vektor</i>	<i>1 µg</i>
<i>Enzym I</i>	<i>1 µl</i>
<i>Enzym II</i>	<i>1 µl</i>
<i>Puffer</i>	<i>2 µl</i>
<i>A.dest</i>	<i>ad 20 µl</i>

Beide Ansätze wurden für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach der Restriktion wurde zur Kontrolle eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die benötigten DNA-Fragmente und der Vektor wurden vorsichtig mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Gelextraktion (siehe 2.3.5.5) aufgereinigt.

**Tab. 2.15: Verwendete Restriktionsenzyme (Fast-Digest, Thermo Scientific, USA)**

Enzym	Restriktionsstelle
BamHI	5'...G/GATCC...3' 3'... CCTAG/G...5'
EcoRI	5'...G/AATTC...3' 3'...CTTAA/G5'
HindIII	5'...A/AGCTT...3' 3'...TTCGA/A...5'
XhoI	5'...C/TCGAG...3' 3'...GAGCT/C...5'

### 2.3.5.5 Gelextraktion aus Agarosegelen

Das zu eluierende DNA-Fragment wurde zunächst mit Hilfe eines sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der Fragmente erfolgte unter Verwendung des Kits „GeneJET PCR Purification Clean Up“ (Thermo Scientific, USA) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mit Hilfe eines Photometers (Biophotometer Plus, Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Die aufgereinigten Fragmente wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.3.5.6 Ligation

Die Ligation dient der Verknüpfung eines spezifischen DNA-Fragments mit einem linearisierten Vektor zur Produktion eines gewünschten Plasmids. Für die enzymkatalysierte Ligation wurde die „T4 DNA Ligase“ (Thermo Scientific, USA) mit dem entsprechenden Puffer nach dem folgenden Ansatz verwendet:

#### Ligationsansatz: Vektor + DNA-Fragment

<i>Vektor</i>	<i>0,5 µg</i>
<i>DNA-Fragment</i>	<i>5,0 µg</i>
<i>Ligase</i>	<i>1,0 µl</i>
<u><i>Ligase-Puffer</i></u>	<u><i>2,0 µl</i></u>
<i>A.dest</i>	<i>ad 20,0 µl</i>

Dieser Ligationsansatz wurde anschließend über Nacht bei 16°C inkubiert.

### 2.3.5.7 Transformation

Nach der Verknüpfung des Vektors mit dem DNA-Fragment wurde das Plasmid in kompetente *E.coli*-Zellen eingebracht. Dazu wurde der Ligationsansatz zu den kompetenten Bakterien gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock zur Aufnahme des Plasmids in die Bakterienzelle erfolgte bei 42°C für 45 s im Heizblock. Anschließend wurden die Zellen für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 300 µl LB-Medium (engl.: lysogeny broth medium), welches zuvor durch Autoklavieren sterilisiert wurde, erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37°C. Die Bakterien wurden anschließend auf vorgewärmte Agarplatten, welche Ampicillin (100 µg/ml) zur Selektion enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### LB-Agar

<i>LB-Medium</i>	1.000 ml
<i>Agar</i>	15 g

### 2.3.5.8 Plasmid-Minipräparation

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA und zur anschließenden Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung erfolgte eine Plasmid-Isolierung mit Hilfe des „NucleoSpin® Plasmid Transfection-grade“ Kits (Machery-Nagel, Düren), welches entsprechend den Herstellerangaben verwendet wurde. Für die Isolierung wurden zunächst Bakterienkulturen über Nacht in 2 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikazusatz) überimpft und bei 225 rpm und 37°C geschüttelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt und die Plasmide isoliert. Abschließend wurde die Plasmid-DNA in 30 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und die Konzentration mittels Photometer (Biophotometer Plus, Eppendorf, Hamburg) bestimmt.

In einem Restriktionsverdau (siehe 2.3.5.4) wurde die Aufnahme der Plasmide in die Bakterienzelle überprüft. Ausgewählte Klone wurden zur Sequenzierung (Seqlab, Göttingen) eingeschickt.

### 2.3.5.9 Plasmid-Medipräparation

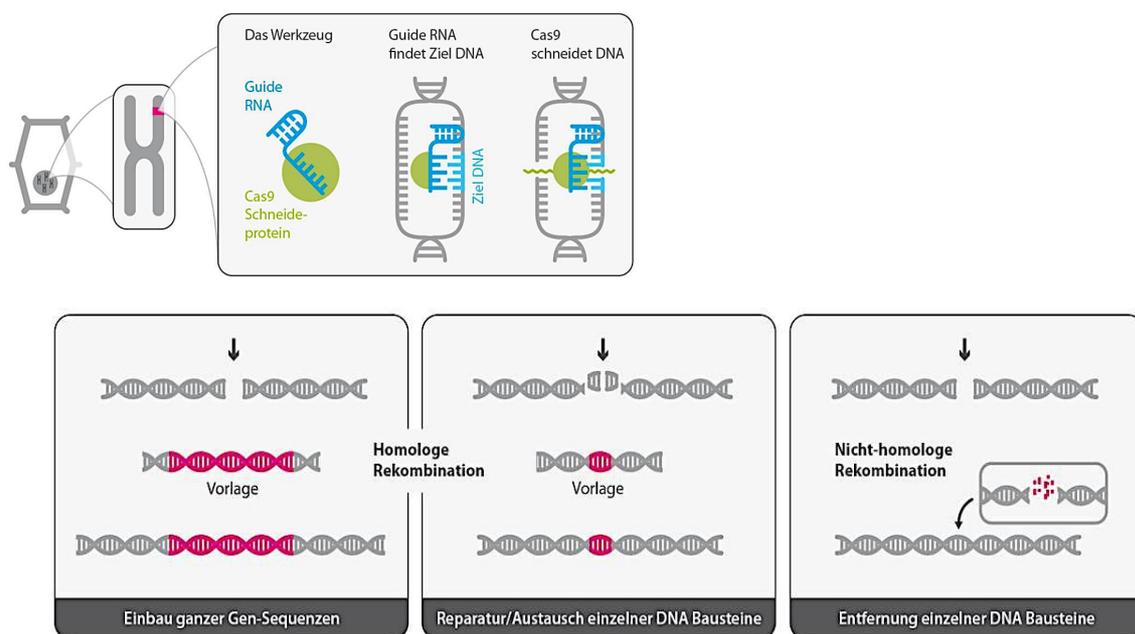
Nach einer erfolgreichen Klonierung erfolgte die Anreicherung der überprüften Plasmid-DNA. Dazu wurden 300 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz zur Selektion mit einem positiven Klon angeimpft und über Nacht

bei 37°C und 225 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die Plasmid-Medipräparation erfolgte mit Hilfe des „NucleoBond® XtraMedi“ Kits (Machery-Nagel, Düren) entsprechend den Herstellerangaben.

### 2.3.6 Genmodifizierung mittels CRISPR/Cas9-System (Genome Editing)

Mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems lassen sich Gene gezielt in das Genom einbringen, verändern oder inaktivieren. Dazu bindet zunächst die spezifische guide-RNA (gRNA) die Ziel-Sequenz des zu verändernden Gens. Anschließend schneidet das Cas9-Protein, eine CRISPR-assoziierte Endonuklease, den DNA-Doppelstrang an der gewünschten Stelle und mit Hilfe des zelleigenen Reparatursystems wird die gewünschte Genmodifikation durchgeführt (Abb. 2.4).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des „Guide-it™ CRISPR/Cas9-Systems“ (Takara, Japan) entsprechend den Herstellerangaben und der spezifischen gRNA  $5'ccggatcatcttcgcaattgtgatt-3'$ , welche über die Online-Plattform „DESKGEN™ CRISPR Libraries“ ausgewählt wurde, das ApoE-Gen in den murinen N9-Zellen gezielt inaktiviert.



**Abb. 2.4: Ablauf des CRISPR/Cas-Systems** übernommen von 187. Mit Hilfe einer gRNA und des Cas9-Proteins kann die Ziel-Sequenz gezielt erkannt und geschnitten werden. Durch zelleigene Reparatursysteme werden anschließend die gewünschten Genmodifikationen (Einbau, Austausch bzw. Entfernung von DNA-Bausteinen) durchgeführt.

### 2.3.7 Transduktion mit Hilfe lenti-assoziiierter Vektoren

Eine lentivirale Transduktion beschreibt die persistente Übertragung von genetischem Material mit Hilfe virus-assoziiierter Vektoren in eukaryontischen Zellen. In der vorliegenden Arbeit diente diese Methode der Überexpression der verschiedenen ApoE-Isoformen in den verwendeten Zelllinien. Hierzu erfolgte 48 h vor der Transduktion zunächst eine Aussaat von ca.  $2,5 \times 10^5$  N9- bzw. HEK293T-Zellen. Die Transduktion erfolgte anschließend in der „UKE Vector Core Facility“.

### 2.3.8 Massenspektrometrische Proteomik

Die Massenspektrometrie ist eine analytische Technik, bei welcher die zu analysierende Probe zunächst mittels Laser ionisiert und anschließend das Verhältnis zwischen Masse und Ladungszahl gemessen wird. Aus den Ergebnissen können in Abgleich mit verschiedenen Datenbanken die in der Probe enthaltenen Peptidsequenzen bestimmt werden<sup>272</sup>.

Zur Analyse der Proteinproben wurde zunächst eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, siehe 2.4.2) durchgeführt und die zu untersuchende Proteinbande ausgeschnitten. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte in der „UKE Core Facility Massenspektrometrische Proteomik“.

### 2.3.9 Edman-Sequenzierung

Um die Daten der massenspektrometrischen Analyse zu bestätigen und die genaue Sequenz des in der vorliegenden Arbeit untersuchten ApoE-Fragmentes zu identifizieren, wurde eine Edman-Sequenzierung durchgeführt. Bei der Edman-Sequenzierung erfolgt die Bestimmung der Reihenfolge von Aminosäuren in einem Peptid durch eine sich wiederholende Endgruppenbestimmung ausgehend vom N-terminalen Ende<sup>273</sup>. Für diese Sequenzierung wurde zunächst eine SDS-PAGE (siehe 2.4.2) durchgeführt, die aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) geblottet und mittels Comassie (Thermo Fisher Scientific, USA) angefärbt. Die spezifische Proteinbande wurde anschließend ausgeschnitten. Die Edman-Sequenzierung wurde von der Firma Alphalyse (Dänemark) durchgeführt.

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1 Proteinisolierung

Zur Proteinisolierung aus dem geernteten Zellmaterial wurde der folgende Ansatz verwendet:

#### Ansatz Proteinisolierung

<i>RIPA</i>	<i>90 <math>\mu</math>l</i>
<i>10 x Protease- und Phosphatase-Inhibitor</i>	<i>10 <math>\mu</math>l</i>
	<i>100 <math>\mu</math>l</i>

Mit Hilfe dieses Ansatzes wurde das Zellsediment resuspendiert und für 30 min bei 4°C und 25 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm (4°C). Der Überstand, welcher das zu isolierende Protein enthält, wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Bradford Assay (Thermo Fisher Scientific, USA) entsprechend den Herstellerangaben.

#### RIPA-Puffer (Lagerung bei 4°C)

<i>Tris (1 M, pH 7,2)</i>	<i>5 ml</i>
<i>NaCl (5 M)</i>	<i>3 ml</i>
<i>SDS (10%)</i>	<i>1 ml</i>
<i>Natriumdeoxycholat</i>	<i>1 g</i>
<i>Triton-X-100</i>	<i>1 ml</i>
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	<i>ad 100 ml</i>

### 2.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von isoelektrisch fokussierten Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld. Unter Verwendung von Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine zunächst denaturiert. Durch die entstehende negative Ladung wandern diese anschließend im elektrischen Feld zur Anode. Das Gel wurde nach der SDS-PAGE für den Western Blot verwendet. Die für die SDS-PAGE benötigten 1D-Gele wurden in einer speziellen Vorrichtung nach der folgenden Zusammensetzung vorbereitet:

**Tab. 2.16: Zusammensetzung der 1D-Gele**

Substanz	Sammelgel (4%)	Trenngel (8%)	Trenngel (12%)
Acrylamid (40%)	1,3 ml	2,66	4 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml	-	-
Trenngelpuffer	-	2,5 ml	2,5 ml
<i>A.dest</i>	6,1 ml	4,69 ml	3,35 ml
SDS (10%)	-	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl
APS (10%)	100 µl	100 µl	100 µl

Zuerst wurde die Kammer mit 7,5 ml Trenngel befüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und die Gelkammer bis zum oberen Rand mit Sammelgel befüllt. Zur Erstellung der Ladetaschen, in welche das Lysat pipettiert wird, wurden spezielle Kämme verwendet. Nachdem auch das Sammelgel polymerisiert war, konnte das Gel mit den Proben, welche zuvor mit 10 x Ladepuffer versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert wurden, beladen werden. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde zusätzlich ein Marker („Protein-Ladder“, Thermo Scientific, USA) mitgeführt. Die SDS-PAGE startete unter Verwendung von 1 x SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 60 V bis zum Erreichen der Front-Laufbande auf Höhe des Trenngels. Anschließend erfolgte eine Erhöhung der Spannung auf ca. 100 V.

#### Sammelgel-Puffer

*Tris (1,5 M)* 60,55 g  
*ddH<sub>2</sub>O* ad 1.000,00 ml

#### Trenngel-Puffer

*Tris (1,5 M)* 181,65 g  
*ddH<sub>2</sub>O* ad 1.000,00 ml

#### 10 x SDS-Laufpuffer

*Tris* 30 g  
*Glycin* 144 g  
*SDS (Pellets)* 10 g  
*ddH<sub>2</sub>O* ad 1.000 ml

### 2.4.3 Western Blot

Das Western Blot-Verfahren dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen nach einer erfolgreichen SDS-PAGE. Bei dieser Methode werden die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mit Hilfe des „Tank-Blot-Systems“ aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulose bzw. PVDF-Membran übertragen. Die Proteine konnten anschließend durch die Inkubation mit spezifischen primären und Fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörpern im „Odyssey<sup>®</sup> CLx“ (Licor, Bad Homburg) visualisiert werden.

Zu Beginn erfolgte die Äquillibrierung der Nitrozellulose-Membran und des Whatman<sup>®</sup>-Filterpapiers sowie des SDS-Gels in 1 x Transfer-Puffer. Bei der Verwendung einer PVDF-Membran ist zu beachten, dass diese zuvor durch Methanol aktiviert werden muss. Die elektrophoretische Übertragung der Proteine auf die Membran wurde bei konstanten 100 V für 60 min durchgeführt. Anschließend wurde die Membran zur Reduktion unspezifischer Banden für 60 min in 5%iger Milchlösung geblockt. Dann erfolgte die Inkubation mit einem spezifischen Primärantikörper in „Roti-Block“ (Licor, Bad Homburg) über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x TBS (Tris-gepufferte Salzlösung) für jeweils 20 min erfolgte die Inkubation der Membran mit einem fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper für 60 min. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal mit 1 x TBS gewaschen und anschließend im „Odyssey<sup>®</sup> CLx“ (Licor, Bad Homburg) visualisiert.

#### 1 x Transfer-Puffer

<i>Tris</i>	<i>5,82 g</i>
<i>Glycin</i>	<i>2,93 g</i>
<i>Methanol</i>	<i>200,00 ml</i>
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	<i>ad 1.000,00 ml</i>

#### 10 x TBS (pH 7,6)

<i>Tris</i>	<i>24,2 g</i>
<i>NaCl</i>	<i>80,0 g</i>
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	<i>ad 1.000 ml</i>

### **2.4.5 Immunpräzipitation (IP)**

Zur Anreicherung, Isolierung und Aufreinigung des spezifischen ApoE-Fragments, welches in der vorliegenden Arbeit identifiziert werden konnte, wurde mit dem isolierten Protein eine IP durchgeführt. Hierbei wird ein Ziel-Protein mittels eines spezifischen Antikörpers, welcher an ein Substrat gekoppelt ist, aus einem Lysat gebunden und entsprechend isoliert. Die IP wurde mit Hilfe des „Immunoprecipitation (IP) Kit“ (Thermo Fisher Scientific, USA) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.4.4 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)**

Zur Untersuchung einer putativen Bindung von ApoE an verschiedene Promotorbereiche auf genomischer DNA wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation durchgeführt. Hierbei wird zunächst die vorhandene Protein-DNA-Bindung mit Formaldehyd fixiert, das Chromatin isoliert und in Untereinheiten zerkleinert. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (hier gegen ApoE) kann anschließend das putative Protein mit der gebundenen DNA-Region isoliert und diese durch spezifische PCR nachgewiesen werden.

Das ChIP-Assay wurde mit  $6 \times 10^6$  Zellen mit Hilfe des „Agarose-ChIP“-Kits (Thermo Fisher Scientific, USA) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Auswertung des ChIP erfolgte mittels semiquantitativer PCR aus jeweils 10  $\mu$ l der entsprechenden Ansätze.

### **2.4.5 Subzelluläre Fraktionierung**

Zur Proteinisolierung aus spezifischen Zellkompartimenten wurde eine Fraktionierung mit Hilfe des „Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells“ (Thermo Fisher Scientific, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Analyse der verschiedenen Fraktionen erfolgte anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot.

## **2.5 Statistische Analyse von Daten**

Die statistischen Analysen wurden unter der Verwendung des Computerprogramms GraphPad Prism 5 (LaJolla, CA, USA) durchgeführt. Experimentelle Gruppen wurden unter Anwendung des Student-t-Tests miteinander verglichen. Die statistische Signifikanz wurde bei p-Werten  $<0,05$  (\*),  $<0,01$  (\*\*),  $<0,001$  (\*\*\*) festgelegt. Die Daten wurden unter Verwendung von GraphPad Prism 5 aufgezeichnet, welches den Standardfehler des Mittelwerts zeigt.

### 3. Ergebnisse

Die Analysen dieser Arbeit dienten zunächst der Charakterisierung des murinen ApoE in der Mikroglia-Zelllinie N9. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob ApoE die Migration von N9-Zellen regulieren kann. Anschließend wurde der Einfluss der verschiedenen humanen ApoE-Isoformen auf die Morphologie sowie Physiologie von N9-Zellen untersucht, welcher vermutlich zur Dysregulation des mikroglialen Phänotyps beitragen könnte. Abschließend wurde überprüft, ob ApoE als Genregulator die Expression verschiedener Gene beeinflussen kann und somit ebenfalls dazu in der Lage sein könnte den krankheitsassoziierten Phänotyp von Mikroglia-Zellen zu unterstützen.

#### 3.1 Charakterisierung des ApoE im murinen Zellsystem

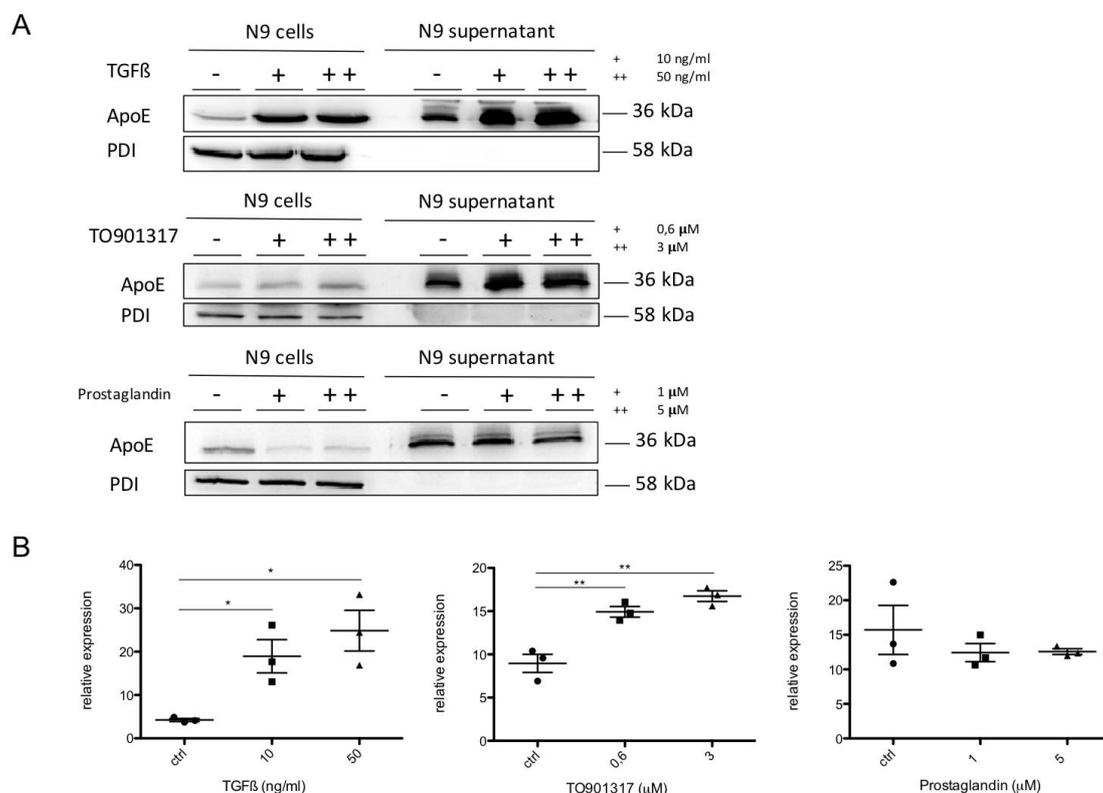
Zu Beginn dieser Arbeit erfolgte zunächst eine Untersuchung der Regulation sowie der Lokalisation des murinen ApoE, um dieses Protein in der verwendeten murinen N9-Mikroglia-Zelllinie für die anschließenden Versuche näher zu charakterisieren. Die murine Mikroglia-Zelllinie N9 teilt mehr phänotypische Eigenschaften mit primären Mikroglia-Zellen als die häufiger verwendete, von Ratten abgeleitete Zelllinie BV2<sup>132</sup>. Darüber hinaus ist die Menge an ApoE der N9-Zellen mit der von adulten Mikroglia-Zellen vergleichbar. In primären Mikroglia-Zellen, isoliert aus 0 - 1 Tag alten Maushirnen, ist das Expressionsniveau von ApoE im Vergleich zu adulten Mikroglia um das 20-fache höher<sup>132,186</sup>. Aus diesem Grund eignet sich die murine Zelllinie N9 sehr gut, um die Funktion von ApoE in Mikroglia-Zellen zu untersuchen.

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurde in Vorversuchen eine Toxizitätsbestimmung durchgeführt, um die geeigneten Konzentrationen der verwendeten Stimulatoren zu bestimmen. Anschließend erfolgte die Untersuchung der ApoE-Regulation mit Hilfe von Western-Blot-Analysen. Durch konfokale Mikroskopie konnte die Lokalisation bzw. vorhandene Koloalysationen von ApoE mit dem ER, dem Golgi-Apparat und den Lysosomen festgestellt werden. Die Durchführung von Scratch-Assays gab Aufschluss über das Migrationsverhalten der murinen N9-Mikroglia-Zelllinie.

### 3.1.1 Stimulus-abhängige Regulation der ApoE-Expression

Für die Bestimmung der Stimulus-abhängigen Regulation der ApoE-Expression im murinen Zellsystem wurden die N9-Zellen für 48 h mit verschiedenen potentiellen Stimulatoren (TGF $\beta$ , TO901317, Prostaglandin J<sub>2</sub>) behandelt. Da ApoE auch als Lipidtransporter von den Zellen sekretiert wird, wurde anschließend das isolierte Zelllysate sowie der Zellkulturüberstand mittels Western Blot analysiert.

Die Ergebnisse (Abb. 3.1) zeigen, dass die ApoE-Expression mit Hilfe von TGF $\beta$  und TO901317 stimuliert wird. Die signifikante Zunahme der Expression korreliert mit der steigenden Konzentration beider Stimulatoren. Darüber hinaus kann der Anstieg der ApoE-Expression sowohl im Zelllysate als auch im Zellkulturüberstand festgestellt werden. Die Behandlung der Zellen mit Prostaglandin J<sub>2</sub> führt hingegen zu einer nicht signifikanten Abnahme der ApoE-Expression. Die Verminderung der Proteinexpression innerhalb der Zellen kann durch eine ansteigende Konzentration von Prostaglandin J<sub>2</sub> von 1  $\mu$ M auf 5  $\mu$ M nicht verstärkt werden. Die hier gezeigten Ergebnisse demonstrieren, dass eine Stimulation bzw. Suppression der ApoE-Expression in murinen N9-Mikroglia-Zellen möglich ist.

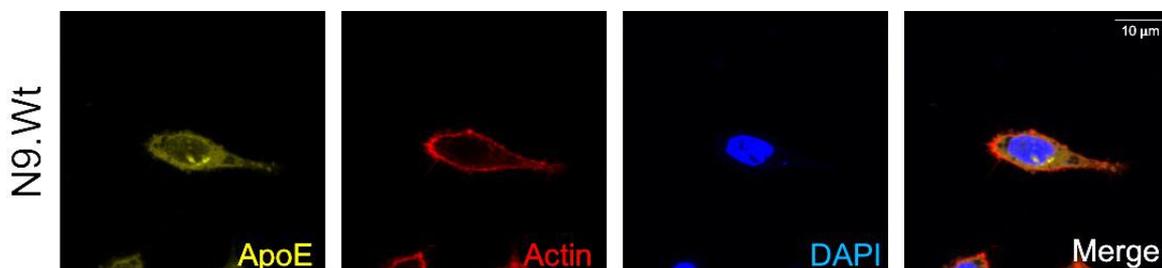


**Abb. 3.1: Stimulierung/Suppression der ApoE-Expression *in vitro*. (A) Western Blot-Analyse der Zelllysate und Zellkulturüberstände.** Unter Behandlung mit TGF $\beta$  bzw. TO901317 zeigt sich ein mit der Substanzenkonzentration korrelierender ApoE-Expressionsanstieg sowohl im Zelllysate als auch im Mediumüberstand. Die Behandlung mit Prostaglandin J<sub>2</sub> führt zu einer Expressionsabnahme (nicht signifikant) von ApoE. **(B) Quantifizierung der Proteinexpression in den Zelllysaten.** Die Quantifizierung zeigt einen signifikanten Anstieg der ApoE-Expression nach TGF $\beta$ - und TO901317-Behandlung. (n = 3, technische Triplikate)

### 3.1.2 Lokalisationsbestimmung des ApoE

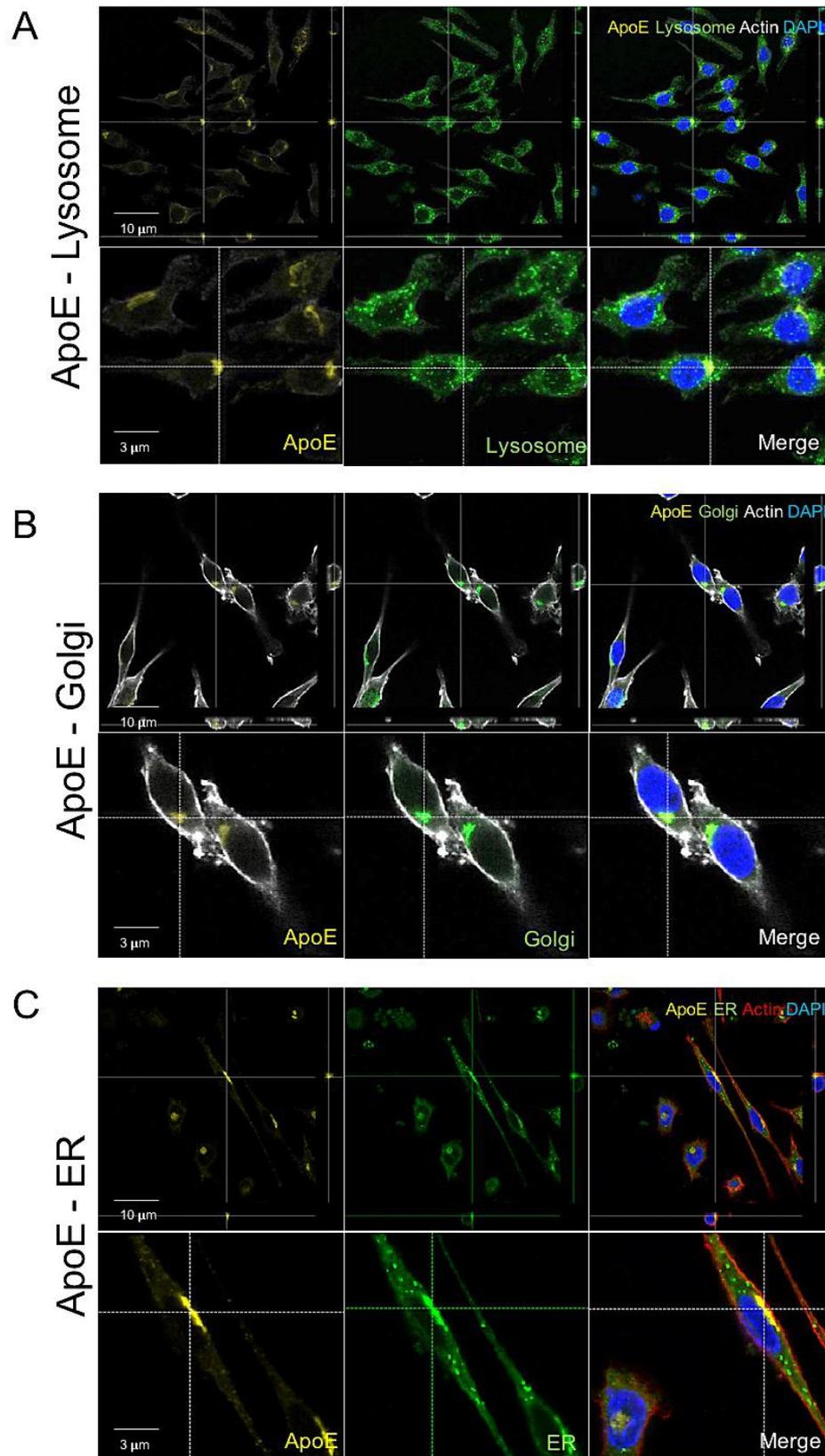
Für den Rückschluss auf Funktionen, welche durch ApoE innerhalb der Zelle beeinflusst werden könnten, ist die Lokalisation eines Proteins entscheidend. Zur Bestimmung der ApoE-Lokalisation innerhalb der N9-Mikroglia-Zellen wurden diese zunächst mit dem zuvor identifizierten ApoE-Stimulator TGF $\beta$  für 48 h behandelt und anschließend einer immunzytologischen Fluoreszenzfärbung unterzogen. Die Analyse der Fluoreszenzsignale wurde mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie durchgeführt.

Die in der Abbildung 3.2 gezeigte repräsentative mikroskopische Aufnahme zeigt, dass ApoE in der gesamten Zelle vorhanden ist. Bei genauerer Betrachtung fällt jedoch auf, dass sich vor allem im Bereich um den Zellkern und im zytoplasmatischen Raum ein Großteil der Gesamt-ApoE-Menge befindet (Abb. 3.2). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Kolo­kalisierung mit dem ER, dem Golgi-Apparat und/oder mit Lysosomen vermutet. Über den Golgi-Apparat werden die im ER synthetisierten Proteine für den weiteren Transport durch die Zelle vorbereitet. In den Lysosomen findet die Protein-Degradation statt<sup>211</sup>.



**Abb. 3.2: Lokalisationsbestimmung des ApoE in N9-Mikroglia-Zellen.** In der repräsentativen Aufnahme ist deutlich zu erkennen, dass sich ApoE (gelb) vor allem am Zellkern und im Zytoplasma befindet. Die stärkste Expression ist im Bereich um den Zellkern zu beobachten. Aufgrund dieser Ergebnisse wird eine Kolo­kalisierung mit dem ER, dem Golgi-Apparat und/oder mit Vesikeln (z.B. Lysosomen) vermutet. (repräsentative Abbildungen, n = 3)

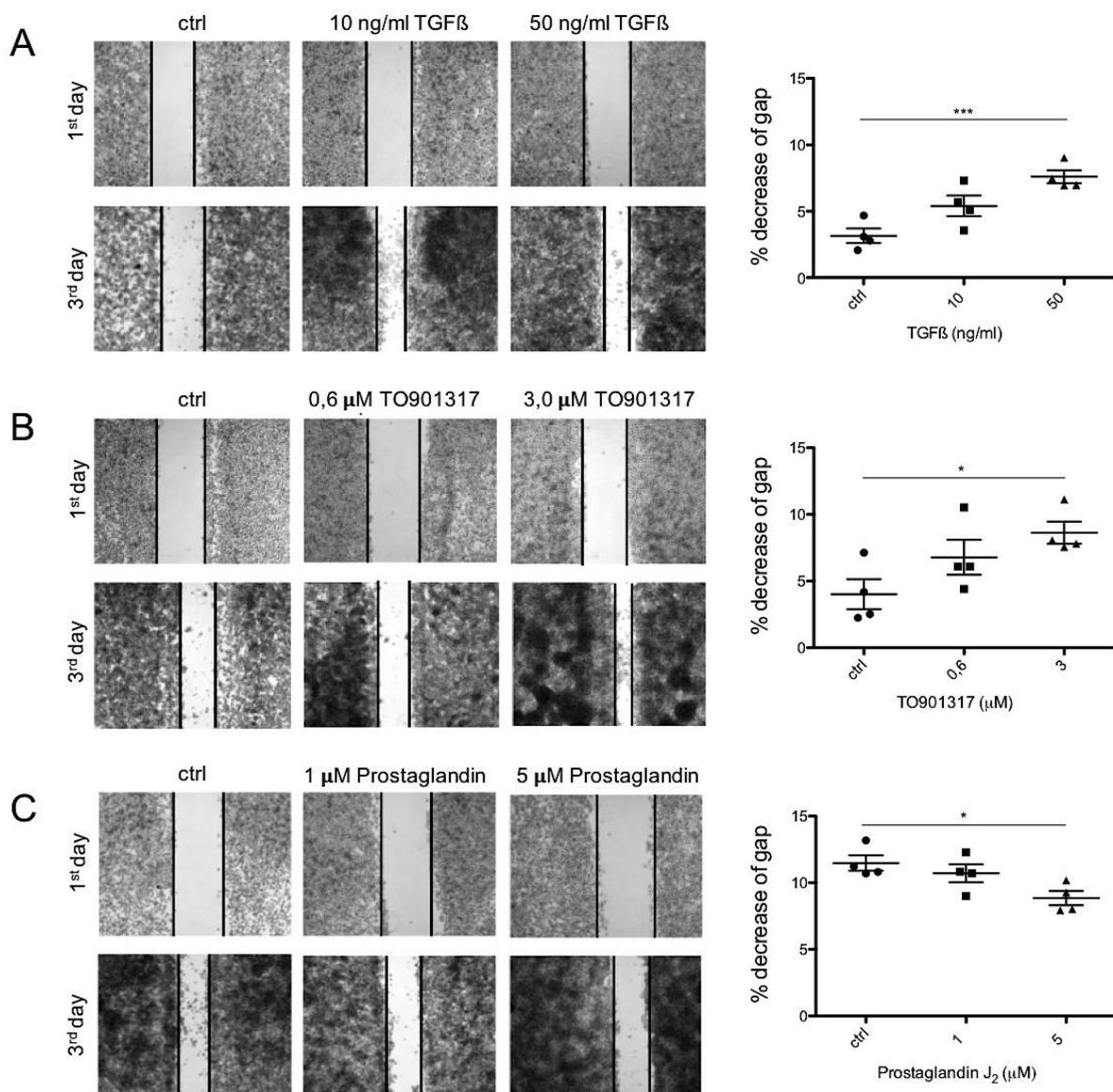
Zur Feststellung der Kolo­kalisierung zwischen ApoE und dem ER, dem Golgi-Apparat bzw. den Lysosomen wurden zunächst Doppelfärbungen durchgeführt, von denen anschließend z-stack-Aufnahmen angefertigt und mit Hilfe der „LAS AF Lite“ Software (Leica, Wetzlar) ausgewertet wurden. In der Abb. 3.3 A ist deutlich zu erkennen, dass ApoE (gelb) mit einigen Lysosomen (grün), jedoch nicht mit allen, kolo­kalisiert. Des Weiteren kann eine Kolo­kalisierung zwischen ApoE und dem Golgi-Apparat (Abb. 3.3 B) sowie mit dem ER (Abb. 3.3 C) durch die Übereinanderlagerung beider Fluorophore beobachtet werden. Somit konnte festgestellt werden, dass ApoE mit dem ER, dem Golgi-Apparat sowie teilweise mit den Lysosomen kolo­kalisiert.



**Abb. 3.3: Untersuchung der Kolokalisation von ApoE mit verschiedenen Kompartimenten in N9-Mikroglia-Zellen. (A) Kolokalisation mit Lysosomen.** Eine Kolokalisation mit ApoE und Lysosomen kann teilweise festgestellt werden, da nur einige Lysosomen mit ApoE übereinander gelagert sind (ApoE = gelb; Lysosomen = grün). **(B) Kolokalisation mit dem Golgi-Apparat.** Aufgrund der Übereinanderlagerung beider Fluorophore (ApoE = gelb; Golgi = grün) ist eine Kolokalisation zwischen ApoE und dem Golgi-Apparat vorhanden. **(C) Kolokalisation mit dem ER.** Es kann eine Kolokalisation mit dem ER (=grün) und ApoE (=gelb) festgestellt werden, da beide Fluorophore übereinander gelagert sind. (repräsentative Aufnahmen, n = 3)

### 3.1.3 Untersuchung der ApoE-abhängigen Zellmigration

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die Stimulation/Suppression der ApoE-Expression mittels TGF $\beta$ , TO901317 oder Prostaglandin J<sub>2</sub> zu einem veränderten Migrationsverhalten der N9-Mikroglia-Zellen führt. Die Migration ist kennzeichnend für aktivierte Mikroglia-Zellen und unterstützt darüber hinaus die Identifikation von Pathogenen und die daraus resultierende Aktivierung des Immunsystems<sup>103,104,105,106</sup>. Zur Untersuchung der Migration wurde ein Scratch-Assay unter Behandlung verschiedener Substanzen, die bereits im Teil 3.1.1 untersucht



**Abb. 3.4: Regulation des Migrationsverhaltens von N9-Mikroglia-Zellen *in vitro* durch Behandlung mit verschiedenen Stimulatoren.** Die Behandlung der N9-Mikroglia-Zellen mit zuvor untersuchten Stimulatoren beeinflusst deren Migrationsverhalten. Die Behandlung mit TGF $\beta$  (**A**) bzw. TO901317 (**B**) führt zu einer verstärkten Migration der Zellen. Diese korreliert mit dem Anstieg der Stimulatoren-Konzentration. Die Anwendung von Prostaglandin J<sub>2</sub> (**C**) bewirkt eine Suppression der Migration, welche ebenfalls mit dem Anstieg der Prostaglandin J<sub>2</sub>-Konzentration korreliert. Die Quantifizierung erfolgte jeweils nach dem dritten Tag der Beobachtung. (n = 4; 40-fache Vergrößerung)

wurden, durchgeführt. Die anschließende Analyse erfolgte mit Hilfe des Fiji-Plugins „MRI Wound Healing Tool“, mit welchem der prozentuale Unterschied des Fortschreitens der Zellbewegung zwischen dem ersten und dem dritten Tag der experimentellen Beobachtung berechnet wurde.

Die Behandlung der N9-Mikroglia-Zellen mit den Stimulatoren TGF $\beta$  und TO901317 führt zu einer Zunahme der Migration (Abb. 3.4 A, B), da der vorhandene Scratch im Vergleich zu den N9.Wt-Zellen durch gesteigerte Zellmotilität schneller geschlossen wird. Die Geschwindigkeit der Migration korreliert dabei mit dem Anstieg der Stimulatoren-Konzentration. Dieser Effekt ist im Vergleich beider Stimulatoren unter TO901317-Behandlung stärker ausgeprägt. Durch eine Inkubation der N9-Mikroglia-Zellen mit Prostaglandin J<sub>2</sub> ist eine Inhibierung der Migration zu beobachten (Abb. 3.4 C). Die verlangsamte Migration korreliert mit der zunehmenden Stimulatoren-Konzentration. Die Untersuchung des Migrationsverhaltens via Scratch-Assay zeigt, dass eine Beeinflussung der Motilität von N9-Mikroglia-Zellen *in vitro* durch verschiedene Stimulatoren möglich ist und direkt mit der ApoE-Expression korreliert.

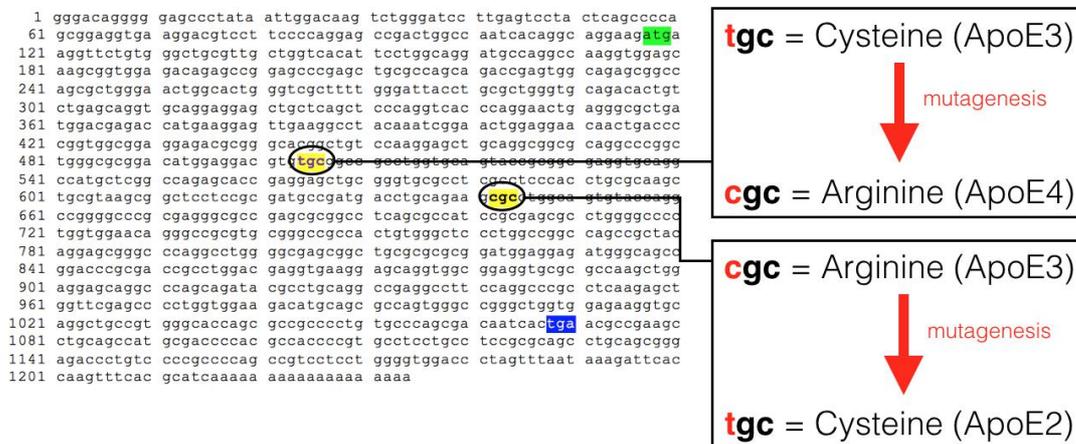
### **3.2 Untersuchung der humanen ApoE-Isoformen unter zell-, protein- und molekularbiologischen Aspekten**

Im ersten Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der ApoE-Expression durch verschiedene Stimulatoren, die Kolokalisation von ApoE mit verschiedenen Zellkompartimenten sowie das Migrationsverhalten der N9-Zellen untersucht. In diesem Ergebnisteil wurde der Einfluss der humanen ApoE-Isoformen, insbesondere der Isoform ApoE4, auf zell-, protein- sowie molekularbiologischer Ebene erforscht. Die Isoformen von ApoE unterscheiden sich in nur ein bis zwei Aminosäuren, was sich jedoch auf die Funktion des Proteins auswirken kann<sup>160</sup>. Für die Untersuchungen der Morphologie und Physiologie von Mikroglia-Zellen in Abhängigkeit von ApoE wurden zunächst die benötigten N9-Zelllinien (N9.ApoE2, N9.ApoE3, N9.ApoE4) mit ApoE-Isoform-spezifischer stabiler Expression hergestellt.

#### **3.2.1 ApoE-basierte Genmodifikation im murinen Zellsystem**

Um die Physiologie von Mikroglia-Zellen mit den humanen ApoE-Isoformen im Kontext der AD zu untersuchen, wurde zunächst das humane ApoE3-Gen (kommerziell erworbenes Plasmid pBabePuro-ApoECDs mit humanem ApoE3-Gen, Addgene, USA) mit Hilfe einer PCR zur Modifikation von Gensequenzen in das

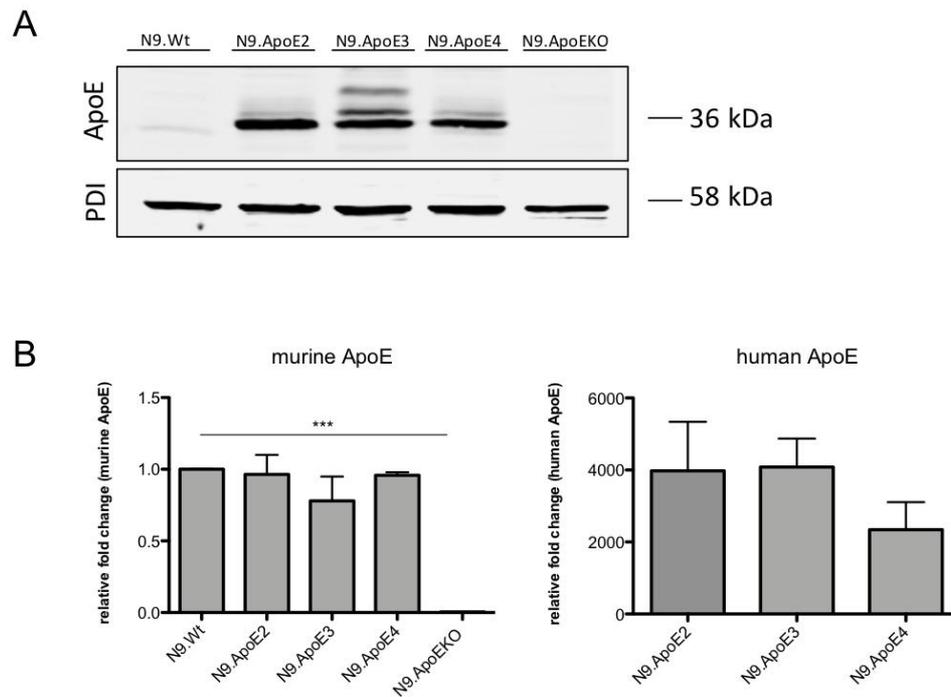
humane ApoE2- bzw. ApoE4-Gen umgewandelt (Abb. 3.5) und einer Aufreinigung unterzogen. Die aufgereinigten Amplifikate vom humanen ApoE2-, ApoE3- bzw. ApoE4-Gen wurden anschließend in murine N9-Mikroglia-Zellen mittels lentiviraler Transduktion (durchgeführt durch die „UKE Vector Core Facility“) stabil eingebracht.



**Abb. 3.5: ApoE-Nukleotidsequenz und Übersicht der ApoE3-Sequenzmodifikation.** Zur Herstellung des ApoE2- bzw. ApoE4-Gens aus dem vorhandenen ApoE3-Gen wurde eine Mutation mit Hilfe einer PCR und spezifischen Primern durchgeführt. Für die Umwandlung von ApoE3 zu ApoE4 musste das Cystein an Stelle 112 zu Arginin verändert werden. Die Genmutation von ApoE3 zu ApoE2 erfolgte durch die Umwandlung von Arginin an Stelle 158 zu Cystein. (grün = Startcodon atg; blau = Stoppcodon tga; gelb = zu modifizierende Codons)

Die Expression der verschiedenen ApoE-Isoformen wurde mittels Western Blot und qPCR überprüft (Abb.: 3.6). Die Untersuchung der Protein-Expression zeigt eine deutliche Mengenzunahme der spezifischen ApoE-Isoformen in N9.ApoE2, N9.ApoE3 und N9.ApoE4 im Vergleich zu den N9.Wt-Zellen (Abb. 3.6 A). Die Ergebnisse der qPCR zur Bestimmung der RNA-Expressionslevel (Abb. 3.6 B) machen deutlich, dass in allen Zelllinien das endogene murine ApoE-Gen produziert wird, wohingegen die humane Form von ApoE nur in den transduzierten N9-Zellen hergestellt wird. Die Resultate zeigen unverkennbar, dass die lentivirale Transduktion zur Expression der verschiedenen humanen ApoE-Isoformen in N9-Zellen erfolgreich war. Darüber hinaus zeigen alle drei Zelllinien ein vergleichbares ApoE-Expressionslevel.

Um die ApoE-spezifische Regulation der Physiologie in Mikroglia-Zellen präziser zu demonstrieren, wurde das murine ApoE-Gen in den N9-Zellen nach Etablierung des CRISPR-Cas9-Systems als Kontrolle zu den N9.ApoE2/3/4-Zellen gezielt ausgeschaltet. Dies ist sowohl auf Protein- (Abb. 3.6 A) als auch auf RNA-Ebene (Abb. 3.6 B) sehr gut zu erkennen, da keinerlei ApoE-Expression in den N9.ApoEKO-Zellen vorliegt.

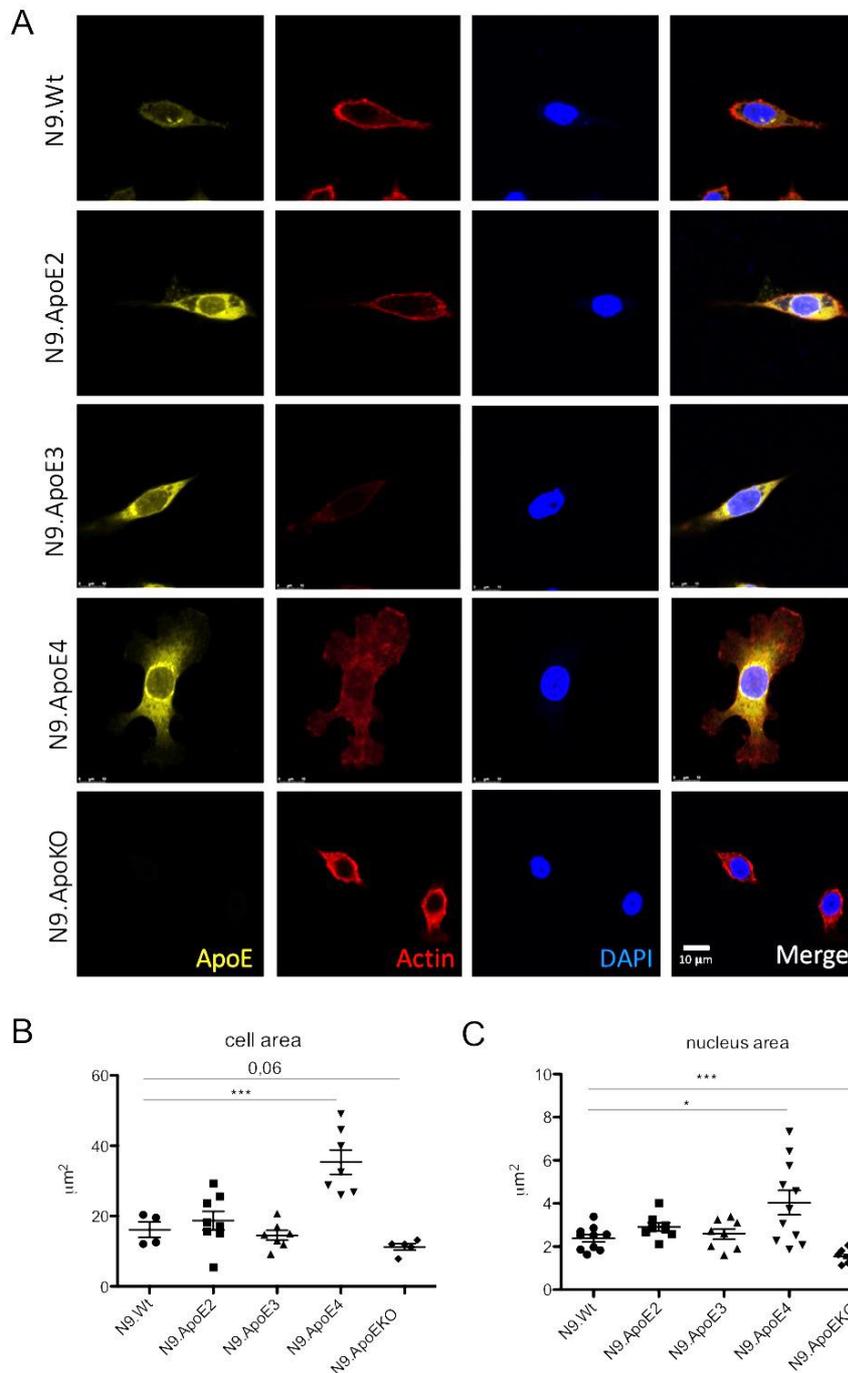


**Abb. 3.6: Expression von ApoE2/3/4 und ApoE-Knockout in murinen N9-Zellen. (A) Proteinbiochemische Analyse mittels Western Blot.** Es ist eine deutliche Expression von humanem ApoE in N9.ApoE2/3/4 im Vergleich zu N9.Wt-Zellen zu erkennen. N9.ApoEKO-Zellen weisen keine ApoE-Expression auf. PDI diente als Ladekontrolle **(B) RNA-Expressions-Analyse mittels qPCR.** Die Ergebnisse aus A werden bestätigt. Es zeigt sich eine signifikante und vergleichbare RNA-Expression von humanem ApoE2/3/4. Des Weiteren ist keine murine ApoE-Expression bei N9.ApoEKO zu erkennen. (n = 3, technische Triplikate)

### 3.2.2 ApoE-abhängige Regulation der Zellmorphologie bzw. der Aktin-Zytoskelett-Reorganisation

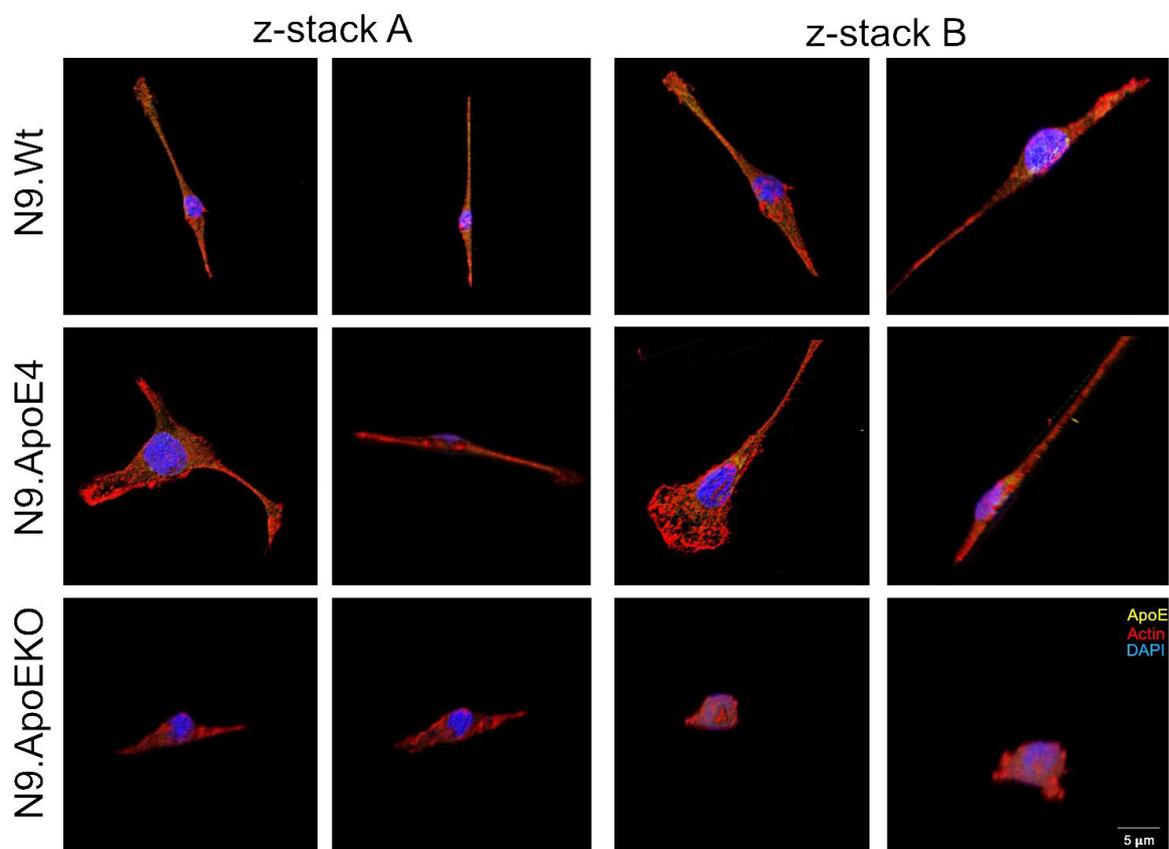
Die Zellmorphologie beeinflusst viele physiologische Prozesse, z.B. die Migration<sup>227,228</sup>. Daher ist deren Regulation für die Zelle von enormer Bedeutung. Um zu untersuchen, ob die humanen ApoE-Isoformen differentiell die Morphologie von Mikroglia-Zellen beeinflussen, wurden die zuvor erstellten Zelllinien zunächst auf eine ApoE-Isoform spezifische Morphologie untersucht. Die in Abbildung 3.7 gezeigten repräsentativen Bilder der konfokalen Mikroskopie zeigen eine Veränderung der Zellform spezifisch bei N9.ApoE4- sowie bei N9.ApoEKO-Zellen im Vergleich zu N9.ApoE2-, N9.ApoE3- und N9.Wt-Zellen. Viele der N9.ApoE4-Zellen zeigen eine signifikant größere Zell- sowie Nukleusfläche im Vergleich zu den N9.Wt-Zellen (Abb. 3.7 B, C). Darüber hinaus besitzen N9-Zellen mit ApoE4-Expression ausgeprägte Aktin-Stress-Fasern (Abb. 3.7 A). Die in Nicht-Muskel-Zellen vorkommenden Aktin-Stress-Fasern bestehen aus kontraktile Aktin- und Myosinbündeln sowie verschiedenen Vernetzungsproteinen. Diese Stressfasern spielen durch die hervorgerufene zelluläre Kontraktilität vor allem bei der

Zelladhäsion, der Migration und bei der Morphogenese eine wichtige Rolle<sup>188</sup>. Im Vergleich zu der Morphologie der N9.Wt-Zellen zeigen N9.ApoEKO-Zellen eine Abnahme in ihrer Zell- und Nukleusfläche. (Abb. 3.7 B, C).



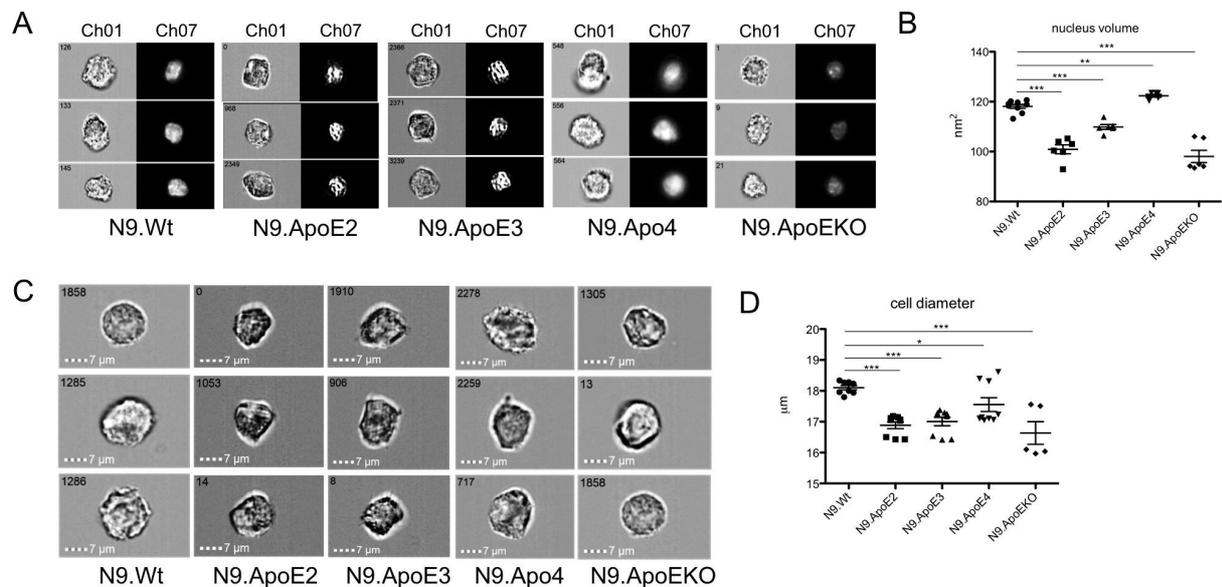
**Abb. 3.7: Morphologische Veränderungen nach Expression von humanen ApoE-Isoformen bzw. ApoE-Knockout. (A) Konfokale Mikroskopie der zuvor hergestellten N9-Mikroglia-Zelllinien.** In der konfokalen Mikroskopie zeigt sich eine Veränderung der Morphologie bei N9.ApoE4- und N9.ApoEKO- im Vergleich zu N9.Wt-Zellen. **(B), (C) Quantifizierung der Zell- und Nukleusfläche.** Zellen mit ApoE4-Überexpression zeigen eine signifikante Zunahme der Zell- sowie der Nukleusfläche. Der Knockout von ApoE führt hingegen zu einer Abnahme der Zellfläche. Der Zellkern ist im Vergleich zu den anderen Zelllinien bei N9.ApoEKO-Zellen kompensierter. (n = 5)

Um die Morphologie von N9.ApoE4- und N9.ApoEKO-Zellen näher zu spezifizieren, wurden mit Hilfe von z-stack-Aufnahmen mittels konfokaler Mikroskopie 3D-Rekonstruktionen erstellt (Abb. 3.8). Hierbei fällt auf, dass N9.ApoE4-Zellen eine ausgeprägte diskoidale Zellform im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien besitzen und sich das Zellvolumen zumeist über eine große Fläche erstreckt. Des Weiteren zeigt sich erneut eine ausgeprägte Vergrößerung des Zellkerns. N9.ApoEKO-Zellen zeigen eine ähnliche Morphologie wie N9.Wt-Zellen, jedoch ist das Zellvolumen wie auch das Volumen des Zellkerns stark verkleinert. Darüber hinaus können keine ausgeprägten Aktin-Stress-Fasern wie bei N9.ApoE4-Zellen beobachtet werden.



**Abb. 3.8: Untersuchung der Zellmorphologie mit Hilfe von 3D-Rekonstruktionen (repräsentative Aufnahmen).** Es zeigt sich deutlich die diskoidale Morphologie sowie eine Vergrößerung des Zell- und Nukleusvolumens der N9.ApoE4- im Vergleich zu N9.Wt-Zellen. N9.ApoEKO-Zellen zeigen eine verkleinerte Zellform und einen stark kompensierten Zellkern.

Zur weiteren Analyse der Zellen wurde die Morphologie mit Hilfe der bildgebenden Durchflusszytometrie untersucht (Abb. 3.9). Das Volumen des Nukleus zeigt erneut eine signifikante Zunahme bei N9.ApoE4- und eine signifikante Abnahme bei N9.ApoEKO-Zellen im Vergleich zu N9.Wt-Zellen. Des Weiteren wurde eine signifikante Abnahme des Zelldurchmessers bei N9.ApoEKO-Zellen beobachtet.



**Abb. 3.9: Untersuchung der Morphologie mittels bildgebender Durchflusszytometrie. (A), (B) Analyse und Quantifizierung des Nucleusvolumens.** In den repräsentativen Abbildungen der bildgebenden Durchflusszytometrie kann eine signifikante Zunahme des Zellkernvolumens bei N9.ApoE4-Zellen beobachtet werden. Das Volumen des Nucleus von N9.ApoEKO-Zellen ist entsprechend den Erwartungen im Vergleich zu N9.Wt-Zellen signifikant verkleinert. Das Nucleusvolumen von N9.ApoE2 sowie von N9.ApoE3 ist ebenfalls signifikant verkleinert. Die Quantifizierung bestätigt diese Ergebnisse. (A: Ch01 = Durchlicht; Ch07 = DAPI; 40 x Vergrößerung) (n = 3, technische Triplikate) (C), (D) **Messung des Zelldurchmessers mit Hilfe der bildgebenden Durchflusszytometrie.** Es kann eine signifikante Abnahme des Zelldurchmessers bei N9.ApoEKO- im Vergleich zu N9.Wt-Zellen festgestellt werden. Die Quantifizierung bestätigt die Ergebnisse. (n = 5, technische Duplikate)

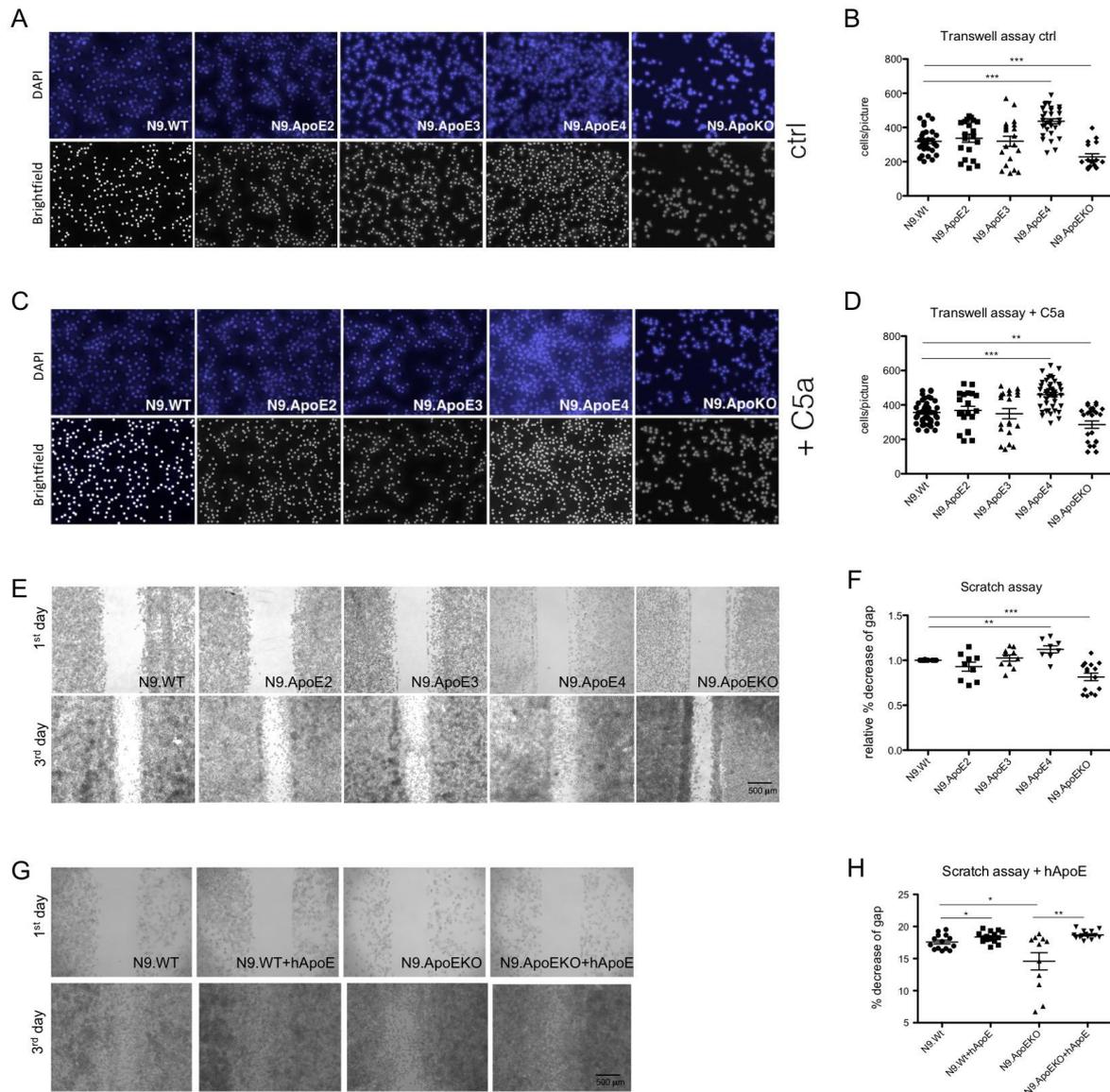
### 3.2.3 Untersuchung des Migrationsverhaltens von murinen Mikroglia-Zellen in Abhängigkeit der humanen ApoE-Isoformen

Aufgrund der veränderten Morphologie bei N9.ApoE4- und N9.ApoEKO-Zellen und der enormen Bedeutung der Motilität für Mikroglia-Zellen wurde in dieser Arbeit ein verändertes Migrationsverhalten dieser Zellen postuliert und anschließend untersucht.

Für die Analyse der Migration *in vitro* wurde zunächst ein Transwell-Assay ohne chemotaktischen Stimulus durchgeführt. Die Quantifizierung der durch die Membran gewanderten Zellen zeigt eine signifikante Zunahme der Migration bei N9.ApoE4- und eine signifikante Abnahme der Zellmotilität bei N9.ApoEKO-Zellen im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien (Abb. 3.10 A, B).

Die Wiederholung des Experiments mit dem chemotaktischen Stimulus C5a (20 ng/ml) führt zu analogen Ergebnissen (Abb. 3.10 C, D). Durch den Stimulus C5a kann eine allgemeine Zunahme der Migration aller Zelllinien unabhängig von der ApoE-Isoform festgestellt werden, die auf den chemotaktischen Stimulus zurückzuführen ist. Darüber hinaus kann erneut eine Zunahme der Migration von N9.ApoE4- und eine Abnahme der Motilität bei N9.ApoEKO-Zellen beobachtet

werden. Die Ergebnisse zeigen, dass ApoE4 die Migration von N9-Mikroglia-Zellen beschleunigt und eine generelle Zunahme der Zellmotilität durch die Zugabe von C5a (20 ng/ml) als chemotaktischen Stimulus erreicht werden kann.



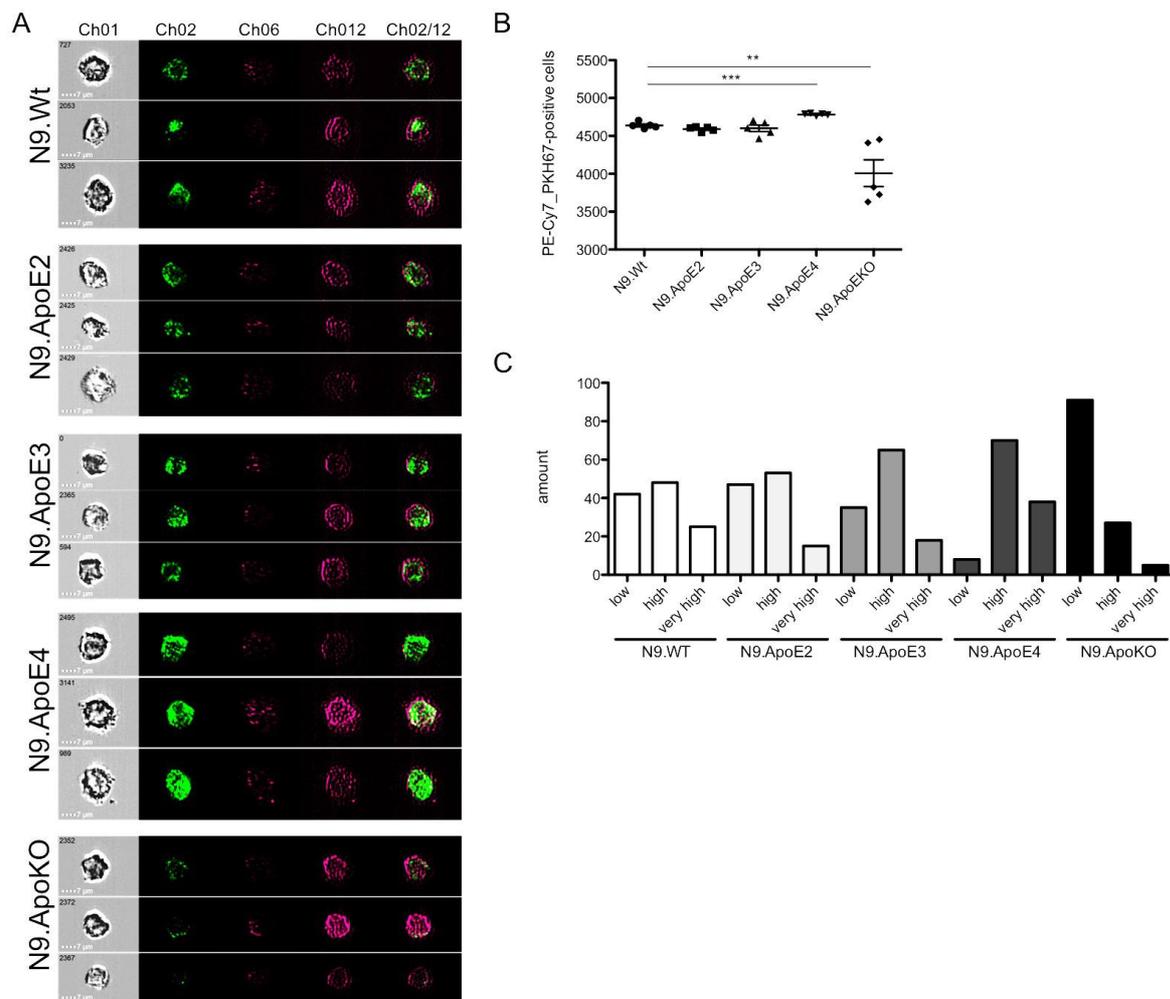
**Abb. 3.10: ApoE-abhängiges Migrationsverhalten von N9-Mikroglia-Zellen *in vitro*. (A-D) Transwell-Assay mit bzw. ohne chemotaktischen Stimulus (C5a). Die Ergebnisse des Transwell-Assays zeigen eine signifikante Zunahme der Migration bei N9.ApoE4- und eine signifikante Abnahme der Motilität bei N9.ApoEKO-Zellen sowohl ohne (A, B) als auch mit chemotaktischen Stimulus (C5a, 20 ng/ml) (C, D). Es ist eine generelle Zunahme der Migration aller Zelllinien unabhängig von der ApoE-Isoform unter Behandlung mit C5a zu beobachten. Die Quantifizierung (B, D) bestätigt diese Beobachtungen (n = 6) (E-H) Scratch-Assay zur Untersuchung der Migration von N9-Mikroglia-Zellen *in vitro*. Die Ergebnisse des Scratch Assays bestätigen die Resultate des Transwell Assays. Es zeigt sich erneut eine signifikante Zunahme der Migration bei N9.ApoE4- im Vergleich zu N9.Wt-Zellen (E, F). Ebenfalls ist eine Abnahme der Zellmotilität bei N9.ApoEKO-Zellen zu beobachten. Dieser Effekt kann durch eine Behandlung mit humanem ApoE (3 µg/ml) aufgehoben werden (G, H). (n = 7)**

Die Ergebnisse des Transwell-Assays können mit Hilfe eines Scratch-Assays bestätigt werden. Im Vergleich zu N9.Wt- kann eine signifikante Zunahme der Zellmotilität bei N9.ApoE4-Zellen festgestellt werden (Abb. 3.10 E, F). Abermals zeigt sich eine signifikante Abnahme der Migration bei N9.ApoEKO- im Vergleich zu N9.Wt-, N9.ApoE2- und N9.ApoE3-Zellen. Dieser Effekt kann durch eine Behandlung mit humanem ApoE (5 µg/ml im Zellkulturmedium) aufgehoben werden (Abb. 3.10 G, H). Die Ergebnisse bestätigen die Resultate des Transwell-Assays und zeigen erneut eine ApoE-Isoform-abhängige Regulation der Migration bei Mikroglia-Zellen *in vitro*, wobei die Expression der Isoform ApoE4 zu einer verstärkten Zellmotilität führt.

### **3.2.4 ApoE-Isoform-abhängige Veränderung der Phagozytose von Mikroglia-Zellen *in vitro***

Die Phagozytose ist eine Hauptaufgabe von Mikroglia-Zellen und für die Gewebehomöostase im Gehirn von großer Bedeutung. Durch die Identifizierung und Aufnahme von Pathogenen unterstützen Mikroglia die Aktivierung von Immunreaktionen. Des Weiteren phagozytieren sie aggregierte Proteine sowie apoptotische bzw. geschädigte Zellen<sup>98,110</sup>.

Zur Untersuchung des Einflusses der ApoE-Isoformen auf die Phagozytose wurde die Aufnahme von apoptotischen Neuro2a-Zellen durch N9-Mikroglia mittels bildgebender Durchflusszytometrie analysiert. Fluoreszenz-markierte N9.ApoE4-Zellen zeigen eine verstärkte Aufnahme von apoptotischem Zellmaterial im Vergleich zu N9.Wt-, N9.ApoE2- und N9.ApoE3-Zellen, während bei N9.ApoEKO-Zellen eine signifikante Verminderung der Phagozytose beobachtet werden kann (Abb. 3.11 A, B). Darüber hinaus wurde die Menge und Größe an aufgenommenen Zelltrümmern quantifiziert. Hier zeigt sich, dass N9.ApoE4- mengenmäßig mehr und bevorzugt größere Fragmente aufnehmen als N9.Wt-Zellen. Zellen mit ApoE-Knockout phagozytieren vergleichsweise weniger und vorwiegend kleinere Zellfragmente als die anderen untersuchten Zelllinien (Abb. 3.11 C). Die hier ermittelten Ergebnisse zeigen eine ApoE4-spezifische Verstärkung der Phagozytose von N9-Mikroglia-Zellen *in vitro*. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die ApoE-abhängige Regulation der Physiologie von Mikroglia-Zellen. Neben der Zell- und Nukleusgröße, der Morphologie sowie der Migration, wird auch die Phagozytose von ApoE, insbesondere der Isoform ApoE4, beeinflusst.



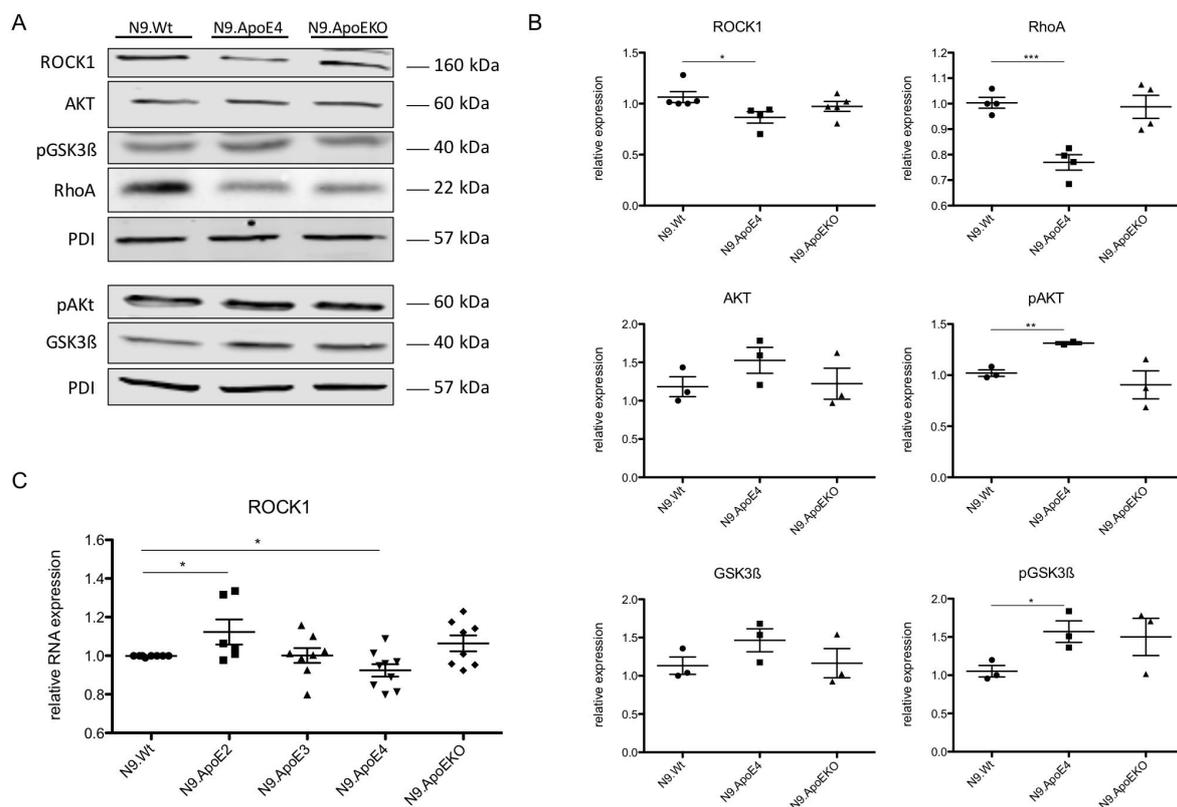
**Abb. 3.11: Untersuchung der ApoE-Isoform-abhängigen Phagozytoseeigenschaften bei N9-Mikroglia-Zellen mittels bildgebender Durchflusszytometrie. (A), (B) Repräsentative Aufnahmen und Quantifizierung.** Die Ergebnisse zeigen durch eine stärkere Fluoreszenz des Ch02 eine signifikante Zunahme der Phagozytose bei N9.ApoE4-Zellen sowie durch eine schwächere Fluoreszenz im Ch02 eine signifikante Abnahme bei N9.ApoEKO- im Vergleich zu N9.Wt-Zellen. (Ch1 = Durchlicht, Ch02 = apoptotische Neuro2a-Zellen/Zellfragmente (PKH67-Färbung), Ch06 = Side Scatter, Ch12 = N9-Mikroglia (PE-Cy7-Färbung), Ch02/12 = Merge) (n = 3, technische Duplikate). Die Quantifizierung bestätigt diese Beobachtungen. **(C) Quantifizierung der Menge und Größe aufgenommener Zellfragmente.** N9.ApoE4-Zellen nehmen mengenmäßig mehr und größere Zellfragmente auf als die anderen untersuchten Zelllinien, welche weniger und kleinere Fragmente aufnehmen (low = kleine Fragmente; high = große Fragmente; very high = sehr große Fragmente). (n = jeweils 100 Zellen)

### 3.2.5 Untersuchung relevanter Proteine in der Regulation der ApoE-abhängigen Morphologie, Migration und Phagozytose in murinen N9-Mikroglia-Zellen

Um Schlüsselproteine zu identifizieren, welche zu einer veränderten Morphologie, Migration bzw. Phagozytose von N9-Mikroglia-Zellen führen, wurde nach ausführlicher Literaturrecherche die Expression von ROCK1 (engl.: rho-associated coiled-coil containing kinases 1) untersucht. ROCK1 ist unter anderem ein Schlüsselprotein im Signaltransduktionsweg der Migration, der Phagozytose sowie der Aktin-Zytoskelett-Reorganisation<sup>235</sup>. Studien haben gezeigt, dass der Knockout

von ROCK1 zu einer gesteigerten Migration bei Makrophagen und neutrophilen Granulozyten führt<sup>189</sup>. Die Rolle von ROCK1 in Mikroglia-Zellen ist bis zum heutigen Zeitpunkt unbekannt.

Mit Hilfe von Proteinexpressionsanalysen wurde eine Abnahme der ROCK1- sowie der RhoA (engl.: ras homolog gene family, member A) - Menge, einem Aktivator von ROCK1, in N9.ApoE4 im Vergleich zu N9.Wt-Zellen beobachtet. Des Weiteren zeigt sich eine signifikante Zunahme der Expression von pAKT (Phospho-Proteinkinase B) sowie pGSK3 $\beta$  (Phospho-Glykogensynthase-Kinase 3) in Zellen mit ApoE4-Expression (Abb. 3.12 A, B). Diese zwei Signalproteine konzentrieren sich bei Suppression von ROCK1 innerhalb der Zelle<sup>189</sup>. Die Abnahme der ROCK1-Expression kann des Weiteren auf Ebene der RNA-Expression bestätigt werden (Abb. 3.12 C). Diese Resultate geben einen ersten Hinweis auf die ApoE-abhängige Regulation der Migration, der Phagozytose sowie der Aktin-Zytoskelett-Reorganisation über den RhoA/ROCK1-Signaltransduktionsweg.



**Abb. 3.12: Identifizierung von Effektorproteinen in der ApoE-abhängigen Regulation der Morphologie, Migration und Phagozytose. (A), (B) Proteinexpressionsanalyse mittels Western Blot.** Es wurde eine Abnahme der Expression von ROCK1 und RhoA in N9.ApoE4- im Vergleich zu N9.Wt-Zellen festgestellt. Des Weiteren ist eine Zunahme der Expression von pAKT und pGSK3 $\beta$  in N9.ApoE4- im Vergleich zu N9.Wt-Zellen zu beobachten. Die Quantifizierung bestätigt diese Ergebnisse. PDI diente als Ladekontrolle (n = 3, technische Triplikate) **C: RNA-Expressionsanalyse mittels qPCR.** Die Abnahme der RNA-Expression in N9.ApoE4- im Vergleich zu N9.Wt- und N9.ApoE2/3-Zellen bestätigt die Ergebnisse der Proteinexpressionsanalyse. (n = 3, technische Triplikate)

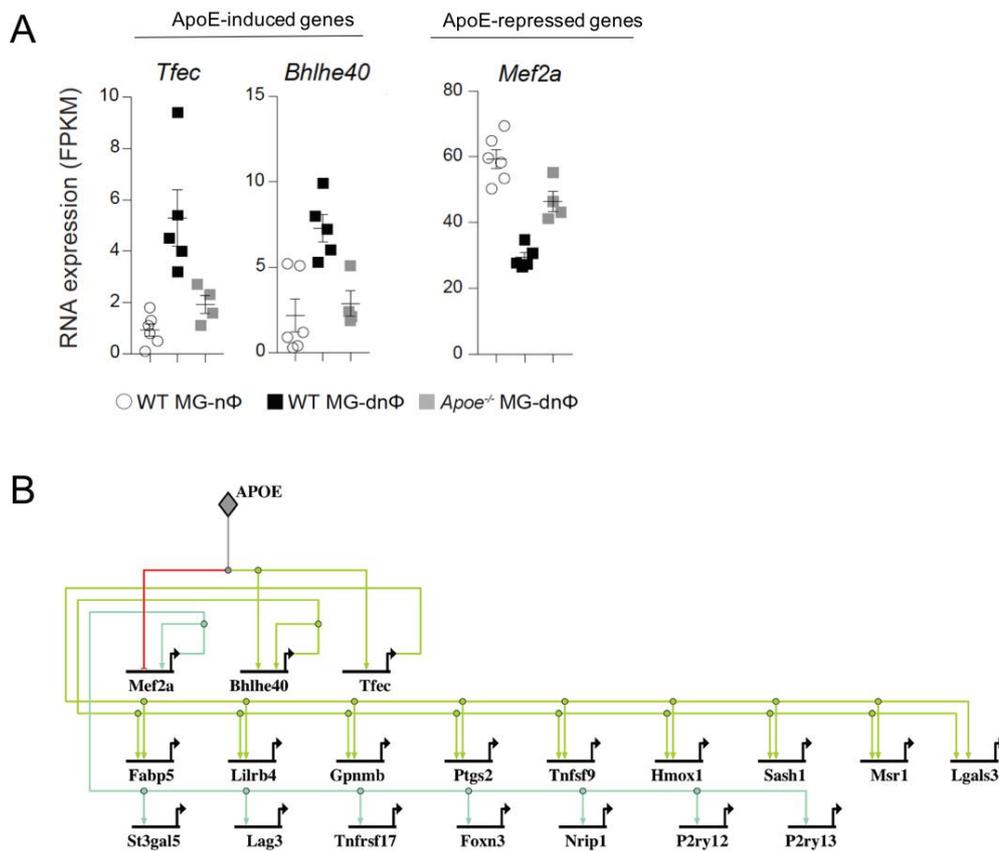
### 3.3 ApoE als Genregulator

Auf Grundlage von Ergebnissen vorangegangener Studien<sup>2</sup> wurde eine Genregulation durch ApoE auf transkriptionaler Ebene postuliert. Dieser Aspekt ist von Bedeutung, da ApoE als Transkriptionsfaktor in Mikroglia-Zellen eine Vielzahl an weiteren Prozessen beeinflussen könnte, insbesondere die Ausbildung des dysregulierten Phänotyps. Theendakara *et al.* konnten bereits zeigen, dass ApoE mit hoher Affinität an doppelsträngige DNA bindet<sup>190</sup>. Die Rolle von ApoE als Transkriptionsfaktor wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von ChIP-Analysen und Luciferase-Assays überprüft. Darüber hinaus konnte ein intrazelluläres ApoE-Fragment identifiziert werden, welches als potentieller Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Gene beeinflussen könnte. Die Funktion von ApoE als Transkriptionsfaktor zu fungieren, könnte einen neuen Blick auf die Rolle dieses Proteins in der Pathogenese der AD werfen.

#### 3.3.1 Verifizierung möglicher ApoE-regulierter Gene

In vorangegangenen Studien konnte die ApoE-abhängige Regulation wichtiger Proteine in Mikroglia-Zellen mit neurodegenerativen Phänotyp gezeigt werden<sup>2</sup>. Mit Hilfe von RNA-Screenings wurden zunächst phagozytierende Mikroglia mit ApoE-Knockout im Vergleich zu phagozytierenden Wt-Zellen untersucht. Dabei wurde ein ApoE-spezifisches Genexpressionsmuster identifiziert und resultierend daraus putative ApoE-Regulationskaskaden abgeleitet (Abb. 3.13 B). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden anschließend durch RNA-Expressionsanalysen überprüft, bei welchen eine Reihe von Genen identifiziert werden konnten, die ApoE-abhängig inhibiert bzw. aktiviert werden (Abb. 3.13 A). Des Weiteren konnte Mef2a bereits als vermutlich bedeutender Faktor in der Aktivierung von murinen Mikroglia-Zellen nach Virusinfektion identifiziert werden (siehe Anhang A2).

Da aufgrund der Analysen Mef2a (engl.: myocyte enhancer factor 2A), Bhlhe40 (engl.: basic helix-loop-helix family member E40) und Tfec (engl.: transcription factor EC) als Schlüsseltranskriptionsfaktoren für die ApoE-Regulation eines umfangreichen Panels weiterer Gene, die in der Homöostase von Mikroglia-Zellen eine wichtige Rolle spielen, identifiziert wurden, sind diese Bestandteil der im Folgenden beschriebenen Experimente.



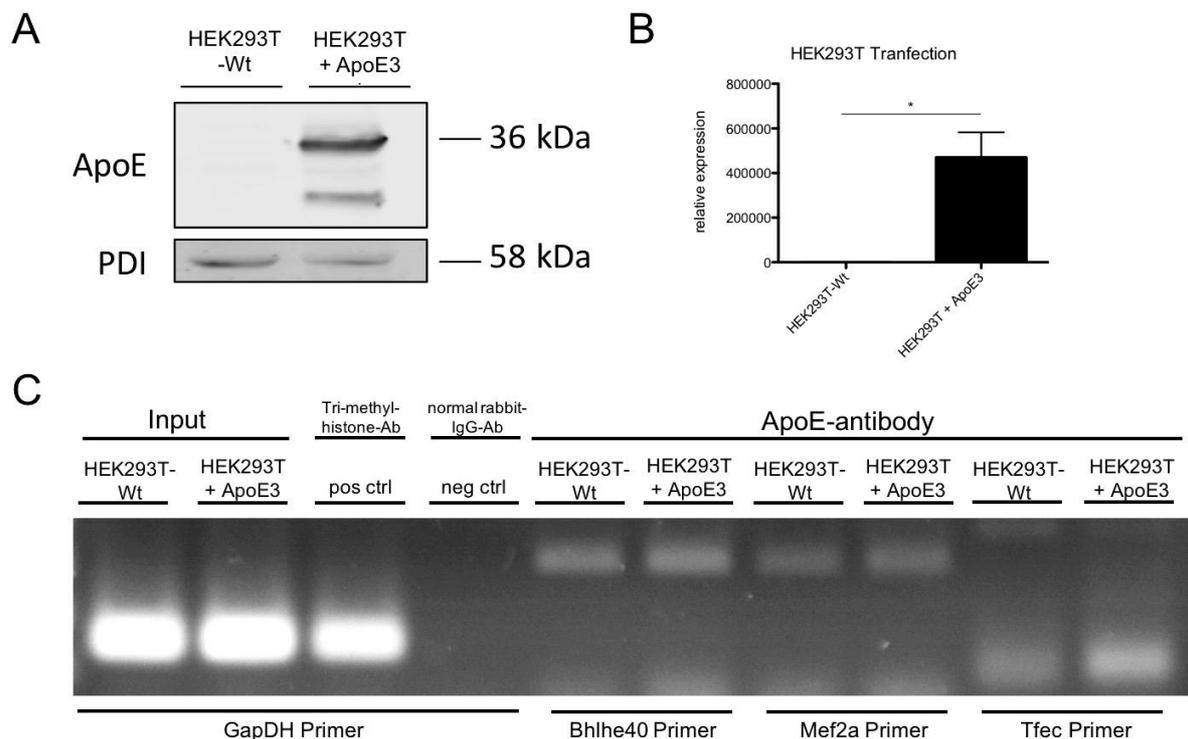
**Abb. 3.13: Voruntersuchungen zur ApoE-abhängigen Genregulation. (A) RNA-Genexpressionsanalysen**<sup>verändert nach 2</sup>. Die Ergebnisse zeigen eine ApoE-abhängige Regulation der RNA-Expression in phagozytierenden Mikrogliazellen. Im Vergleich von WT MG-dnΦ (Wt-Mikroglia mit neurodegenerativer Aktivierung) und ApoE<sup>-/-</sup> MG-dnΦ (Wt-Mikroglia mit neurodegenerativer Aktivierung und ApoE-Knockout) kann eine Zunahme (TFEC, Bhlhe40) bzw. eine Abnahme (Mef2a) der RNA-Expression beobachtet werden. Demzufolge konnten ApoE-hemmende- und ApoE-induzierte Gene identifiziert werden. **(B) Analysen von ApoE-abhängigen Regulationskaskaden.** Mit Hilfe von *in-silico*-Berechnungen und RNA-Expressionsanalysen konnten Gene identifiziert werden, deren Expression vermutlich durch ApoE-abhängige Regulationskaskaden beeinflusst werden. (— ApoE-reprimierte Gene; — ApoE-induzierte Gene; — ApoE-abhängige Regulation)

### 3.3.2 Untersuchung der ApoE-Bindung an die Promotorbereiche von Mef2a, Bhlhe40 und Tfec

Mef2a, Bhlhe40 und Tfec wurden aufgrund der zuvor durchgeführten Untersuchungen als Kandidaten für eine ApoE-abhängige Regulation ausgewählt. Für die Analyse der putativen ApoE-Bindung an die Promotorbereiche dieser Gene wurde ein ChIP-Assay durchgeführt. Hierfür wurden humane HEK293T-Zellen verwendet, da die Bindung von ApoE an die Promotorbereiche mit Hilfe eines humanen Hintergrundes untersucht werden sollte. Da die Isoform ApoE3 am häufigsten vorkommt und nicht mit Erkrankungen assoziiert wird, wurde das ApoE3-Gen in den HEK293T-Zellen mit Hilfe einer Transfektion (Viromer Yellow, lipocalyx, Halle) überexprimiert. Die Proteinexpressionsanalyse zeigt, dass in mit humanem

ApoE3 transfizierten HEK293T-Zellen eine größere Menge an ApoE detektiert werden kann als in den HEK293T-Kontrollzellen (Abb. 3.14 A). Die Quantifizierung des Western Blots bestätigt dies (Abb. 3.14 B). Mit diesen charakterisierten HEK293T-Zellen konnte im Anschluss ein ChIP-Assay durchgeführt werden.

Die Ergebnisse zeigen nach Einsatz gleicher Mengen an DNA, dass in den HEK293T-Zellen mit ApoE3-Überexpression eine größere Menge der putativen ApoE-Bindestelle von Mef2a, Bhlhe40 bzw. Tfec amplifiziert werden kann als in den HEK293T-Wt-Zellen (Abb. 3.14 C). Dies bedeutet, dass bei Vorhandensein einer größeren Menge an ApoE3 eine höhere Anzahl an ApoE-Proteinen an den Promotorbereich von Mef2a, Bhlhe40 bzw. Tfec binden können. Eine unspezifische Präzipitation der untersuchten Promotorsequenzen kann durch eine erfolgreiche Negativ- und Positivkontrolle ausgeschlossen werden. Diese Resultate machen deutlich, dass ApoE3 an die putativen Bindestellen in den Promotorbereichen von Mef2a, Bhlhe40 und Tfec bindet und somit vermutlich als Transkriptionsfaktor agieren kann.

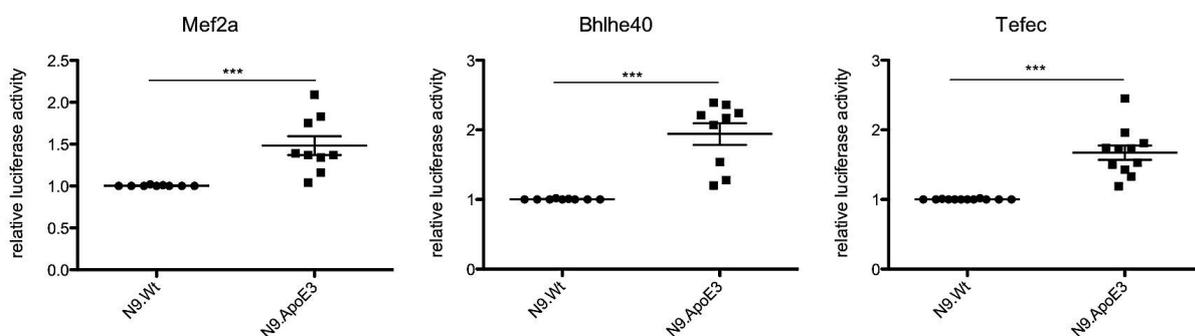


**Abb. 3.14: Überprüfung der ApoE3-Bindung an die Promotorbereiche von Mef2a, Bhlhe40 und Tfec in HEK293T-Zellen. (A) ApoE3-Expression in HEK293T-Zellen.** Mittels Western-Blot-Analyse konnte die Überexpression von ApoE3 in HEK293T-Zellen nach Transfektion gezeigt werden. PDI diene als Ladekontrolle. Die **Quantifizierung (B)** bestätigt diese Ergebnisse. **(C) ChIP-Assay zur Analyse der Bindung von ApoE3 an die putativen Bindestellen im Promotorbereich von Mef2a, Bhlh40 und Tfec.** Es wurden gleiche Mengen an DNA eingesetzt. Sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrolle waren erfolgreich und zeigen die erfolgreiche Durchführung des ChIP-Assays. Es kann eine verstärkte Amplifizierung der putativen ApoE-Bindestellen in HEK293T-Zellen mit ApoE3-Überexpression im Vergleich zu HEK293T-Wt-Zellen an die verschiedenen Promotorbereiche festgestellt werden. (n = 3)

### 3.3.3 ApoE-abhängige Regulation der Promotoraktivität von Mef2a, Bhlhe40 und Tfec

Die Bindung von ApoE3 an die putativen Bindestellen im Promotorbereich von Mef2a, Bhlhe40 und Tfec konnten mittels CHIP-Assay gezeigt werden. Die Regulation dieser Gene durch ApoE3 sollte im Anschluss analysiert werden. Zur Untersuchung der Promotoraktivität von Mef2a, Bhlhe40 und Tfec unter ApoE3-Kontrolle wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt. Dafür wurden zunächst die Bereiche der Genpromotoren von Mef2a, Bhlhe40 und Tfec, die für eine Bindung von ApoE3 eine potentiell geeignete Sequenz aufwiesen, mittels PCR amplifiziert, in den pGL3\_basic-Vektor (siehe Anhang A1) kloniert und anschließend für das Luciferase-Assay in HEK293T-Zellen transfiziert.

Die Quantifizierung der Ergebnisse zeigt deutlich, dass die Promotoraktivität bei allen untersuchten Promotorbereichen nach ApoE3-Überexpression ansteigt (Abb. 3.15). Dieser signifikante Effekt ist bei Mef2a mit einem Anstieg um die 1,5-fache Promotoraktivität am geringsten und bei Bhlhe40 mit 2,0-facher Promotoraktivität im Vergleich zu den HEK293T-Wt-Zellen am stärksten ausgeprägt. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass ApoE3 als Transkriptionsfaktor fungieren kann.



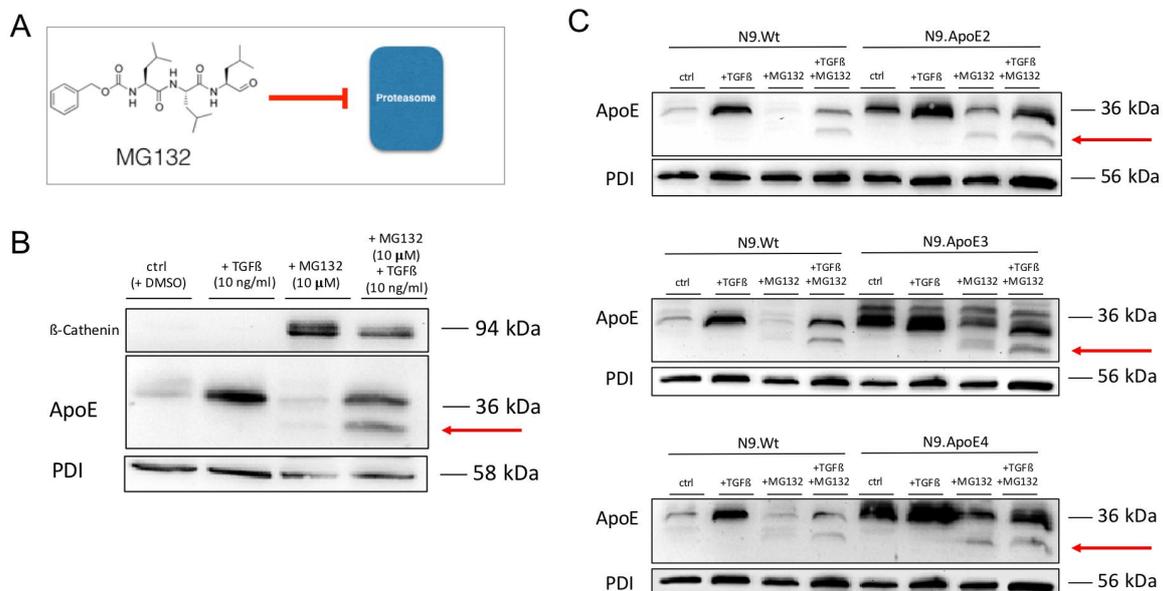
**Abb. 3.15: Untersuchung der ApoE-abhängigen Regulation der Promotoraktivität mittels Luciferase-Assay.** In allen untersuchten Promotorbereichen (Mef2a, Bhlhe40, Tfec) kann eine signifikante Zunahme der Promotoraktivität in HEK293T-Zellen mit ApoE3-Überexpression im Vergleich zu den HEK293T-Wt-Zellen festgestellt werden. (n = 3, technische Triplikate)

### 3.3.4 Proteasominhibierung zeigt ein neues spezifisches ApoE-Fragment

Zur Identifizierung von intrazellulären ApoE-Fragmenten, die innerhalb des Zellkerns als Transkriptionsfaktor fungieren könnten, wurde das Proteasom mit Hilfe der Substanz MG132 inhibiert (Abb. 3.16 A). Das Proteasom ist ein wichtiger Bestandteil der Zelle, da es verschiedenste zytoplasmatische Proteine und Proteinfragmente, die innerhalb der Zelle nicht mehr benötigt werden, abbaut<sup>274</sup>. Da es sich bei ApoE um

ein sekretiertes Protein handelt, sollten mögliche Alternativen zu diesem konventionellen Weg untersucht werden<sup>191</sup>.

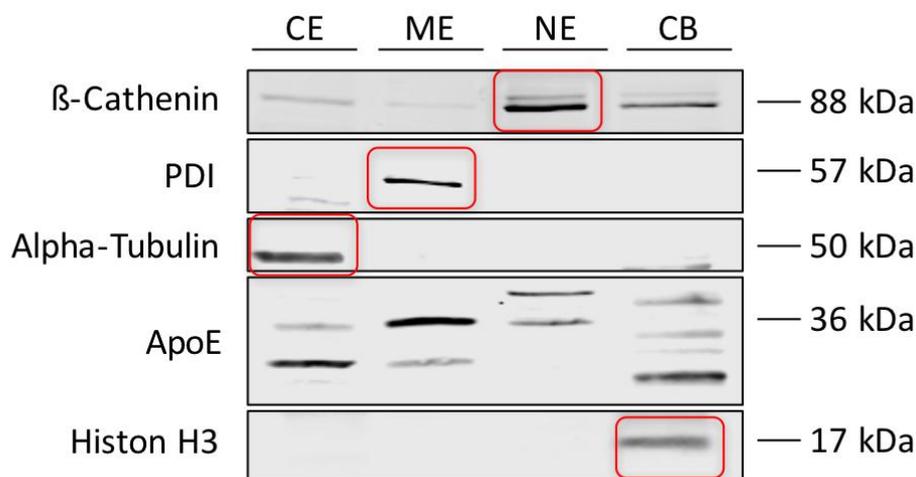
Nach 48-stündiger-Behandlung mit MG132 wurden die N9-Mikroglia-Zellen mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Zusätzlich zur MG132-Behandlung wurde zu einigen Zellen TGF $\beta$  gegeben, um die ApoE-Menge zu erhöhen und putatives ApoE in der Zelle sichtbar zu machen. Als Kontrolle für die Effizienz der Inhibierung des Proteasoms wurde  $\beta$ -Catherin untersucht, ein Protein, welches über das Proteasom abgebaut wird. Die Ergebnisse des Western Blots (Abb. 3.16 B) zeigen zunächst durch den detektierten Anstieg der  $\beta$ -Catherin-Expression die erfolgreiche Inhibierung des Proteasoms. Darüber hinaus kann neben der erwarteten ApoE-Bande bei ca. 36 kDa ein weiteres Fragment mit dem spezifischen ApoE-Antikörper bei ca. 25 kDa detektiert werden. Die Expression von ApoE sowie des spezifischen ApoE-Fragments nimmt nach TGF $\beta$ -Behandlung zu. Darüber hinaus ist in Abbildung 3.16 C zu erkennen, dass das durch Proteasominhibierung identifizierte ApoE-Fragment ebenfalls in den N9-Zellen mit ApoE2/3/4-Expression zu beobachten ist. Nach der Analyse der vorliegenden Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass dieses identifizierte ApoE-Fragment innerhalb des Nukleus als Transkriptionsfaktor fungieren könnte.



**Abb. 3.16: Proteasominhibierung mittels MG132-Behandlung. (A) Biochemische Formel von MG132 als Proteasom-Inhibitor. (B) Western-Blot-Analyse nach MG132-Behandlung.** Die Expressionszunahme des Markerproteins  $\beta$ -Catherin zeigt die erfolgreiche Inhibierung des Proteasoms. Nach Behandlung mit MG132 ist neben der üblichen ApoE-Bande bei 36 kDa eine zusätzliche spezifische Bande bei ca. 25 kDa zu beobachten. Die Menge des identifizierten ApoE-Fragments nimmt nach Stimulation der ApoE-Expression durch TGF $\beta$  zu. PDI diente als Ladekontrolle ( $\leftarrow$  ApoE-Fragment). **(C) Das identifizierte ApoE-Fragment** kann auch bei N9.ApoE2/3/4-Expriemierern identifiziert werden. (n = 3;  $\leftarrow$  ApoE-Fragment)

### 3.3.5 Lokalisationsbestimmung des durch Proteasominhibierung identifizierten ApoE-Fragments

Transkriptionsfaktoren regulieren Gene auf DNA-Ebene, welche sich ausschließlich im Zellkern befindet<sup>275</sup>. Um auszuschließen, dass auf dem Weg der Sekretion befindliches ApoE im ER oder Golgi fragmentiert wird, ist die Lokalisationsbestimmung des zuvor identifizierten, spezifischen ApoE-Fragments von enormer Bedeutung. Für die Untersuchung der Lokalisation des spezifischen ApoE-Fragments innerhalb der Zelle wurde eine subzelluläre Fraktionierung mit N9-Zellen durchgeführt, welche zuvor mit MG132 und TGF $\beta$  behandelt wurden. Die Ergebnisse (Abb. 3.17) zeigen, dass das ApoE-Fragment im Zytoplasma und verstärkt Chromatin-gebunden im Nukleus vorkommt. Darüber hinaus kann ein größeres ApoE-Fragment in der nukleären Phase und Chromatin-gebunden beobachtet werden. Des Weiteren fällt auf, dass Chromatin-gebunden vier verschiedene ApoE-Fragmente identifiziert werden können. Dies bestätigt die Vermutung, dass es sich bei dem spezifischen ApoE-Fragment um einen Transkriptionsfaktor handeln könnte, welcher beispielsweise die Expression von Mef2a, Bhlhe40 und Tfec reguliert.



**Abb. 3.17: Lokalisationsbestimmung des ApoE-Fragments durch subzelluläre Fraktionierung von N9-Zelllysaten.** Das zuvor identifizierte ApoE-Fragment kann in fast allen Fraktionen, bis auf die nukleäre Fraktion, beobachtet werden. Das Fragment kommt im Zytoplasma und in hohen Konzentrationen in der chromatin-gebundenen Fraktion vor. Darüber hinaus können weitere Fragmente chromatin-gebunden identifiziert werden. (rot umrandet = Markerproteine für die entsprechenden Fraktionen; CE = zytoplasmatische Elution; ME = membrane Elution; NE = nukleäre Elution; CB = chromatin-gebundene Elution). Das N9-Zelllysate wurde mit 10  $\mu$ M MG132 und 10 ng/ml TGF $\beta$  für 48 h behandelt (n = 3).

### 3.3.6 Charakterisierung des ApoE-Fragments mittels Sequenz-Analysen

Für die weitere Untersuchung, ob es sich bei dem spezifischen ApoE-Fragment um einen Transkriptionsfaktor handelt und ob ein spezifisches Signalpeptid für die Translokation in den Zellkern vorliegt, ist die genaue Proteinsequenz für eine mögliche Synthese notwendig. Zur Ermittlung der Aminosäuresequenz des ApoE-Fragments wurde dieses mit Hilfe einer IP isoliert (Abb. 3.18 A) und mittels massenspektrometrischer Analyse sowie einer Edman-Sequenzierung untersucht.

Mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse, welche durch die „UKE Core Facility Proteomanalytik“ durchgeführt wurde, konnten verschiedene Aminosäuresequenzen identifiziert werden, die im spezifischen ApoE-Fragment vorkommen (Abb. 3.18 B). Dabei fällt auf, dass die identifizierten Sequenzen vorwiegend C-terminal in der Peptidsequenz zu finden sind, was für eine N-terminale Verkürzung des ApoE-Fragments spricht. Diese Sequenzen konnten mit Hilfe der Edman-Sequenzierung, welche von der Firma „Alphalyse“ (Dänemark) durchgeführt wurden, weiter eingegrenzt werden (Abb. 3.18 C). Die Analyse ergab die Peptidfolge „ELEE“ oder „GKEV“ als putativen Startpunkt des spezifischen ApoE-Fragments.

Die Resultate der vorliegenden Analysen konnten demonstrieren, dass es sich bei dem identifizierten Fragment um ein ApoE-spezifisches Peptid handelt. Des Weiteren konnte erfolgreich eine putative Sequenz des spezifischen ApoE-Fragments eingegrenzt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, dass sich die ApoE-Expression in murinen N9-Mikroglia-Zellen mit Hilfe verschiedener Stimulatoren beeinflussen lässt. Die höchste Konzentration von ApoE, welches mit dem ER, dem Golgi und den Lysosomen kolokalisiert, befindet sich im Bereich um den Zellkern. Darüber hinaus konnten die Experimente zeigen, dass die Morphologie, das Migrations- sowie das Phagozytoseverhalten von N9-Mikroglia-Zellen ApoE-Isoform-abhängig beeinflusst wird. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass ApoE als Genregulator fungieren kann und somit an der Regulation der Expression verschiedener Gene beteiligt sein könnte.



**Abb. 3.18: Identifizierung der putativen Peptidsequenz des spezifischen ApoE-Fragments. (A) IP zur Isolierung des spezifischen ApoE-Fragments für die weiteren Untersuchungen. Die Proteinexpressionsanalyse zeigt deutlich, dass das spezifische ApoE-Fragment mit Hilfe einer IP isoliert und aufgereinigt werden konnte. (B) Massenspektrometrische Analyse des spezifischen ApoE-Fragments. Die Analyse zeigt vorkommende Peptidsequenzen innerhalb des ApoE-Fragments, welche vorwiegend im C-terminalen Bereich zu finden sind. Daher ist eine N-terminale Verkürzung wahrscheinlich. (grün = Peptidfragmente, welche im ApoE vorkommen; grün unterstrichen = Peptidfragmente, die im spezifischen ApoE-Fragment vorkommen) (n = 3) (C) Edman-Sequenzierung ermittelt mögliche Schnittstelle innerhalb des ApoE. Die Analyse mittels Edman-Sequenzierung identifizierte putative N-terminale Start-Peptidsequenzen (rot) für das spezifische ApoE-Fragment. (n = 3) (Aminosäure-Kodierung: siehe Anhang A3)**

## 4. Diskussion

### 4.1 Charakterisierung des ApoE im murinen N9-Mikroglia-Zellsystem

In diesem Teil der Arbeit ging es zunächst um die Charakterisierung des murinen ApoE in N9-Mikroglia-Zellen. Zu Beginn der Untersuchungen wurde die Stimulus-abhängige ApoE-Expression und die damit verbundene Aktivierung von Mikroglia-Zellen mit Hilfe von TGF $\beta$ , TO901317 und Prostaglandin J<sub>2</sub> in der murinen Zelllinie N9 untersucht.

Die Zunahme der ApoE-Expression wird mit einer krankheitsspezifischen Gensignatur aktivierter Mikroglia-Zellen assoziiert<sup>2</sup>. Die Aktivierung von Mikroglia-Zellen ist sowohl im gesunden als auch im neurodegenerativ-erkrankten Gehirn von enormer Bedeutung. Der Wechsel von einer ruhenden zu einer aktivierten Mikroglia-Zelle kann nicht nur optisch, sondern auch auf transkriptionaler Ebene durch die intrinsische sowie extrinsische Regulation verschiedener Gene beobachtet werden<sup>194</sup>. Im gesunden Zustand besitzen Mikroglia-Zellen eine einzigartige homöostatische molekulare und funktionelle Gensignatur<sup>186,195</sup>, die sie während ihrer Aktivierung oder im Verlauf einer Erkrankung verlieren<sup>133,196</sup>. Darüber hinaus konnte bereits eine krankheitsbedingte Mikroglia-Signatur identifiziert werden<sup>1,2,64</sup>. Diese krankheitsspezifische Gensignatur ist, wie bereits zuvor erwähnt, mit einer signifikanten Zunahme der ApoE-Expression verbunden. Im Gegensatz dazu sind homöostatische Gene herunterreguliert<sup>2</sup>. Aufgrund dieser Aspekte stellt ApoE einen kritischen Faktor in der Mikroglia-Aktivierung dar und könnte die Entwicklung des dysregulierten Phänotyps, der mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert wird<sup>2</sup>, beeinflussen. Allerdings wurde die differentielle Rolle von ApoE in diesem Szenario bisher nicht in murinen Mikroglia-Modellen erforscht.

Bei der Untersuchung der ApoE-Stimulation konnte eine Zunahme der ApoE-Expression unter Behandlung von TGF $\beta$  und TO901317 beobachtet werden. TO901317 ist ein Agonist der LXR. Diese spielen eine wichtige Rolle im Cholesterinstoffwechsel und regulieren unter anderem die Expression von ApoE<sup>197</sup>. Die Behandlung mit dieser Substanz führt sowohl in Astrozyten<sup>198</sup> als auch in Alzheimer-Mausmodellen<sup>199</sup> zu einer Verstärkung der ApoE-Expression. Resultierend aus diesen Studien wurde ein ähnlicher Effekt für N9-Mikroglia-Zellen postuliert, welcher sich in den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigte.

Das Zytokin TGF $\beta$  gehört zu der Familie der „transformierenden Wachstumsfaktoren“, die eine wichtige Rolle in der Embryogenese und in der Regulation zahlreicher grundlegender Zellfunktionen spielen<sup>200</sup>. Es ist bekannt, dass TGF $\beta$  die Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Adhäsion von Zellen beeinflussen kann<sup>201</sup>, wobei die TGF $\beta$ -Konzentration im Gehirn mit zunehmenden Alter und während der Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen zunimmt<sup>202</sup>. Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass TGF $\beta$  die ApoE-Expression in Mikroglia-Zellen stimuliert<sup>203</sup> und für die *in vitro*-Entwicklung dieser Zellen, welche die molekulare und funktionelle Gensignatur von adulten Mikroglia zeigen, erforderlich ist<sup>186</sup>. Die Bedeutung von TGF $\beta$  im Kontext der Mikroglia-Aktivierung zeigt sich zusätzlich in der „Glia Cell Dysregulation Hypothesis“ für die AD. Diese Hypothese schlägt vor, dass die Ursache dieser Erkrankung unter anderem in der gestörten Regulation der Mikroglia-Aktivierung liegt. Aufgrund dieser Dysregulation werden Mikroglia-Zellen, welche durch Astrozyten sezerniertes TGF $\beta$  reguliert werden, zunehmend zytotoxisch und verringern ihre Schutzfunktion<sup>276</sup>.

Die Anwendung von Prostaglandin J<sub>2</sub> führte im Vergleich zu TGF $\beta$  und TO901317 zu einer Abnahme der ApoE-Konzentration. Prostaglandin J<sub>2</sub> ist ein endogenes Hormon, das während einer Inflammation über Cyclooxygenasen synthetisiert wird. Es induziert unter anderem die Apoptose und wird daher mit neurodegenerativen Störungen in Verbindung gebracht<sup>204</sup>. Cyclooxygenasen sind Enzyme, die in der Neuroinflammation eine überaus wichtige Rolle spielen, da ihre Hemmung das Risiko an Alzheimer und Parkinson zu erkranken um bis zu 50% senkt. Jedoch führt diese Hemmung zur Blockade von nachgeschalteten Signalwegen, welche zur Produktion von neuroprotektiven und neurotoxischen Prostaglandinen führt<sup>205</sup>. Nach einer neuronalen Verletzung sekretieren aktivierte Mikroglia große Mengen an Prostaglandin J<sub>2</sub><sup>6</sup> sowie Prostaglandin D<sub>2</sub> und E<sub>2</sub><sup>207</sup>. Eine Stimulation der ApoE-Expression in Mikroglia-Zellen durch die Behandlung mit Prostaglandin J<sub>2</sub>, wie in einigen Untersuchungen beschrieben wird<sup>204,208</sup>, zeigte sich in den Versuchen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht. Daher wird eine untergeordnete Rolle von Prostaglandin J<sub>2</sub> in der Aktivierung der ApoE-Expression in N9-Mikroglia-Zellen postuliert.

Da über die physiologische Regulation der Sekretion sowie die Funktion von mikroglialen ApoE in N9-Zellen nur wenig bekannt ist, sollte im Anschluss die Lokalisation von ApoE sowie die Kolo-kalisation mit dem ER, dem Golgi und den

Lysosomen nach Stimulation der ApoE-Expression mittels TGF $\beta$  untersucht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass ApoE sich in hohen Konzentrationen um den Zellkern und innerhalb des Zytoplasmas befindet. Die Lokalisation von ApoE am Zellkern lässt eine Rolle als Transkriptionsfaktor vermuten, für welche ApoE über eine Kernlokalisierungssequenz für die Translokation in den Nukleus verfügen muss. Diese These konnte bereits für das neuronale ApoE demonstriert werden<sup>190</sup>. Nähere Untersuchungen zu dieser Hypothese wurden im letzten Teil der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Die Konzentration von ApoE im ER, im Golgi-Apparat und in verschiedenen Vesikeln konnte bereits in Makrophagen gezeigt werden<sup>209</sup>. Mikroglia besitzen, wie Makrophagen, komplexe Proteinsekretionsmaschinen einschließlich des klassischen und sehr komplexen ER/Golgi-Weges, über welchen die ApoE-Synthese und Freisetzung erfolgt<sup>210</sup>. Im ER erfolgt zunächst die Translation und Proteinfaltung von ApoE, welches anschließend im Golgi-Apparat durch verschiedenste Enzyme weiter prozessiert wird<sup>211</sup>. Mikroglia-Zellen sind darüber hinaus in der Lage Proteine, mRNA sowie microRNA durch Exosomen und Mikrovesikel über regulierte Exozytose zu transportieren<sup>212</sup>. Bei der Exozytose fusionieren sekretierende Vesikel mit der Plasmamembran und geben die in ihnen enthaltenen Stoffe an die Zielzelle ab<sup>213</sup>. Obwohl die konstitutive Sekretion über den ER/Golgi-Weg und die regulierte Exozytose sehr unterschiedlich sind, konnte bereits gezeigt werden, dass Makrophagen und Ratten-Astrozyten beide Wege für die ApoE-Sekretion kombinieren<sup>212,214,215</sup>. Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Kolo-kalisation von mikroglialen ApoE mit dem ER und dem Golgi demonstrierten, ist eine ApoE-Sekretion über eine Kombination aus ER/Golgi-Weg und regulierter Exozytose in N9-Zellen möglich.

Die Kolo-kalisation mit den Lysosomen in N9-Mikroglia-Zellen spricht des Weiteren für eine Degradation von ApoE durch dieses Zellorganell. Es konnte zudem gezeigt werden, dass der Abbau von ApoE in Makrophagen nach Behandlung mit verschiedenen lysosomalen Inhibitoren (Ammoniumchlorid, Chloroquin) abnimmt<sup>216</sup>. Die Untersuchungen von Deng *et al.* postulierten, dass die lysosomale Hemmung einen biphasischen Effekt auf die Sekretion von ApoE hat. Während unter Behandlung mit niedrigen Konzentrationen die gehemmte ApoE-Degradation durch eine erhöhte Sekretion begleitet wird, führen hohe Konzentrationen der Lysosom-Inhibitoren ebenfalls zu einer Blockade der ApoE-Sekretion. Die Degradation von

ApoE erfolgt jedoch nicht ausschließlich über die Lysosomen. In Makrophagen wird der Abbau durch proteasomale Kompartimente unterstützt<sup>217</sup>. Die Kolokalisation in N9-Mikroglia-Zellen weist demnach auf eine ApoE-Degradation in den Lysosomen hin. Da die Kolokalisation jedoch nicht kontinuierlich beobachtet werden kann, ist eine zusätzliche Degradation über weitere Kompartimente wahrscheinlich. Um diesen Aspekt der mikroglialen ApoE-Degradation näher zu untersuchen, werden weitere Studien benötigt.

Die Synthese von ApoE hat des Weiteren eine große Bedeutung für die Aktivierung von Mikroglia-Zellen während der Progression neurodegenerativer Erkrankungen<sup>2</sup> und daraus resultierend für ihre Fähigkeit zur Motilität<sup>218</sup>. Die Migration spielt vor allem bei der Identifizierung von Pathogenen oder geschädigten Neuronen eine wichtige Rolle<sup>219</sup>. Demzufolge wurde im Anschluss an die Lokalisationsstudien die Motilität unter ApoE-Stimulation mit Hilfe von Scratch-Assays untersucht. Dabei korrelierte der Anstieg der ApoE-Expression mit einer Zunahme der mikroglialen Migration. Die Fähigkeit von Mikroglia-Zellen in Reaktion auf verschiedene Stimuli durch das Hirnparenchym zu wandern, ist grundlegend für ihre physiologischen und pathophysiologischen Funktionen. Die mikrogliale Motilität ist dabei abhängig von der Wahrnehmung verschiedener externer Stimuli durch spezifische Oberflächenrezeptoren, die unter anderem die Migration über konvergierende Signalwege vermitteln<sup>220</sup>. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine mit dem Komplementfaktor 5a bzw. ATP-stimulierte Wanderung von primären Mikroglia-Zellen, isoliert aus C57B6-Mäusen, ApoE-abhängig ist<sup>221</sup>. Die ATP-stimulierte Migration kann mit dem ERK-Signaltransduktionsweg assoziiert werden und wird darüber hinaus von den ApoE-Genotypen unterschiedlich beeinflusst<sup>221</sup>. Die Ergebnisse der hier gezeigten Migrations-Untersuchungen mit N9-Mikroglia demonstrieren ebenfalls eine ApoE-Abhängigkeit unter TGFβ-, TO901317- und Prostaglandin J<sub>2</sub>-Behandlung. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte die Gewichtung von ApoE in der mikroglialen Aktivierung und der daraus resultierenden Motilität demonstriert werden, welche vermutlich auch eine Rolle in neuropathologischen Prozessen spielt. Eine Isoform-spezifische Untersuchung der mikroglialen Motilität erfolgte im zweiten Teil der hier vorliegenden Arbeit.

## 4.2 ApoE-Isoform-abhängige mikrogliale Morphologie, Migration und Phagozytose

Um die Rolle von ApoE in der Physiologie von Mikroglia-Zellen zu entschlüsseln, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Regulation der ApoE-Expression sowie die Lokalisation dieses Proteins in N9-Mikroglia-Zellen charakterisiert. Im Anschluss wurde eine ApoE-Isoform-abhängige Regulation der mikroglialen Morphologie, Migration und Phagozytose untersucht.

Während Mäuse nur über eine Genvariante verfügen, existieren im menschlichen Organismus im Wesentlichen drei verschiedene polymorphe Allele (ApoE2, ApoE3 und ApoE4)<sup>160</sup>, wobei die Isoform E4 der genetische Hauptrisikofaktor für die Entwicklung der SAD ist<sup>222,223,224</sup>. Die genetische Divergenz zwischen den Allelen führt zu geringen Strukturunterschieden, welche jedoch entscheidende Auswirkungen auf verschiedene Prozesse im Gehirn haben können. Untersuchungen haben bereits einen Zusammenhang zwischen ApoE4 und einer erhöhten A $\beta$ -Aggregation mit zusätzlich verlangsamten Abbau gezeigt<sup>168,172,173</sup>. Darüber hinaus verstärkt ApoE4 die Neurodegeneration in einem Mausmodell der Tauopathie unabhängig von A $\beta$ . Dabei sind Neuronen anfälliger für eine Degeneration, während der Mangel an ApoE sich neuroprotektiv auswirkt<sup>225</sup>. Aktuelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass die ApoE-Dysregulation eine Rolle bei der Aktivierung von Mikroglia-Zellen im neurodegenerativ-erkrankten Gehirn spielen könnte<sup>2</sup>. Da Mikroglia die Immunantwort im Gehirn initiieren, könnte eine chronische Aktivierung jedoch schließlich zum Fortschreiten von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere der AD<sup>226</sup>, führen.

In der vorliegenden Arbeit sollte unter anderem analysiert werden, ob ApoE4 im Vergleich zu ApoE2 bzw. ApoE3 Mikroglia-Zellen in Richtung eines krankheitsassoziierten Phänotyps polarisiert. Daher wurden mögliche Veränderungen der charakteristischen Merkmale von Mikroglia-Zellen *in vitro* untersucht. Die ermittelten Ergebnisse zeigen, dass ApoE4 verschiedene Aspekte wie die Aktin-Zytoskelett-Reorganisation, die Zellmotilität sowie das phagozytotische Verhalten von Mikroglia-Zellen beeinflussen kann.

Bei der Untersuchung der Zellmorphologie konnte zunächst eine ApoE-Isoform-abhängige Veränderung festgestellt werden. N9.ApoE4-Zellen zeigten eine Zunahme des Zell- sowie des Nukleusvolumens. Zusätzlich zeigten viele dieser Zellen eine Ausbildung charakteristischer Aktin-Stress-Fasern. Bei N9-Zellen mit ApoE-KO

konnte hingegen eine Abnahme des Zell- und Nucleusvolumens ohne Ausbildung von ausgeprägten Aktin-Stress-Fasern beobachtet werden. Sowohl die Bildung von Aktin-Stress-Fasern, welche aus kontraktiven Aktin- und Myosinbündeln bestehen, als auch die Größe des Zellkerns beeinflussen die zelluläre Motilität und das Zytoskelett<sup>227,228</sup>. Die Position und Bewegung des Zellkerns innerhalb der Zelle stellen durch die Spezifizierung der Migrationsrichtung ein Schlüsselmechanismus für die Motilität dar<sup>230</sup>. Darüber hinaus sind Aktin-Stress-Fasern ein weiterer entscheidender Aspekt bei der Regulation der Zellmotilität<sup>231</sup>. Ist die Struktur der Aktin-Stress-Fasern gestört, führt dies vermutlich zu einem veränderten Migrationsverhalten<sup>232,233</sup>. Zusätzlich wurden Veränderungen der Aktindynamik innerhalb der Zelle bereits mit neurologischen Störungen assoziiert<sup>234</sup>. Daher ist es wahrscheinlich, dass das erhöhte Nucleusvolumen von N9.ApoE4-Zellen eine Ursache für die verstärkte Zellmigration darstellen könnte. Im Gegensatz dazu zeigten N9.ApoEKO-Zellen mit einem kleineren Nucleus eine Abnahme der Zellmigration. Huang & Mahley postulierten, dass ApoE4 in Neuronen proteolytische Prozesse und eine Fragmentbildung auslöst, welche zu einer Veränderung des Zytoskeletts führt und somit die Neurodegeneration unterstützt. Des Weiteren zeigten sie, dass gestresste Neuronen ihre ApoE-Expression für die Reparatur geschädigter Neurone erhöhen<sup>136</sup>. Es wäre möglich, dass ApoE4 in Mikroglia-Zellen proteolytisch prozessiert wird, was zur Veränderung der Morphologie führen und darüber hinaus die Neurodegeneration im Gehirn fördern könnte. Um den genauen Mechanismus zu entschlüsseln der zur Veränderung der Morphologie führt, müssen jedoch weitere Studien durchgeführt werden.

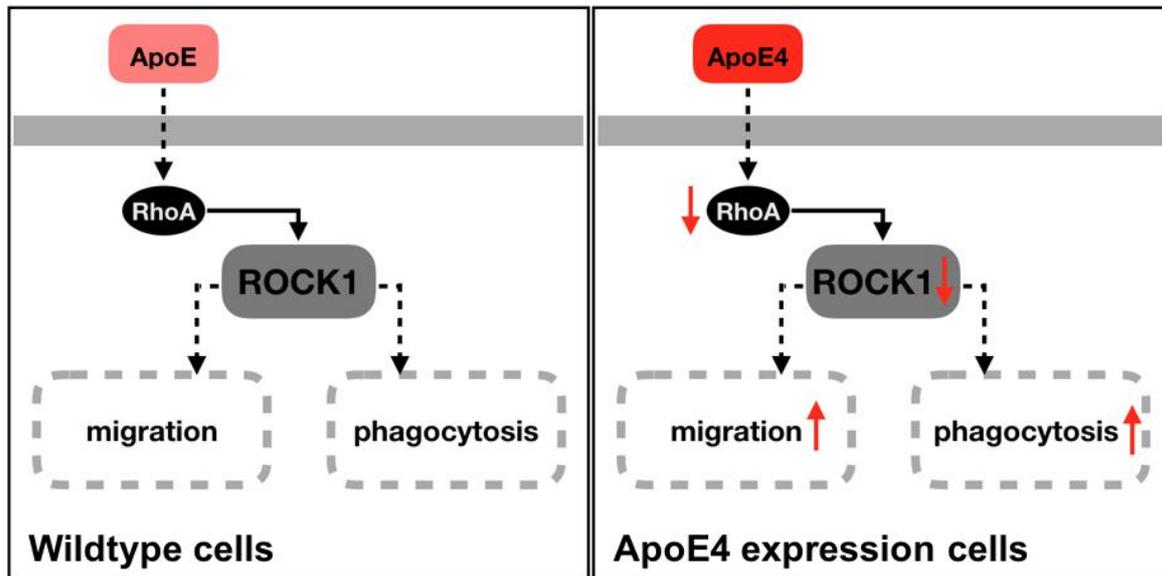
Da in der vorliegenden Arbeit postuliert wurde, dass die ApoE4-abhängige Veränderung der Zellmorphologie das Migrationsverhalten beeinflusst, wurde dieses mit Hilfe von Transwell- und Scratch-Assays untersucht. Die Migration zu beispielsweise apoptotischen Zellen sowie invasiven Pathogenen und Zelltrümmern stellt eine Hauptfunktion der Mikroglia-Zellen dar<sup>226</sup>. Die Ergebnisse zeigten eine Zunahme der Motilität bei N9.ApoE4-Zellen. N9.ApoEKO-Zellen demonstrierten hingegen eine Abnahme der Zellmigration. Ein ApoE-abhängiges Migrationsverhalten wurde bereits von Cudaback *et al.* untersucht. Die Arbeitsgruppe zeigte jedoch eine ApoE-Isoform-spezifische Modulation der Mikroglia-Motilität allein als Antwort auf verschiedene chemotaktische Stimuli, die im Allgemeinen mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind<sup>221</sup>. Beispielsweise kann durch die

Behandlung mit C5a oder ATP die Migration der Mikroglia-Zellen, welche ApoE2, ApoE3 oder ApoE4 exprimieren, gesteigert werden<sup>221</sup>. Im Gegensatz dazu konnten die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, dass insbesondere ApoE4 unabhängig von einem Stimulus zu einer erhöhten Migration führt. Darüber hinaus wurde in N9.ApoE4-Zellen eine verstärkte Phagozytose festgestellt, bei welcher Mikroglia mit ApoE4-Expression mehr und größere Fragmente apoptotischer Zellen aufnahmen als N9.Wt-Zellen. Die ApoE4-abhängige Veränderung des Migrations- und Phagozytoseverhaltens könnte im neurodegenerativ-erkrankten Gehirn den destruktiveren krankheits-assoziierten Phänotyp der Mikroglia-Zellen unterstützen<sup>2</sup>.

Im Anschluss an die zuvor beschriebenen Experimente sollte der Signaltransduktionsweg, welcher zu einer veränderten Mikroglia-Physiologie führt, näher untersucht werden. Aufgrund einer umfassenden Literaturrecherche wurde die Hypothese aufgestellt, dass der ROCK1-Signaltransduktionsweg möglicherweise durch ApoE4 reguliert wird. ROCK1, dessen Funktion von der subzellulären Lokalisation, dem Aktivitätszustand sowie der Aktivierung/Inhibierung durch verschiedene Co-Faktoren über Phosphorylierung abhängt, stellt ein Schlüsselprotein der Migration, Phagozytose und der Aktin-Zytoskelett-Dynamik in Makrophagen dar<sup>235</sup>. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren eine signifikante Abnahme der ROCK1- sowie der RhoA-Expression spezifisch in N9.ApoE4-Zellen. RhoA ist ein Aktivator von ROCK1 und daher in diesem Signaltransduktionsweg von großer Bedeutung. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen könnten ein Hinweis auf eine ApoE4-abhängige ROCK1-Regulation sein. Studien haben bereits gezeigt, dass ROCK1 als Suppressor der Zellmotilität von inflammatorischen Zellen (Makrophagen und Neutrophilen) wirkt, indem es die Phosphorylierung von PTEN (Phosphatase und Tensinhomolog), einer durch ROCK1 regulierten Phosphatase, steuert<sup>236</sup>. Vemula *et al.* postulierten eine verstärkte Rekrutierung und Migration von Makrophagen und Neutrophilen *in vitro* bei Abwesenheit von ROCK1, während die Expression von ROCK2, einem Isozym von ROCK1, unverändert ist. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte diese Korrelation in N9.ApoE4-Zellen ebenfalls gezeigt werden. Darüber hinaus konnte, wie bei den Untersuchungen von Vemula *et al.*, eine Zunahme der Expression von pAKT und pGSK3 $\beta$  festgestellt werden.

ROCK1 spielt unter anderem eine Rolle bei der Phagozytose<sup>237,238</sup>. Im Vergleich mit den vorliegenden Ergebnissen ist daher eine ApoE4-abhängige ROCK1-Regulation

des Phagozytoseverhaltens in Mikroglia-Zellen möglich. Die ROCK1-Dysregulation könnte daher eine wichtige Bedeutung in der Veränderung der Mikroglia-Physiologie übernehmen (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1: Vorgeschlagenes Modell der ApoE4-vermittelten Migration und Phagozytose-Regulation. Wildtyp-Zellen:** ApoE unterstützt die Induktion der ROCK1-Expression über RhoA, welche zu einem normalen Migrationsverhalten führt. ROCK1 könnte auch die Phagozytose von Mikrogliazellen beeinflussen. **ApoE4-Expressions-Zellen:** ApoE4 führt zu einer Abnahme der Expression von RhoA. Dies führt zu einer geringeren Aktivierung von ROCK1 und schließlich zu einer Zunahme der Migration und Phagozytose von Mikrogliazellen.

### 4.3 ApoE als Genregulator

Die Ergebnisse der Lokalisationsuntersuchungen zeigten eine Konzentration von ApoE am bzw. im Zellkern. Aus diesem Grund wurde eine Genregulation auf transkriptionaler Ebene durch ApoE postuliert, welche die Entwicklung des krankheitsassoziierten mikroglialen Phänotyps unterstützen könnte. Die Rolle von ApoE als Transkriptionsfaktor wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von ChIP-Analysen und Luciferase-Assays überprüft. Darüber hinaus konnte ein spezifisches ApoE-Fragment identifiziert werden, welches vermutlich als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Gene beeinflussen könnte.

Die Analysen der Voruntersuchungen<sup>2</sup> demonstrierten, dass ApoE über verschiedene Regulationskaskaden dazu in der Lage sein könnte, die Gene Mef2a, Bhlhe40 und Tfec auf transkriptionaler Ebene zu regulieren. Diese drei Gene kodieren für DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, die wiederum die Expression eines umfangreichen Panels weiterer Gene, die in der Homöostase von Mikroglia-Zellen eine wichtige Rolle spielen, beeinflussen<sup>239.240</sup>.

Mef2a reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression von muskelspezifischen, wachstums- und stressinduzierenden Genen und ist daher an zahlreichen zellulären Prozessen wie der Muskelentwicklung, der neuronalen Differenzierung sowie der Zellwachstumskontrolle oder der Apoptose beteiligt<sup>241,242</sup>. Lavin *et al.* konnten zeigen, dass vor allem im Gehirn eine sehr hohe Mef2a-Expression vorliegt. Mef2a-Bindungsmotive waren in Mikroglia-spezifischen Enhancer-Clustern überrepräsentiert und traten bei Enhancern von Mikroglia-spezifischen Genen auf. Des Weiteren konnten wir bereits zeigen, dass Mef2a vermutlich eine wichtige Rolle in der mikroglialen Aktivierung übernimmt<sup>279</sup>, da nach Virusinfektion in Mäusen die Anzahl von Mikroglia-Zellen sowie die Mef2a-RNA-Expression in murinen Gehirnen zunahm. Darüber hinaus konnte die Hypothese, dass Mef2a die Expression von Faktoren reguliert, welche am Überleben<sup>243,244</sup> und der Differenzierung von Neuronen<sup>245</sup> beteiligt sind, aufgestellt werden. Weiterhin zeigte eine Genotyp-basierte Untersuchung von Alzheimer-Patienten verschiedene Mef2a-Genmutationen, welche bei ApoE4-Trägern häufiger auftraten<sup>246</sup>.

Bhlhe40 zählt zur Familie der Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren und wird in zahlreichen Geweben exprimiert<sup>247,248</sup>. Es beeinflusst unter anderem den Zellzyklus, die Apoptose sowie die Zelldifferenzierung, wobei Bhlhe40 sowohl als Aktivator als auch als Repressor fungieren kann<sup>249</sup>. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass dieser Transkriptionsfaktor eine Vielzahl an Prozessen in T-Zellen beeinflusst. Bhlhe40-defiziente Mäuse beispielsweise sind gegen die Induktion von experimenteller Autoimmun-Enzephalomyelitis, einer Multiplen-Sklerose ähnlichen Erkrankung bei Versuchstieren, resistent. Diese Ergebnisse identifizierten den Transkriptionsfaktor Bhlhe40 somit als kritischen Regulator der autoreaktiven T-Zell-Pathogenität<sup>249</sup>. Zusätzlich ist Bhlhe40 vermutlich ein molekularer Schalter in der Differenzierung von entzündlichen bzw. entzündungshemmenden T-Zellen<sup>250</sup>. Der Transkriptionsfaktor Bhlhe40 wurde bis zum aktuellen Zeitpunkt nicht im Kontext mit ApoE untersucht. Eine Abnahme von Bhlhe22 durch ApoE4 konnte hingegen gezeigt werden<sup>251</sup>. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Expression von Transkriptionsfaktoren grundsätzlich durch ApoE reguliert werden könnte.

Das Tfec-Gen codiert ebenfalls für ein Protein aus der Familie von Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren und reguliert unter anderem das Überleben, das Wachstum und die Differenzierung verschiedener Zelltypen<sup>252</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass Tfec eine Rolle in der mikroglialen Genregulation spielt. Tfec ist ein Hauptregulator

der lysosomalen Proteintranskription<sup>253,254</sup> und beeinflusst daher die lysosomale Biogenese in Mikroglia-Zellen<sup>255</sup>. Des Weiteren führt Aβ im Zellkern von primären Mikroglia zu einer Umverteilung von Tfeb, einem Transkriptionsfaktor der zu 85% mit Tfec identisch ist<sup>256</sup> und verursacht dadurch eine lysosomale Dysfunktion<sup>257</sup>. Darüber hinaus konnte ein spezifisches Bindemotiv im Promotorbereich von ApoE identifiziert werden, an welches der Transkriptionsfaktor Tfec binden kann<sup>258</sup>. Dies lässt vermuten, dass zwischen ApoE und Tfec eine reziproke Regulation vorliegt. Die bestehenden Untersuchungen von Mef2a, Bhlhe40 und Tfec zeigen, dass diese Transkriptionsfaktoren wichtige Rollen in Mikroglia-Zellen spielen<sup>242,255</sup>. Erste Hinweise auf eine ApoE-abhängige Regulation konnten bereits aufgezeigt werden<sup>246,258</sup>.

Aufgrund der im Anschluss an die Vorversuche durchgeführten Experimente (ChiP-Assay, Luciferase-Assay) konnte eine Bindung von ApoE3 an die Promotorbereiche von Mef2a, Bhlhe40 und Tfec sowie eine ApoE3-abhängige Expressionsregulation demonstriert werden. Weitere Studien unterstützen diese Ergebnisse. Levros *et al.* konnten vorangehend an die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente eine ApoE3- bzw. ApoE4-abhängige Regulation von ApoD, ein weiteres Apolipoprotein mit einer erhöhten Expression während neurodegenerativen Erkrankungen<sup>259,260</sup>, identifizieren<sup>161</sup>. Die Resultate von Levros *et al.* zeigen eine ApoE-Lokalisation im Zellkern sowie eine Bindung von ApoE3 und ApoE4 an den ApoD-Promotor in Leber- und Glioblastoma-Zelllinien. Die Überexpression von ApoE3 und ApoE4 hemmt die ApoD-Promotoraktivität in U87-Zellen (humane primäre Glioblastoma-Zelllinie), wohingegen die Isoform ApoE2 keinerlei ApoD-Promotorbindung bzw. ApoD-Regulation aufzeigt. Zusätzlich konnte die Gruppe um Levros eine inverse Korrelation der ApoE- und ApoD-mRNA-Expression in murinen Gehirnen beobachten, was für eine Repressor-Funktion seitens ApoE3 und ApoE4 spricht<sup>161</sup>. Die Funktion der Isoformen ApoE3 und ApoE4 als Transkriptionsfaktor zu fungieren, kann durch anschließende Untersuchungen von Theendakara *et al.* bestätigt werden<sup>190</sup>. Diese Studie zeigt, dass in Neuronen ApoE4 im Vergleich zu ApoE3 DNA mit sehr hoher Affinität bindet. Des Weiteren konnten 1700 Promotorregionen identifiziert werden, an welche ApoE4 binden könnte und von denen 74 Gene mit der Pathogenese der AD assoziiert werden.

Der Mechanismus, durch welchen ApoE den sekretorischen Signaltransduktionswegen entgeht und anschließend zum Zellkern gelangt, ist bis

heute jedoch unklar und wurde in den hier erwähnten Arbeiten nicht untersucht. Eine potentielle Möglichkeit wäre, dass ApoE durch Wechselwirkungen mit zellulären Rezeptoren, wie beispielsweise dem LDLR oder LDLR-verwandten-Rezeptoren, in das Zytoplasma gelangt<sup>261</sup>. Eine weitere Theorie postuliert, dass ApoE aus dem Zytosol in den Zellkern transportiert wird, indem es an spezifische nukleäre Proteine über schwache polybasische Domänen bindet, die als potentielle nukleäre Signalsequenzen dienen<sup>262</sup>. Darüber hinaus ist bekannt, dass ApoE4 Stress im ER auslösen kann<sup>263,264</sup>, welcher zu einer Fehllokalisierung von Proteinen und somit zu einer Umverteilung vom Zytosol zum Nukleus führt<sup>265,266</sup>. Aus den Daten bereits vorliegender Studien und den Ergebnissen dieser Arbeit konnte eine potentielle Funktion seitens ApoE als Transkriptionsfaktor demonstriert werden.

Durch die Inhibierung des Proteasoms, welches beim Abbau von Proteinen eine wichtige Rolle spielt<sup>274</sup>, konnte in dieser Arbeit ein spezifisches ApoE-Fragment auf Proteinebene identifiziert werden. Studien in Neuronen fanden heraus, dass die Isoform ApoE4 im Vergleich zu den Isoformen ApoE2 und ApoE3 anfälliger für proteolytische Prozesse ist<sup>267,268,269</sup>. In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte jedoch kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl, Lokalisation bzw. Konzentration der ApoE-Fragmente innerhalb der verschiedenen mikroglialen ApoE-Expressions-Zellen festgestellt werden. In weiterführenden Experimenten sollte die ApoE-Isoform-spezifische Effizienz in den Zellkern zu gelangen bzw. die stabile Bindung an DNA in Mikroglia-Zellen untersucht werden. Das identifizierte ApoE-Fragment in N9.Wt-Zellen kommt im Zytoplasma und insbesondere Chromatin-gebunden im Zellkern vor. Darüber hinaus konnten weitere Chromatin-gebundene Fragmente mit Hilfe der Zellfraktionierung identifiziert werden. Vorrangegangene Studien konnten bereits einen Zusammenhang zwischen ApoE4-spezifischen Fragmenten und der AD herstellen<sup>269</sup>. Harris *et al.* zeigten, dass ein C-terminal-verkürztes ApoE4-Fragment, welches in AD-Gehirnen vorkommt, Alzheimer-ähnliche neurodegenerative Schädigungen *in vivo* auslöst. Des Weiteren können ApoE-Fragmente die intrazelluläre Akkumulation von A $\beta$ <sub>1-42</sub> fördern<sup>270</sup> und die Tau-Proteingestützte pathologische Symptomatik unterstützen<sup>271</sup>. Darüber hinaus sind die von Harris *et al.* gezeigten ApoE4-Fragmente hinsichtlich ihrer Größe mit dem in dieser Arbeit identifizierten Fragment vergleichbar. Huang *et al.* demonstrierten, dass ApoE4 in Neuronen durch eine intrazelluläre Proteolyse in ein bioaktives Fragment umgewandelt wird, welches anschließend über die Interaktion mit dem Zytoskelett

neurofibrilläre Tangles induziert. Diese enthielten sowohl phosphoryliertes Tau als auch phosphorylierte Neurofilamente.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob das identifizierte ApoE-Fragment aufgrund seiner Chromatin-gebundenen Lokalisation als Transkriptionsfaktor fungieren kann. Mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse und einer Edman-Sequenzierung konnte bereits eine mögliche Sequenz für das ApoE-Fragment identifiziert werden. Weitere Untersuchungen müssen klären, wie das spezifische ApoE-Fragment in den Zellkern gelangt und ob es über DNA-Bindung die Transkription verschiedener Gene beeinflussen kann. Durch die Funktion als Transkriptionsfaktor würde sich ein weiteres großes Spektrum an Regulationsmöglichkeiten durch ApoE hinsichtlich der AD ergeben.

#### 4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Isoform ApoE4 in den murinen N9-Mikroglia-Zellen zu einer diskoidalen Morphologie sowie zu einem gesteigerten Migrations- und Phagozytoseverhalten führt. Aufgrund der durch ApoE4 hervorgerufenen physiologischen Veränderungen in Mikroglia-Zellen entwickeln diese *in vitro* vermutlich einen „destruktiveren“ Phänotyp (pathogen aktivierte Mikroglia). *In vivo* könnte ein solches Verhalten zu einer erhöhten Immunreaktion und folglich zur Aufnahme und Abbau von geschädigten als auch gesunden Neuronen führen. Daher ist es denkbar, dass ApoE4-abhängig pathogen aktivierte Mikroglia intrinsisch durch ihren Phänotyp zu einem Fortschreiten der AD beitragen. Die weiterführenden Untersuchungen der hier gezeigten *in-vitro*-Ergebnisse sind daher von großer Bedeutung. Für die Bestätigung der ApoE4-abhängigen Veränderung des Mikroglia-Phänotyps sollten die dargelegten Ergebnisse zunächst in *in-vivo*-Studien bestätigt werden. Beispielsweise könnte eine potentielle ROCK1-Dysregulation in Mäusen mit humaner ApoE2/3/4-Expression untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Abnahme der ROCK1- und RhoA-Expression in N9.ApoE4-Zellen gezeigt werden. Die weitere Identifizierung des zu Grunde liegenden Mechanismus der ApoE4-bedingten Morphologie sowie des gesteigerten Migrations- und Phagozytoseverhaltens könnte durch einen Knockout und eine Überexpression von RhoA bzw. ROCK1 in N9.Wt-Zellen untersucht werden. Dazu könnten erneut Migrations-Assays sowie die bildgebende Durchflusszytometrie zum Einsatz kommen. Dies könnte im Anschluss bestätigen, dass ApoE4 die Expression

von ROCK1 über RhoA beeinflusst und somit zu den hier gezeigten physiologischen Veränderungen der murinen N9-Mikroglia-Zellen führt.

ApoE bindet des Weiteren an die Promotorbereiche von Mef2a, Bhlhe40 und Tfec und beeinflusst deren Promotoraktivität. Die Ergebnisse weisen demzufolge auf eine ApoE-Funktion als Transkriptionsfaktor hin. Zusätzlich konnte ein spezifisches ApoE-Fragment identifiziert werden, welches vermutlich eine Rolle als Transkriptionsfaktor spielt. Eine mögliche Sequenz für dieses ApoE-Fragment konnte mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen sowie einer Edman-Sequenzierung identifiziert werden. In Zukunft sollte die Synthese des spezifischen Fragments auf Grundlage der identifizierten Sequenz erfolgen. Mit Hilfe des synthetischen ApoE-Fragments könnte untersucht werden, ob es dazu in der Lage ist in den Zellkern zu gelangen. Des Weiteren sind DNA-Bindungsexperimente beispielsweise mit Hilfe eines ChiP-Assays sowie die Untersuchung der Beeinflussung der Promotoraktivität mittels Luciferase-Assay notwendig. Sollte sich bestätigen, dass das in dieser Arbeit identifizierte ApoE-Fragment als Transkriptionsfaktor fungiert, könnten umfangreiche RNA- und Proteinexpressionsanalysen klären, ob das Fragment als Suppressor oder als Aktivator fungiert. Durch die weitere Analyse dieser Daten könnte eine ApoE-abhängige Regulation spezifischer Gene von Mikroglia-Zellen auf transkriptionaler Ebene demonstriert werden.

Weitere Experimente könnten helfen, einen detaillierteren Einblick in die Rolle der ApoE-Isoformen, insbesondere der Isoform ApoE4, in der Pathologie der AD zu erhalten.

## Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Chiu IM, Morimoto ET, Goodarzi H, Liao JT, O'Keeffe S, Phatnani HP, Muratet M, Carroll MC, Levy S, Tavazoie S, Myers RM, Maniatis T.; A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Rep.* 2013 Jul 25;4(2):385-401. doi: 10.1016/j.celrep.2013.06.018
- <sup>2</sup> Krasemann S, Madore C, Cialic R, Baufeld C, Calcagno N, El Fatimy R, Beckers L, O'Loughlin E, Xu Y, Fanek Z, Greco DJ, Smith ST, Tweet G, Humulock Z, Zrzavy T, Conde-Sanroman P, Gacias M, Weng Z, Chen H, Tjon E, Mazaheri F, Hartmann K, Madi A, Ulrich JD, Glatzel M, Worthmann A, Heeren J, Budnik B, Lemere C, Ikezu T, Heppner FL, Litvak V, Holtzman DM, Lassmann H, Weiner HL, Ochando J, Haass C, Butovsky O; The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases; *Immunity.* 2017 Sep 19;47(3):566-581.e9. doi: 10.1016/j.immuni.2017.08.008.
- <sup>3</sup> Saba S; Safia, EH, and Snober S. Mir; Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions; *J Neurodegener Dis.* 2012 Dec 30; doi: 10.1155/2013/563481
- <sup>4</sup> Rubinsztein DC; The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration; *Nature.* 2006 Oct 19;443(7113):780-6. doi: 10.1038/nature05291
- <sup>5</sup> Soto C; Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases; *Nat Rev Neurosci.* 2003 Jan;4(1):49-60. doi: 10.1038/nrn1007
- <sup>6</sup> Levenson RW, Sturm VE, Haase CM; Emotional and behavioral symptoms in neurodegenerative disease: a model for studying the neural bases of psychopathology; *Annu Rev Clin Psychol.* 2014 Jan 15; 10:581-606. doi: 10.1146/annurev-clinpsy-032813-153653.
- <sup>7</sup> Jellinger KA; Alzheimer 100 highlights in the history of Alzheimer research; *J Neural Transm.* 2006 Nov;113(11):1603-23.; doi: 10.1007/s00702-006-0578-3
- <sup>8</sup> Alzheimer, A.: Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin.* 1907;64 Band, Verlag von Georg Reimer.
- <sup>9</sup> Maurer K, Volk S, Gerbaldo H; Auguste D and Alzheimer's disease; *Lancet.* 1997 May 24;349(9064):1546-9; doi: 10.1016/S0140-6736(96)10203-8
- <sup>10</sup> Blocq P., Marinesco G. (1892). Sur Les Lésions et la Pathologie de L'épilepsie Dite Essentielle. *La Semaine Médicale*, 445–446 (travail du laboratoire du Pr Charcot)
- <sup>11</sup> Measures of dementia and senile change; *Lancet.* 1969 Jan 11;1(7585):88-9
- <sup>12</sup> Zilka N, Novak M.; The tangled story of Alois Alzheimer; *Bratisl Lek Listy.* 2006;107(9-10):343-5.
- <sup>13</sup> Alzheimer's Association; 2016 Alzheimer's disease facts and figures; *Alzheimers Dement.* 2016 Apr;12(4):459-509.
- <sup>14</sup> Czech C, Tremp G, Pradier L.; Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms; *Prog Neurobiol.* 2000 Mar;60(4):363-84.
- <sup>15</sup> Mayeux R; Epidemiology of neurodegeneration; *Annu Rev Neurosci.* 2003 Jan 24;26:81-104.;doi: 10.1146/annurev.neuro.26.043002.094919
- <sup>16</sup> Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM.; Forecasting the global burden of Alzheimer's disease.; *Alzheimers Dement.* 2007 Jul;3(3):186-91. doi: 10.1016/j.jalz.2007.04.381.
- <sup>17</sup> Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW; Genetics of Alzheimer disease; *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2010 Dec;23(4):213-27. doi: 10.1177/0891988710383571.
- <sup>18</sup> Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, Thomas-Anterion C, Michon A, Martin C, Charbonnier F, Raux G, Camuzat A, Penet C, Mesnage V, Martinez M, Clerget-Darpoux F, Brice A, and Frebourg, T. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum; *J Hum Genet.* 1999 Sep; 65(3): 664–670; doi: 10.1086/302553
- <sup>19</sup> Rocca WA, Hofman A, Brayne C, Breteler MM, Clarke M, Copeland JR, Dartigues JF, Engedal K, Hagnell O, Heeren TJ, et al.; Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group; *Ann Neurol.* 1991 Sep;30(3):381-90.
- <sup>20</sup> Villars H, Gillioz AS, Hein C, Voisin T, Nourhashemi F, Soto ME, Arbus C, Ousset PJ, Vellas B; [Alzheimer's disease and syndromes related to the severe stage]; *Rev Neurol.* 2008 Apr;164 Spec No 2:F98-106.
- <sup>21</sup> Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczuzfca M; Alzheimer's Disease International; Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study; *Lancet.* 2005 Dec 17;366(9503):2112-7, doi: 10.1016/S0140-6736(05)67889-0

- <sup>22</sup> Qiu Ch, Kivipelto M, von Strauss E, Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention; *Dialogues Clin Neurosci*. 2009 Jun; 11(2): 111–128.
- <sup>23</sup> Cummings JL; Treatment of Alzheimer's disease: current and future therapeutic approaches; *Rev Neurol Dis*. 2004 Spring;1(2):60-9.
- <sup>24</sup> Gauthier S; Alzheimer's disease: current and future therapeutic perspectives; *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2001 Jan;25(1):73-89.
- <sup>25</sup> Hardy J, Selkoe DJ; The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics; *Science*. 2002 Jul 19;297(5580):353-6.
- <sup>26</sup> 2017 Alzheimer's disease facts and figures; *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*; Volume 13, Issue 4, Pages (April 2017) DOI: /j.jalz
- <sup>27</sup> Kochanek KD, Murphy SL, Xu J, Tejada-Vera B.; Deaths: Final Data for 2014; *Natl Vital Stat Rep*. 2016 Jun;65(4):1-122.
- <sup>28</sup> World Health Organization. (2004). ICD-10 : international statistical classification of diseases and related health problems : tenth revision, 2nd ed. Geneva : World Health Organization.
- <sup>29</sup> *Alzheimers Dement*. 2016 Mar;12(3):292-323. doi: 10.1016/j.jalz.2016.02.002. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria.
- <sup>30</sup> Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S, Bakardjian H, Benali H, Bertram L, Blennow K, Broich K, Cavado E, Crutch S, Dartigues JF, Duyckaerts C, Epelbaum S, Frisoni GB, Gauthier S, Genthon R, Gouw AA, Habert MO, Holtzman DM, Kivipelto M, Lista S, Molinuevo JL, O'Bryant SE, Rabinovici GD, Rowe C, Salloway S, Schneider LS, Sperling R, Teichmann M, Carrillo MC, Cummings J, Jack CR Jr; Proceedings of the Meeting of the International Working Group (IWG) and the American Alzheimer's Association on "The Preclinical State of AD"; July 23, 2015; Washington DC, USA; DOI: 10.1016/j.jalz.2016.02.002
- <sup>31</sup> Russo C, Venezia V, Repetto E, Nizzari M, Violani E, Carlo P, Schettini G.; The amyloid precursor protein and its network of interacting proteins: physiological and pathological implications; *Brain Res Brain Res Rev*. 2005 Apr;48(2):257-64.
- <sup>32</sup> Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S, Bakardjian H, Benali H, Bertram L, Blennow K, Broich K, Cavado E, Crutch S, Dartigues JF, Duyckaerts C, Epelbaum S, Frisoni GB, Gauthier S, Genthon R, Gouw AA, Habert MO, Holtzman DM, Kivipelto M, Lista S, Molinuevo JL, O'Bryant SE, Rabinovici GD, Rowe C, Salloway S, Schneider LS, Sperling R, Teichmann M, Carrillo MC, Cummings J, Jack CR Jr; Proceedings of the Meeting of the International Working Group (IWG) and the American Alzheimer's Association on "The Preclinical State of AD"; July 23, 2015; Washington DC, USA; Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria; *Alzheimers Dement*. 2016 Mar;12(3):292-323. doi: 10.1016/j.jalz.2016.02.002.
- <sup>33</sup> Bracco L, Gallato R, Grigoletto F, Lippi A, Lepore V, Bino G, Lazzaro MP, Carella F, Piccolo T, Pozzilli C, et al.; Factors affecting course and survival in Alzheimer's disease. A 9-year longitudinal study; *Arch Neurol*. 1994 Dec;51(12):1213-9.
- <sup>34</sup> Maurer K, Hoyer S. Alois Alzheimer revisited: differences in origin of the disease carrying his name; *Journal of Neural Transmission*. 113(11):1645–1658, NOV 2006  
DOI: 10.1007/s00702-006-0592-5
- <sup>35</sup> Ma J, Yee A, Brewer HB Jr, Das S, Potter H.; Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments; *Nature*. 1994 Nov 3;372(6501):92-4.
- <sup>36</sup> He Z, Guo JL, McBride JD, Narasimhan S, Kim H, Changolkar L, Zhang B, Gathagan RJ, Yue C, Dengler C, Stieber A, Nitta M, Coulter DA, Abel T, Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM; Amyloid-β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation; *Nat Med*. 2018 Jan;24(1):29-38. doi: 10.1038/nm.4443.
- <sup>37</sup> Abramov AY, Canevari L, Duchon MR.; Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase; *J Neurosci*. 2004 Jan 14;24(2):565-75. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4042-03.2004
- <sup>38</sup> Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA.; Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease; *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001 Aug;60(8):759-67
- <sup>39</sup> Swerdlow RH, and Khan SM. The Alzheimer's Disease Mitochondrial Cascade Hypothesis: An Update; *Exp Neurol*. 2009 Aug; 218(2): 308–315. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.01.011
- <sup>40</sup> Launer LJ, Andersen K, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Amaducci LA, Brayne C, Copeland JR, Dartigues JF, Kragh-Sorensen P, Lobo A, Martinez-Lage JM, Stijnen T, Hofman A.; Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. *European Studies of Dementia; Neurology*. 1999 Jan 1;52(1):78-84.
- <sup>41</sup> Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA.; Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families; *Science*. 1993 Aug 13;261(5123):921-3.
- <sup>42</sup> Vélez JI, Lopera F, Sepulveda-Falla D, Patel HR, Johar AS, Chuah A, Tobón C, Rivera D, Villegas A, Cai Y, Peng K, Arkell R, Castellanos FX, Andrews SJ, Silva Lara MF1, Creagh PK, Easteal S, de Leon J, Wong ML, Licinio J, Mastronardi CA, Arcos-Burgos M.; APOE\*E2 allele delays age of onset in PSEN1 E280A Alzheimer's disease; *Mol Psychiatry*. 2016 Jul;21(7):916-24. doi: 10.1038/mp.2015.177. Epub 2015 Dec 1.

- <sup>43</sup> Wang D, Chalk JB, Rose SE, de Zubicaray G, Cowin G, Galloway GJ, Barnes D, Spooner D, Doddrell DM, Semple J.; MR image-based measurement of rates of change in volumes of brain structures. Part II: application to a study of Alzheimer's disease and normal aging; *Magn Reson Imaging*. 2002 Jan;20(1):41-8.
- <sup>44</sup> De Strooper B, Annaert W.; Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein; *J Cell Sci*. 2000 Jun;113 (Pt 11):1857-70.
- <sup>45</sup> <https://journals.lww.com/neurotodayonline/blog/breakingnews/Pages/post.aspx?PostID=363>
- <sup>46</sup> Pastorino L, Lu KP.; Pathogenic mechanisms in Alzheimer's disease; *Eur J Pharmacol*. 2006 Sep 1;545(1):29-38.
- <sup>47</sup> Daigle I, Li C.; *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 15;90(24):12045-9.
- <sup>48</sup> Moechars D, Lorent K, De Strooper B, Dewachter I, Van Leuven F.; Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the alpha-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice; *EMBO J*. 1996 Mar 15;15(6):1265-74.
- <sup>49</sup> Müller UC, Zheng H.; Physiological functions of APP family proteins; *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Feb;2(2):a006288. doi: 10.1101/cshperspect.a006288.
- <sup>50</sup> O'Brien RJ, Wong P; Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci*. 2011; 34: 185–204. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113613
- <sup>51</sup> Selkoe DJ; American College of Physicians; American Physiological Society.; Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies; *Ann Intern Med*. 2004 Apr 20;140(8):627-38.
- <sup>52</sup> Selkoe DJ; Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases; *Nat Cell Biol*. 2004 Nov;6(11):1054-61.
- <sup>53</sup> Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ; Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jun;83(11):4044-8.
- <sup>54</sup> Selkoe DJ, Ihara Y, Salazar FJ; Alzheimer's disease: insolubility of partially purified paired helical filaments in sodium dodecyl sulfate and urea. *Science*. 1982 Mar 5;215(4537):1243-5.
- <sup>55</sup> Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ; Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci*. 2001; 24:1121-59. DOI: 10.1146/annurev.neuro.24.1.1121
- <sup>56</sup> Goedert M. Tau protein and neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol*. 2004 Feb;15(1):45-9.
- <sup>57</sup> Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 May;72(5):1858-62.
- <sup>58</sup> Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res*. 2010 Dec;7(8):656-64.
- <sup>59</sup> Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron*. 1993 Jun;10(6):1089-99.
- <sup>60</sup> Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 5;98(12):6923-8. Epub 2001 May 29.
- <sup>61</sup> Gendreau KL, Hall GF. Tangles, Toxicity, and Tau Secretion in AD - New Approaches to a Vexing Problem. *Front Neurol*. 2013 Oct 21;4:160. doi: 10.3389/fneur.2013.00160.
- <sup>62</sup> Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res*. 2001 Sep-Oct;32(5):367-81.
- <sup>63</sup> Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi T, Borowsky M, Wang L, Means TK, and El Khoury J. The Microglial Sensome Revealed by Direct RNA Sequencing *Nat Neurosci*. 2013 Dec; 16(12): 1896–1905. Published online 2013 Oct 27. doi: 10.1038/nn.3554
- <sup>64</sup> Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, David E, Baruch K, Lara-Astaiso D, Toth B, Itzkovitz S, Colonna M, Schwartz M, Amit I. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*. 2017 Jun 15;169(7):1276-1290.e17. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.018. Epub 2017 Jun 8.
- <sup>65</sup> Gehrman J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev*. 1995 Mar;20(3):269-87.
- <sup>66</sup> Bildrechte: Hannah Laccarino, Anthony Martorell
- <sup>67</sup> Carson MJ, Thrash JC, Lo D. Analysis of microglial gene expression: identifying targets for CNS neurodegenerative and autoimmune disease. *Am J Pharmacogenomics*. 2004;4(5):321-30.

- <sup>68</sup> Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*. 2007 Nov;10(11):1387-94.
- <sup>69</sup> Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996 Aug;19(8):312-8.
- <sup>70</sup> Robertson W. 1900. A microscopic demonstration of the normal and pathological histology of mesoglia cells. *J Ment Sci* 46:733–52.
- <sup>71</sup> Nissl F. 1899. Ueber einige Beziehungen zwischen Nerven zellerkrankungen und gliosen Erscheinungen bei verschiedenen Psychosen. *Arch Psychiat* 32:1–21.
- <sup>72</sup> Río-Hortega P. (1932). Estructura y Sistematización de los Gliomas y Paragliomas. *Arch. Esp. De Oncología*, I. I., 411–677.
- <sup>73</sup> Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev*. 2004 Oct;17(4):942-64, table of contents.
- <sup>74</sup> Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011 Apr;91(2):461-553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010.
- <sup>75</sup> Cuadros Miguel A., Claude Martin, Pierre Coltey, Antonio Almindros, Dr. Julio Navascués First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. May 1993. *The Journal of Comparative Neurology* 330(1):113-29 DOI: 10.1002/cne.903300110
- <sup>76</sup> Alliot F, Godin I, Pessac B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 1999 Nov 18;117(2):145-52.
- <sup>77</sup> Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev*. 2007 Feb;53(2):344-54. Epub 2006 Dec 26.
- <sup>78</sup> Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*. 2011 Sep 9;333(6048):1456-8. doi: 10.1126/science.1202529. Epub 2011 Jul 21.
- <sup>79</sup> Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, Owen DR, Durafourt BA, Bar-Or A, Antel JP, Moore CS. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain*. 2015 May;138(Pt 5):1138-59. doi: 10.1093/brain/awv066.
- <sup>80</sup> Imamoto K, Leblond CP. Radioautographic investigation of gliogenesis in the corpus callosum of young rats. II. Origin of microglial cells. *J Comp Neurol*. 1978 Jul 1;180(1):139-63.
- <sup>81</sup> Haas S, Brockhaus J, Verkhratsky A, Kettenmann H. ATP-induced membrane currents in amoeboid microglia acutely isolated from mouse brain slices. *Neuroscience*. 1996 Nov;75(1):257-61.
- <sup>82</sup> Ling EA, Wong WC. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*. 1993 Jan;7(1):9-18.
- <sup>83</sup> Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005 May 27;308(5726):1314-8. Epub 2005 Apr 14.
- <sup>84</sup> Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W & Rossi FMV; Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life; *Nature Neuroscience* volume 10, pages 1538–1543 (2007)
- <sup>85</sup> Stence N, Waite M, Dailey ME. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*. 2001 Mar 1;33(3):256-66.
- <sup>86</sup> Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol*. 1999 Apr;57(6):563-81.
- <sup>87</sup> Lynch MA. The multifaceted profile of activated microglia. *Mol Neurobiol*. 2009 Oct;40(2):139-56. doi: 10.1007/s12035-009-8077-9. Epub 2009 Jul 23.
- <sup>88</sup> Colton C, Wilcock DM. Assessing activation states in microglia. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010 Apr;9(2):174-91.
- <sup>89</sup> Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2009 Dec;4(4):399-418. doi: 10.1007/s11481-009-9164-4. Epub 2009 Aug 5.
- <sup>90</sup> Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Jan;8(1):57-69.
- <sup>91</sup> Le W, Rowe D, Xie W, Ortiz I, He Y and Appel SH. Microglial Activation and Dopaminergic Cell Injury: An In Vitro Model Relevant to Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience* 1 November 2001, 21 (21) 8447-8455; DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-21-08447.2001>
- <sup>92</sup> Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *FASEB J*. 2003 Oct;17(13):1954-6. Epub 2003 Aug 1.
- <sup>93</sup> Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2016 Mar;53(2):1181-94. doi: 10.1007/s12035-014-9070-5. Epub 2015 Jan 20.

- <sup>94</sup> Ransohoff, RM; A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist?; *Nature Neuroscience* volume 19, pages 987–991 (2016)
- <sup>95</sup> Bernardi R, Heredia F, Salgado N, Muñoz P. Microglia Function in the Normal Brain. *Glial Cells in Health and Disease of the CNS. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016; vol 949. Springer, Cham
- <sup>96</sup> Nakagawa and Chiba. Role of Microglial M1/M2 Polarization in Relapse and Remission of Psychiatric Disorders and Diseases. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2014 Dec; 7(12): 1028–1048. Published online 2014 Nov 25. doi: 10.3390/ph7121028
- <sup>97</sup> Kim SU, de Vellis J. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res*. 2005 Aug 1;81(3):302-13.DOI: 10.1002/jnr.20562
- <sup>98</sup> Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron*. 2004 Feb 19;41(4):535-47.
- <sup>99</sup> Ramírez BG, Blázquez C, Gómez del Pulgar T, Guzmán M, de Ceballos ML. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci*. 2005 Feb 23;25(8):1904-13.
- <sup>100</sup> Chen Z, Trapp BD. Microglia and neuroprotection. *J Neurochem*. 2016 Jan;136 Suppl 1:10-7. doi: 10.1111/jnc.13062. Epub 2015 Mar 10.
- <sup>101</sup> Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:367-402. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120240. Epub 2014 Jan 22.
- <sup>102</sup> Freeman WH, Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P Baltimore D, and Darnell J. 2000. New York. *Molecular Cell Biology*, 4th edition
- <sup>103</sup> Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. 2005 Jun;8(6):752-8. Epub 2005 May 15.
- <sup>104</sup> Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci*. 2003 Feb 15;23(4):1398-405.
- <sup>105</sup> Schwab JM, Nguyen TD, Meyermann R, Schluesener HJ. Human focal cerebral infarctions induce differential lesional interleukin-16 (IL-16) expression confined to infiltrating granulocytes, CD8+ T-lymphocytes and activated microglia/macrophages. *J Neuroimmunol*. 2001 Mar 1;114(1-2):232-41.
- <sup>106</sup> Ifuku H, Moriyama K, Arai K, Shiraishi-Hichiwa Y. Regulation of cardiac function during a cold pressor test in athletes and untrained subjects. *Eur J Appl Physiol*. 2007 Sep;101(1):75-9. Epub 2007 May 10.
- <sup>107</sup> Mosser CA, Baptista S, Arnoux I, Audinat E. Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. *Prog Neurobiol*. 2017 Feb - Mar;149-150:1-20. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.01.002. Epub 2017 Jan 28.
- <sup>108</sup> Horvath RJ, Nutile-McMenemy N, Alkaitis MS, and De Leo JA. Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures Published online 2008 Sep 18. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05633.x *J Neurochem*. 2008 Oct; 107(2): 557–569.
- <sup>109</sup> Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*. 1996 Feb 9;84(3):359-69.
- <sup>110</sup> Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain*. 2009 Feb;132(Pt 2):288-95. doi: 10.1093/brain/awn109. Epub 2008 Jun 20.
- <sup>111</sup> Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SW, Barres BA. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*. 2007 Dec 14;131(6):1164-78.
- <sup>112</sup> Napoli I, Neumann H. Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience*. 2009 Feb 6;158(3):1030-8. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.046. Epub 2008 Jul 1.
- <sup>113</sup> Hanisch, Marco Prinz, Klemens Angstwurm, Karl Georg Häusler, Oliver Kann, Helmut Kettenmann and Joerg R. Weber The protein tyrosine kinase inhibitor AG126 prevents the massive microglial cytokine induction by pneumococcal cell walls. *Eur. J. Immunol*. 2001. 31: 2104–2115
- <sup>114</sup> Häusler KG, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Schumann RR, Kettenmann H, Hanisch UK. Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *Eur J Neurosci*. 2002 Dec;16(11):2113-22.
- <sup>115</sup> Fetter L, Amigorena S. *Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. Science*. 2005 Jul 15;309(5733):392-3.
- <sup>116</sup> Lottspeich, F. und Engels, J.W.; *Bioanalytik; Spektrum Akademischer Verlag*, 2. Auflage 2006, ISBN 3-8274-1520-9
- <sup>117</sup> Mandrekar S, Jiang Q, Lee CY, Koenigsnecht-Talboo J, Holtzman DM, Landreth GE. Microglia mediate the clearance of soluble Aβ through fluid phase macropinocytosis. *J Neurosci*. 2009 Apr 1;29(13):4252-62. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5572-08.2009.
- <sup>118</sup> verändert nach Villarreal; <https://en.wikipedia.org/wiki/Endocytosis>

- <sup>119</sup> Fu R, Shen Q, Xu P, Luo JJ, Tang Y. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol Neurobiol*. 2014 Jun;49(3):1422-34. doi: 10.1007/s12035-013-8620-6. Epub 2014 Jan 7.
- <sup>120</sup> Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saido TC, Hsiao K, Cole GM. Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol*. 1998 Jan;152(1):307-17.
- <sup>121</sup> Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem*. 1998 Dec 4;273(49):32730-8.
- <sup>122</sup> Walker DG, Lue LF. Investigations with cultured human microglia on pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *J Neurosci Res*. 2005 Aug 1;81(3):412-25.
- <sup>123</sup> Meyer-Luehmann M, Spiess-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, Rozkayne A, Koenigsnecht-Talboo J, Holtzman DM, Bacskai BJ, Hyman BT. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2008 Feb 7;451(7179):720-4. doi: 10.1038/nature06616.
- <sup>124</sup> Bolmont T, Haiss F, Eicke D, Radde R, Mathis CA, Klunk WE, Kohsaka S, Jucker M, Calhoun ME. Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J Neurosci*. 2008 Apr 16;28(16):4283-92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4814-07.2008.
- <sup>125</sup> Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med*. 2000 Aug;6(8):916-9.
- <sup>126</sup> Rogers J, Strohmeier R, Kovelowski CJ, Li R. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia*. 2002 Nov;40(2):260-9.
- <sup>127</sup> D'Andrea MR, Cole GM, Ard MD. The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain. *Neurobiol Aging*. 2004 May-Jun;25(5):675-83.
- <sup>128</sup> Takaki Y, Iwata N, Tsubuki S, Taniguchi S, Toyoshima S, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Lee HJ, Shirovani K, Saido TC. Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid beta peptide in the brain. *J Biochem*. 2000 Dec;128(6):897-902.
- <sup>129</sup> 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 Jan;160(1):101-12.
- <sup>130</sup> Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH. Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet*. 2006 May 1;15(9):1437-49. Epub 2006 Mar 21.
- <sup>131</sup> El Khoury J, Luster AD. Mechanisms of microglia accumulation in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Trends Pharmacol Sci*. 2008 Dec;29(12):626-32. doi: 10.1016/j.tips.2008.08.004. Epub 2008 Oct 1.
- <sup>132</sup> Hickman SE, Allison EK, El Khoury J. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci*. 2008 Aug 13;28(33):8354-60. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0616-08.2008.
- <sup>133</sup> Butovsky O, Jedrychowski MP, Cialic R, Krasemann S, Murugaiyan G, Fanek Z, Greco DJ, Wu PM, Doykan CE, Kiner O, Lawson RJ, Frosch MP, Pochet N, Fatimy RE, Krichevsky AM, Gygi SP, Lassmann H, Berry J, Cudkowicz ME, Weiner HL. Targeting miR-155 restores abnormal microglia and attenuates disease in SOD1 mice. *Ann Neurol*. 2015 Jan;77(1):75-99. doi: 10.1002/ana.24304. Epub 2014 Nov 27.
- <sup>134</sup> Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi T, Borowsky M, Wang L, Means TK and El Khoury J. The Microglial Senses Revealed by Direct RNA Sequencing. *Nat Neurosci*. 2013 Dec; 16(12): 1896–1905. Published online 2013 Oct 27. doi: 10.1038/nn.3554
- <sup>135</sup> Shore VG, Shore B. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry*. 1973 Jan 30;12(3):502-7.
- <sup>136</sup> Huang Y and Mahley RW. Apolipoprotein E: Structure and Function in Lipid Metabolism, Neurobiology, and Alzheimer's Diseases *Neurobiol Dis*. 2014 Dec; 72PA: 3–12. Published online 2014 Aug 27. doi: 10.1016/j.nbd.2014.08.025
- <sup>137</sup> Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988 Apr 29;240(4852):622-30.
- <sup>138</sup> Nakai M, Kawamata T, Taniguchi T, Maeda K, Tanaka C. Expression of apolipoprotein E mRNA in rat microglia. *Neurosci Lett*. 1996 Jun 14;211(1):41-4.
- <sup>139</sup> Stone, D. J., Rozovsky, I., Morgan, T. E., Anderson, C. P., Hajian, H., and Finch, C. E. Increased synaptic sprouting in response to estrogen via an apolipoprotein E-dependent mechanism: implications for Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 18: 3180–3185. June 1998 *The Journal of Neuroscience* 18(9):3180-5
- <sup>140</sup> Xu Q, Li Y, Cyras C, Sanan DA, Cordell B. Isolation and characterization of apolipoproteins from murine microglia. Identification of a low density lipoprotein-like apolipoprotein J-rich but E-poor spherical particle. *J Biol Chem*. 2000 Oct 13;275(41):31770-7.

- <sup>141</sup> Diedrich JF, Minnigan H, Carp RI, Whitaker JN, Race R, Frey W 2nd, Haase AT. Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J Virol.* 1991 Sep;65(9):4759-68.
- <sup>142</sup> Poiriera; Hess; May; Finch. Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Brain Res Mol Brain Res.* 1991.
- <sup>143</sup> Jordan CA, Watkins BA, Kufta C, and Dubois-Dalcq M. Infection of brain microglial cells by human immunodeficiency virus type 1 is CD4 dependent. *J Virol.* 1991 Feb; 65(2): 736–742.
- <sup>144</sup> Jhou JF and Tai HC. The Study of Postmortem Human Synaptosomes for Understanding Alzheimer's Disease and Other Neurological Disorders: A Review. *Neurol Ther.* 2017 Jul; 6(Suppl 1): 57–68.
- <sup>146</sup> Getz GS, Reardon CA. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl:S156-61. doi: 10.1194/jlr.R800058-JLR200. Epub 2008 Nov 18.
- <sup>147</sup> Liu CC, Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol.* 2013 Feb;9(2):106-18. doi: 10.1038/nrneurol.2012.263. Epub 2013 Jan 8.
- <sup>148</sup> Rao S, Ghani M, Guo Z, Deming Y, Wang K, Sims R, Mao C, Yao Y, Cruchaga C, Stephan DA, Rogava E. An APOE-independent cis-eSNP on chromosome 19q13.32 influences tau levels and late-onset Alzheimer's disease risk. *Neurobiol Aging.* 2018 Jun; 66:178.e1-178.e8. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.12.027.
- <sup>149</sup> Herz J, Bock HH. Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu Rev Biochem.* 2002; 71:405-34. Epub 2001 Nov 9.
- <sup>150</sup> Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 1988 Apr 29;240(4852):622-30.
- <sup>151</sup> Mahley RW, Huang Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol.* 1999 Jun;10(3):207-17.
- <sup>152</sup> Mahley RW, Huang Y. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):94-8.
- <sup>153</sup> Mahley RW, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res.* 1999 Jan;40(1):1-16.
- <sup>154</sup> Godfrey S. Getz and Catherine A. Reardon Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J Lipid Res.* 2009 Apr; 50(Suppl): S156–S161. doi: 10.1194/jlr.R800058-JLR200
- <sup>155</sup> Robert L. Raffai, Alyssa H. Hasty, Yuwei Wang, Shelley E. Mettle, David A. Sanan, MacRae F. Linton, Sergio Fazio, and Karl H. Weisgraber. Hepatocyte-derived ApoE Is More Effective than Non-hepatocyte-derived ApoE in Remnant Lipoprotein Clearance\* Received for publication, December 18, 2002, and in revised form, January 23, 2003 Published, JBC Papers in Press, January 27, 2003, DOI 10.1074/jbc.M212873200
- <sup>156</sup> Huang Y. Abeta-independent roles of apolipoprotein E4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med.* 2010 Jun;16(6):287-94. doi: 10.1016/j.molmed.2010.04.004. Epub 2010 May 27.
- <sup>157</sup> Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell.* 2012 Mar 16;148(6):1204-22. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.040.
- <sup>158</sup> Roses AD. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu Rev Med.* 1996;47:387-400.
- <sup>159</sup> Benarroch EE. Brain cholesterol metabolism and neurologic disease. *Neurology.* 2008 Oct 21;71(17):1368-73. doi: 10.1212/01.wnl.0000333215.93440.36.
- <sup>160</sup> Mahley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2000;1:507-37.
- <sup>161</sup> Hoek KS, Schlegel NC, Eichhoff OM, Widmer DS, Praetorius C, Einarsson SO, Valgeirsdottir S, Bergsteinsdottir K, Schepsky A, Dummer R, Steingrimsso E. Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008 Dec;21(6):665-76. doi: 10.1111/j.1755-148X.2008.00505.x.
- <sup>162</sup> Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell.* 2001 Jan;7(1):161-71.
- <sup>163</sup> Nickerson DA, Taylor SL, Fullerton SM, Weiss KM, Clark AG, Stengård JH, Salomaa V, Boerwinkle E, Sing CF. Sequence diversity and large-scale typing of SNPs in the human apolipoprotein E gene. *Genome Res.* 2000 Oct;10(10):1532-45.
- <sup>164</sup> Frieden C, Garai K. Structural differences between apoE3 and apoE4 may be useful in developing therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jun 5;109(23):8913-8. doi: 10.1073/pnas.1207022109. Epub 2012 May 21.

- <sup>165</sup> Ning Zhong and Karl H. Weisgraber. Understanding the Association of Apolipoprotein E4 with Alzheimer Disease: Clues from Its Structure. *J Biol Chem*. 2009 Mar 6; 284(10): 6027–6031. doi: 10.1074/jbc.R800009200
- <sup>166</sup> Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993 Aug 13;261(5123):921-3.
- <sup>167</sup> Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*. 1997 Oct 22-29;278(16):1349-56.
- <sup>168</sup> Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron*. 1993 Oct;11(4):575-80.
- <sup>169</sup> Phillips MC. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life*. 2014 Sep;66(9):616-23. doi: 10.1002/iub.1314.
- <sup>170</sup> Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res*. 1991 Feb 8;541(1):163-6.
- <sup>171</sup> Ellis RJ, Olichney JM, Thal LJ, Mirra SS, Morris JC, Beekly D, Heyman A. Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease  
The CERAD experience, part XV. *NEUROLOGY* 1996;46: 1592-1596
- <sup>172</sup> Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Oct 15;90(20):9649-53.
- <sup>173</sup> Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ, Piccardo P, Ghetti B, Paul SM. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet*. 1997 Nov;17(3):263-4.
- <sup>174</sup> Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Goedert M, Saunders AM, Huang D, Corder EH, Dong LM, Jakes R, Alberts MJ, Gilbert JR, et al. Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype. *Exp Neurol*. 1994 Feb;125(2):163-71; discussion 172-4.
- <sup>175</sup> Holtzman DM, Herz J, Bu G. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Mar;2(3):a006312. doi: 10.1101/cshperspect.a006312.
- <sup>176</sup> Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 11;103(15):5644-51. Epub 2006 Mar 27.
- <sup>177</sup> <https://library.med.utah.edu/WebPath/CNSHTML/CNSIDX.html#9>
- <sup>178</sup> Bales KR, Du Y, Holtzman D, Cordell B, Paul SM. Neuroinflammation and Alzheimer's disease: critical roles for cytokine/Abeta-induced glial activation, NF-kappaB, and apolipoprotein E. *Neurobiol Aging*. 2000 May-Jun;21(3):427-32; discussion 451-3.
- <sup>179</sup> Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, Van Eldik LJ. Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res*. 1998 Mar 2;785(2):195-206.
- <sup>181</sup> Barger SW, Harmon AD. Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature*. 1997 Aug 28;388(6645):878-81.
- <sup>182</sup> Colton CA, Needham LK, Brown C, Cook D, Rasheed K, Burke JR, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Vitek MP. APOE genotype-specific differences in human and mouse macrophage nitric oxide production. *J Neuroimmunol*. 2004 Feb;147(1-2):62-7.
- <sup>183</sup> Lynch JR, Tang W, Wang H, Vitek MP, Bennett ER, Sullivan PM, Warner DS, Laskowitz DT. APOE genotype and an ApoE-mimetic peptide modify the systemic and central nervous system inflammatory response. *J Biol Chem*. 2003 Dec 5;278(49):48529-33. Epub 2003 Sep 24.
- <sup>184</sup> <https://www.semanticscholar.org/paper/Biomolecular-gradients-in-cell-culture-systems.-Keenan-Folch/37a4ccad74ac475d33e52ae4669608554a876cb2>
- <sup>185</sup> <https://ibidi.com/removable-chambers/25-25-culture-inserts-2-well-for-self-insertion.html>
- <sup>186</sup> Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglspenger T, Dake B, Wu PM, Doykan CE, Fanek Z, Liu L, Chen Z, Rothstein JD5, Ransohoff RM, Gygi SP2, Antel JP, Weiner HL. Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci*. 2014 Jan;17(1):131-43. doi: 10.1038/nn.3599. Epub 2013 Dec 8.
- <sup>187</sup> [www.transgen.de](http://www.transgen.de)
- <sup>188</sup> Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science*. 1997 Feb 28;275(5304):1308-11.

- <sup>189</sup> Amano M, Nakayama M, and Kaibuchi K. Rho-Kinase/ROCK: A Key Regulator of the Cytoskeleton and Cell Polarity. *Cytoskeleton* (Hoboken). 2010 Sep; 67(9): 545–554. Published online 2010 Aug 10. doi: 10.1002/cm.20472
- <sup>190</sup> Theendakara V, Peters-Libeu CA, Spilman P, Poksay KS, Bredesen DE, Rao RV. Direct Transcriptional Effects of Apolipoprotein E. *J Neurosci*. 2016 Jan 20;36(3):685-700. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3562-15.2016.
- <sup>191</sup> Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem*. 2007 Feb 23;282(8):5101-5. Epub 2006 Dec 14.
- <sup>192</sup> Xu Q, Bernardo A, Walker D, Kanegawa T, Mahley RW, Huang Y. Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *J Neurosci*. 2006 May 10;26(19):4985-94.
- <sup>193</sup> Stansley B, Post J, Hensley K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2012 May 31;9:115. doi: 10.1186/1742-2094-9-115.
- <sup>194</sup> Kierdorf K, Prinz M. Factors regulating microglia activation. *Front Cell Neurosci*. 2013 Apr 23;7:44. doi: 10.3389/fncel.2013.00044. eCollection 2013.
- <sup>195</sup> Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubczik C, Ivanov S, Helft J, Chow A, Elpek KG, Gordonov S, Mazloom AR, Ma'ayan A, Chua WJ, Hansen TH, Turley SJ, Merad M, Randolph GJ; Immunological Genome Consortium. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol*. 2012 Nov;13(11):1118-28. doi: 10.1038/ni.2419. Epub 2012 Sep 30.
- <sup>196</sup> Holtman IR, Raj DD, Miller JA, Schaafsma W, Yin Z, Brouwer N, Wes PD, Möller T, Orre M, Kamphuis W, Hol EM, Boddeke EW, Eggen BJ. Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis. *Acta Neuropathol Commun*. 2015 May 23;3:31. doi: 10.1186/s40478-015-0203-5.
- <sup>197</sup> Fan J, Zhao RQ, Parro C, Zhao W, Chou HY, Robert J, Deeb TZ, Raynoschek C, Barichievy S, Engkvist O, Maresca M, Hicks R, Mueller J, Moss SJ, Brandon NJ, Wood MW, Kulic I, Wellington CL. Small molecule inducers of ABCA1 and apoE that act through indirect activation of the LXR pathway. *J Lipid Res*. 2018 May;59(5):830-842. doi: 10.1194/jlr.M081851. Epub 2018 Mar 21.
- <sup>198</sup> Lu R, Ito J, Iwamoto N, Nishimaki-Mogami T, Yokoyama S. FGF-1 induces expression of LXRalpha and production of 25-hydroxycholesterol to upregulate the apoE gene in rat astrocytes. *J Lipid Res*. 2009 Jun;50(6):1156-64. doi: 10.1194/jlr.M800594-JLR200. Epub 2009 Feb 19.
- <sup>199</sup> Alexis Y. Carter, Florent Letronne, Nicholas F. Fitz, Anais Mounier, Cody M. Wolfe, Kyong Nyon Nam, Valerie L. Reeves, Hafsa Kamboh, Iliya Lefterov, and Radosveta Koldamova. Liver X receptor agonist treatment significantly affects phenotype and transcriptome of APOE3 and APOE4 Abca1 haplo-deficient mice. *PLoS One*. 2017; 12(2): e0172161. Published online 2017 Feb 27. doi: 10.1371/journal.pone.0172161
- <sup>200</sup> Koli K, Keski-Oja J. Transforming growth factor-beta system and its regulation by members of the steroid-thyroid hormone superfamily. *Adv Cancer Res*. 1996;70:63-94.
- <sup>201</sup> Horbelt D, Denkis A, Knaus P. A portrait of Transforming Growth Factor  $\beta$  superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 Mar;44(3):469-74. doi: 10.1016/j.biocel.2011.12.013. Epub 2011 Dec 31.
- <sup>202</sup> Bernhardt R, Cornejo F, Parada GE, and Eugenín J. Role of TGF $\beta$  signaling in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci*. 2015; 9: 426. Published online 2015 Oct 28. doi: 10.3389/fncel.2015.00426
- <sup>203</sup> Singh NN, Ramji DP. Transforming growth factor-beta-induced expression of the apolipoprotein E gene requires c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase, and casein kinase 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Jun;26(6):1323-9. Epub 2006 Apr 6.
- <sup>204</sup> Figueiredo-Pereira M, Corwin C, and Babich J. Prostaglandin J2: a potential target for halting inflammation-induced neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 2016 Jan; 1363(1): 125–137. Published online 2016 Jan 8. doi: 10.1111/nyas.12987
- <sup>205</sup> Czirr E, Wyss-Coray T. The immunology of neurodegeneration. *J Clin Invest*. 2012 Apr;122(4):1156-63. doi: 10.1172/JCI58656. Epub 2012 Apr 2.
- <sup>206</sup> Bernardo A, Ajmone-Cat MA, Levi G and Minghetti L. 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 regulates the functional state and the survival of microglial cells through multiple molecular mechanisms. *JNC*, Volume87, Issue3. November 2003, Pages 742-751
- <sup>207</sup> Liu B, Gao HM, Hong JS. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. *Environ Health Perspect*. 2003 Jun;111(8):1065-73.
- <sup>208</sup> Dahabreh DF and Medh JD. Activation of peroxisome proliferator activated receptor-gamma results in an atheroprotective apolipoprotein profile in HepG2 cells. *Adv Biol Chem*. 2012 Aug 22; 2(3): 218–225. doi: 10.4236/abc.2012.23026
- <sup>209</sup> Werb Z, Chin JR, Takemura R, Oropeza RL, Bainton DF, Stenberg P, Taylor JM, Reardon C. The cell and molecular biology of apolipoprotein E synthesis by macrophages. *Ciba Found Symp*. 1986;118:155-71.
- <sup>210</sup> Polazzi E, Mengoni I, Peña-Altamira E, Massenzio F, Virgili M, Petralla S, Monti B. Neuronal Regulation of Neuroprotective Microglial Apolipoprotein E Secretion in Rat In Vitro Models of Brain Pathophysiology. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015 Aug;74(8):818-34. doi: 10.1097/NEN.0000000000000222.

- <sup>211</sup> Borén J, White A, Wettsten M, Scott J, Graham L, Olofsson SO. The molecular mechanism for the assembly and secretion of ApoB-100-containing lipoproteins. *Prog Lipid Res.* 1991;30(2-3):205-18.
- <sup>212</sup> Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009 Aug;9(8):581-93. doi: 10.1038/nri2567. Epub 2009 Jun 5.
- <sup>213</sup> Prada I, Furlan R, Matteoli M, Verderio C. Classical and unconventional pathways of vesicular release in microglia. *Glia.* 2013 Jul;61(7):1003-17. doi: 10.1002/glia.22497. Epub 2013 Apr 26.
- <sup>214</sup> Kockx M, Jessup W, Kritharides L. Regulation of endogenous apolipoprotein E secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Jun;28(6):1060-7. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.164350. Epub 2008 Apr 3.
- <sup>215</sup> Karunakaran D, Kockx M, Owen DM, Burnett JR, Jessup W, Kritharides L. Protein kinase C controls vesicular transport and secretion of apolipoprotein E from primary human macrophages. *J Biol Chem.* 2013 Feb 15;288(7):5186-97. doi: 10.1074/jbc.M112.428961. Epub 2013 Jan 3.
- <sup>216</sup> Deng J, Rudick V, Dory L. Lysosomal degradation and sorting of apolipoprotein E in macrophages. *J Lipid Res.* 1995 Oct;36(10):2129-40.
- <sup>217</sup> Duan H, Lin CY and Mazzone T. Degradation of Macrophage ApoE in a Nonlysosomal Compartment. *JBC*, 272, 31156-31162. December 5, 1997. doi: 10.1074/jbc.272.49.31156
- <sup>218</sup> Gebicke-Haerter PJ, Lieb K, Illes P, Berger M. Microglia: mechanisms of activation and significance in pathogenesis of neuropsychiatric illnesses. *Nervenarzt.* 1998 Sep;69(9):752-62.
- <sup>219</sup> Kielian T. Microglia and chemokines in infectious diseases of the nervous system: views and reviews. *Front Biosci.* 2004 Jan 1;9:732-50.
- <sup>220</sup> Hickman SE, El Khoury J. Mechanisms of mononuclear phagocyte recruitment in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010 Apr;9(2):168-73.
- <sup>221</sup> Cudaback E, Li X, Montine KS, Montine TJ, Keene CD. Apolipoprotein E isoform-dependent microglia migration. *FASEB J.* 2011 Jun;25(6):2082-91. doi: 10.1096/fj.10-176891. Epub 2011 Mar 8.
- <sup>222</sup> Michaelson DM. APOE ε4: the most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2014 Nov;10(6):861-8. doi: 10.1016/j.jalz.2014.06.015. Epub 2014 Sep 10.
- <sup>223</sup> Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Mar 1;90(5):1977-81.
- <sup>224</sup> Noguchi S, Murakami K, Yamada N. Apolipoprotein E genotype and Alzheimer's disease. *Lancet.* 1993 Sep 18;342(8873):737.
- <sup>225</sup> Shi Y, Yamada K, Liddelov SA, Smith ST, Zhao L, Luo W, Tsai RM, Spina S, Grinberg LT, Rojas JC, Gallardo G, Wang K, Roh J, Robinson G, Finn MB, Jiang H, Sullivan PM, Baufeld C, Wood MW, Sutphen C, McCue L, Xiong C, Del-Aguila JL, Morris JC, Cruchaga C. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Anne M. Fagan, Bruce L. Miller, Adam L. Boxer, William W. Seeley, Oleg Butovsky, Ben A. Barres, Steven M. Paul & David M. Holtzman. ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature* volume 549, pages 523–527 (28 September 2017)
- <sup>226</sup> Balducci C, Forloni G. Novel targets in Alzheimer's disease: A special focus on microglia. *Pharmacol Res.* 2018 Apr;130:402-413. doi: 10.1016/j.phrs.2018.01.017. Epub 2018 Jan 31.
- <sup>227</sup> Gomes ER, Jani S, Gundersen GG. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell.* 2005 May 6;121(3):451-63.
- <sup>228</sup> Lehtimäki J, Hakala M, Lappalainen P. Actin Filament Structures in Migrating Cells. *Handb Exp Pharmacol.* 2017;235:123-152. doi: 10.1007/164\_2016\_28.
- <sup>229</sup> Bone CR, Starr DA. Nuclear migration events throughout development. *J Cell Sci* 2016 129: 1951-1961; doi: 10.1242/jcs.179788
- <sup>230</sup> Gundersen GG, Worman HJ. Nuclear positioning. *Cell.* 2013 Mar 14;152(6):1376-89. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.031.
- <sup>231</sup> Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci.* 2012 Apr 15;125(Pt 8):1855-64. doi: 10.1242/jcs.098087. Epub 2012 Apr 29.
- <sup>232</sup> Wehrle-Haller, Bernhard; Imhof, Beat. Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2003, vol. 35, no. 1, p. 39-50
- <sup>233</sup> Pantaloni D, Le Clainche C, Carlier MF. Mechanism of actin-based motility. *Science.* 2001 May 25;292(5521):1502-6.
- <sup>234</sup> Pollard TD, Cooper JA. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science.* 2009 Nov 27;326(5957):1208-12. doi: 10.1126/science.1175862.
- <sup>235</sup> Julian L, Olson MF. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. *Small GTPases.* 2014;5:e29846. doi: 10.4161/sgtp.29846. Epub 2014 Jul 10.

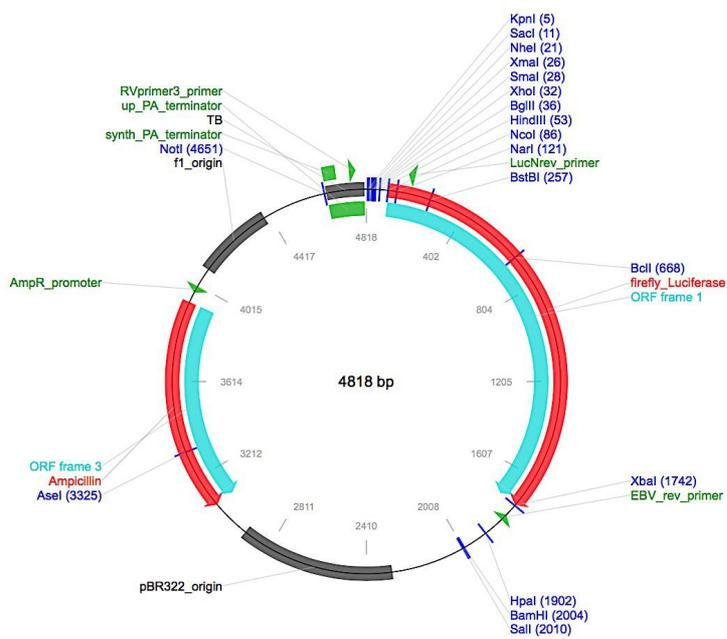
- <sup>236</sup> Vemula S, Shi J, Hanneman P, Wei L, Kapur R. ROCK1 functions as a suppressor of inflammatory cell migration by regulating PTEN phosphorylation and stability. *Blood*. 2010 Mar 4;115(9):1785-96. doi: 10.1182/blood-2009-08-237222. Epub 2009 Dec 11.
- <sup>237</sup> Sebbagh M, Renvoizé C, Hamelin J, Riché N, Bertoglio J, Bréard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol*. 2001 Apr;3(4):346-52.
- <sup>238</sup> Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jun;4(6):446-56.
- <sup>239</sup> Matcovitch-Natan O, Winter DR, Giladi A, Vargas Aguilar S, Spinrad A, Sarrazin S, Ben-Yehuda H, David E, Zelada González F, Perrin P, Keren-Shaul H, Gury M, Lara-Astaiso D, Thaiss CA, Cohen M, Bahar Halpern K, Baruch K, Deczkowska A, Lorenzo-Vivas E, Itzkovitz S, Elinav E, Sieweke MH, Schwartz M, Amit I. Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science*. 2016 Aug 19;353(6301):aad8670. doi: 10.1126/science.aad8670. Epub 2016 Jun 23.
- <sup>240</sup> Friedman BA, Srinivasan K, Ayalon G, Meilandt WJ, Lin H, Huntley MA, Cao Y, Lee SH, Haddick PCG, Ngu H, Modrusan Z, Larson JL, Kaminker JS, van der Brug MP, Hansen DV. Diverse Brain Myeloid Expression Profiles Reveal Distinct Microglial Activation States and Aspects of Alzheimer's Disease Not Evident in Mouse Models. *Cell Rep*. 2018 Jan 16;22(3):832-847. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.066.
- <sup>241</sup> Yu YT, Breitbart RE, Smoot LB, Lee Y, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev*. 1992 Sep;6(9):1783-98.
- <sup>242</sup> Yonit Lavin, Deborah Winter, Ronnie Blecher-Gonen, Eyal David, Hadas Keren-Shaul, Miriam Merad, Steffen Jung, and Ido Amit. Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. *Cell*. 2014 Dec 4; 159(6): 1312–1326. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.018
- <sup>243</sup> Gaudilliere B, Shi Y, Bonni A. RNA interference reveals a requirement for myocyte enhancer factor 2A in activity-dependent neuronal survival. *J Biol Chem*. 2002 Nov 29;277(48):46442-6. Epub 2002 Sep 13.
- <sup>244</sup> Mao Z, Bonni A, Xia F, Nadal-Vicens M, Greenberg ME. Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science*. 1999 Oct 22;286(5440):785-90.
- <sup>245</sup> Lin X, Shah S, Bulleit RF. The expression of MEF2 genes is implicated in CNS neuronal differentiation. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996 Dec;42(2):307-16.
- <sup>246</sup> González P, Alvarez V, Menéndez M, Lahoz CH, Martínez C, Corao AI, Calatayud MT, Peña J, García-Castro M, Coto E. Myocyte enhancing factor-2A in Alzheimer's disease: genetic analysis and association with MEF2A-polymorphisms. *Neurosci Lett*. 2007 Jan 3;411(1):47-51. Epub 2006 Nov 16.
- <sup>247</sup> Yamada K, Miyamoto K. Basic helix-loop-helix transcription factors, BHLHB2 and BHLHB3; their gene expressions are regulated by multiple extracellular stimuli. *Front Biosci*. 2005 Sep 1;10:3151-71.
- <sup>248</sup> Sun H, Ghaffari S, and Taneja R. bHLH-Orange Transcription Factors in Development and Cancer. *Transl Oncogenomics*. 2007; 2: 107–120.
- <sup>249</sup> Lin CC, Bradstreet TR, Schwarzkopf EA, Sim J, Carrero JA, Chou 1, Cook LE, Egawa T, Taneja R, Murphy TL, Russell JH, Edelson BT. Bhlhe40 controls cytokine production by T cells and is essential for pathogenicity in autoimmune neuroinflammation. *Nat Commun*. 2014 Apr 3;5:3551. doi: 10.1038/ncomms4551.
- <sup>250</sup> Yu F, Sharma S, Jankovic D, Gurram RK, Su P, Hu G, Li R, Rieder S, Zhao K, Sun B, Zhu J. The transcription factor Bhlhe40 is a switch of inflammatory versus antiinflammatory Th1 cell fate determination. *J Exp Med*. 2018 May 17. pii: jem.20170155. doi: 10.1084/jem.20170155.
- <sup>251</sup> Geffin R, Martinez R, de las Pozas A, Issac B, and McCarthy M. Apolipoprotein E4 Suppresses Neuronal-Specific Gene Expression in Maturing Neuronal Progenitor Cells Exposed to HIV. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2017; 12(3): 462–483.
- <sup>252</sup> Haq R, Fisher DE. Biology and clinical relevance of the microphthalmia family of transcription factors in human cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Sep 1;29(25):3474-82. doi: 10.1200/JCO.2010.32.6223.
- <sup>253</sup> Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS, Banfi S, Parenti G, Cattaneo E, Ballabio A. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*. 2009 Jul 24;325(5939):473-7. doi: 10.1126/science.1174447. Epub 2009 Jun 25.
- <sup>254</sup> Settembre C, De Cegli R, Mansueto G, Saha PK, Vetrini F, Visvikis O, Huynh T, Carissimo A, Palmer D, Klisch TJ, Wollenberg AC, Di Bernardo D, Chan L, Irazoqui JE, Ballabio A. TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. *Nat Cell Biol*. 2013 Jun;15(6):647-58. doi: 10.1038/ncb2718. Epub 2013 Apr 21.
- <sup>255</sup> Tanaka Y, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M. Increased lysosomal biogenesis in activated microglia and exacerbated neuronal damage after traumatic brain injury in progranulin-deficient mice. *Neuroscience*. 2013 Oct 10;250:8-19. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.06.049. Epub 2013 Jul 2.
- <sup>256</sup> Zhao GQ, Zhao Q, Zhou X, Mattei MG, de Crombrughe B. TFEB, a basic helix-loop-helix protein, forms heterodimers with TFE3 and inhibits TFE3-dependent transcription activation. *Mol Cell Biol*. 1993 Aug;13(8):4505-12.
- <sup>257</sup> Xingzhi Guo, Peng Tang, Li Chen, Peng Liu, Chen Hou, Xin Zhang, Yue Liu, Li Chong, Xiaoqing Li, and Rui Li. Amyloid  $\beta$ -Induced Redistribution of Transcriptional Factor EB and Lysosomal Dysfunction in Primary Microglial Cells. Published online 2017 Jul 19. doi: 10.3389/fnagi.2017.00228 *Front Aging Neurosci*. 2017; 9: 228.

- <sup>258</sup> Salero E, Giménez C, and Zafra F. Identification of a non-canonical E-box motif as a regulatory element in the proximal promoter region of the apolipoprotein E gene. *Biochem J*. 2003 Mar 15; 370(Pt 3): 979–986. doi: 10.1042/BJ20021142
- <sup>259</sup> Terrisse L, Poirier J, Bertrand P, Merched A, Visvikis S, Siest G, Milne R, Rassart E. Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J Neurochem*. 1998 Oct;71(4):1643-50.
- <sup>260</sup> Reindl M, Knipping G, Wicher I, Dilitz E, Egg R, Deisenhammer F, Berger T. Increased intrathecal production of apolipoprotein D in multiple sclerosis. *Neuroimmunol* October 1, 2001 Volume 119, Issue 2, Pages 327–332. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(01\)00378-2](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(01)00378-2)
- <sup>261</sup> Levros LC Jr, Labrie M, Charfi C, Rassart E. Binding and repressive activities of apolipoprotein E3 and E4 isoforms on the human ApoD promoter. *Mol Neurobiol*. 2013 Dec;48(3):669-80. doi: 10.1007/s12035-013-8456-0. Epub 2013 May 30.
- <sup>262</sup> Kim JW, Jang SM, Kim CH, An JH, Kang EJ, Choi KH. New molecular bridge between RelA/p65 and NF-κB target genes via histone acetyltransferase TIP60 cofactor. *J Biol Chem*. 2012 Mar 2;287(10):7780-91. doi: 10.1074/jbc.M111.278465. Epub 2012 Jan 16.
- <sup>263</sup> Zhong N, Ramaswamy G, Weisgraber KH. Apolipoprotein E4 domain interaction induces endoplasmic reticulum stress and impairs astrocyte function. *J Biol Chem*. 2009 Oct 2;284(40):27273-80. doi: 10.1074/jbc.M109.014464. Epub 2009 Aug 7.
- <sup>264</sup> Theendakara V, Patent A, Peters Libeu CA, Philpot B, Flores S, Descamps O, Poksay KS, Zhang Q, Cailing G, Hart M, John V, Rao RV, and Bredesen DE. Neuroprotective Sirtuin ratio reversed by ApoE4. *PNAS* November 5, 2013. 110 (45) 18303-18308; <https://doi.org/10.1073/pnas.1314145110>
- <sup>265</sup> Rao RV, Bredesen DE. Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Dec;16(6):653-62.
- <sup>266</sup> Drori A, Misaghi S, Haimovich J, Messerle M, Tirosh B. Prolonged endoplasmic reticulum stress promotes mislocalization of immunoglobulins to the cytoplasm. *Mol Immunol*. 2010 May;47(9):1719-27. doi: 10.1016/j.molimm.2010.03.006.
- <sup>267</sup> Brecht WJ, Harris FM, Chang S, Tesseur I, Yu GQ, Xu Q, Dee Fish J, Wyss-Coray T, Buttini M, Mucke L, Mahley RW, Huang Y. Neuron-specific apolipoprotein e4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice. *J Neurosci*. 2004 Mar 10;24(10):2527-34.
- <sup>268</sup> Huang Y, Liu XQ, Wyss-Coray T, Brecht WJ, Sanan DA, Mahley RW. Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's disease brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17;98(15):8838-43. Epub 2001 Jul 10.
- <sup>269</sup> Harris FM, Brecht WJ, Xu Q, Tesseur I, Kekoni L, Wyss-Coray T, Fish JD, Masliah E, Hopkins PC, Scearce-Levie K, Weisgraber KH, Mucke L, Mahley RW, and Huang Y. Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. *PNAS* September 16, 2003. 100 (19) 10966-10971; <https://doi.org/10.1073/pnas.1434398100>
- <sup>270</sup> Dafnis I, Argyri L, Sagnou M, Tzinia A, Tsilibary EC, Stratikos E, Chroni A. The ability of apolipoprotein E fragments to promote intraneuronal accumulation of amyloid beta peptide 42 is both isoform and size-specific. *Sci Rep*. 2016 Aug 1;6:30654. doi: 10.1038/srep30654.
- <sup>271</sup> Huang Y, Liu XQ, Wyss-Coray T, Brecht WJ, Sanan DA, Mahley RW. Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's disease brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17;98(15):8838-43. Epub 2001 Jul 10.
- <sup>272</sup> Muddiman DC, Gusev AI, Proctor A, Hercules DM, Venkataramanan R, Diven W. Quantitative measurement of cyclosporin A in blood by time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*. 1994 Jul 15;66(14):2362-8.
- <sup>273</sup> Edman P, Hammarsten E, et al. Partition chromatographic separation of adenine and guanine. *J Biol Chem*. 1949 Mar;178(1):395-8.
- <sup>274</sup> Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev*. 2003 May; 29 Suppl 1:3-9.
- <sup>275</sup> Gossen M, Kaufmann J, Triezenberg SJ, Akira S, Asker EH, Assenat E, Baumann B, Bohl DL, Corbi N: Transcription factors. Springer, Berlin 2004, ISBN 3-540-21095-4.
- <sup>276</sup> Bernhardt R. Glial cell dysregulation: a new perspective on Alzheimer disease. *Neurotoxicity Research*. December 2007, Volume 12, Issue 4, pp 215–232
- <sup>277</sup> Proctor CJ, Pienaar IS, Elson JL, Kirkwood TB. Aggregation, impaired degradation and immunization targeting of amyloid-beta dimers in Alzheimer's disease: a stochastic modelling approach. *Mol Neurodegener*. 2012; 7: 32. Published online 2012 Jul 2. doi: 10.1186/1750-1326-7-32
- <sup>278</sup> Vance JE. Deregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Disease Models & Mechanisms* 2012 5: 746-755; doi: 10.1242/dmm.010124
- <sup>279</sup> Muth C; Schröck K; Madore C; Hartmann K, Fanek Z; Butovsky O; Glatzel M; Krasemann S; Activation of microglia by retroviral infection correlates with transient clearance of prions from the brain but does not change incubation time; *Brain Pathol*. 2017 Sep;27(5):590-602. doi: 10.1111/bpa.12441. Epub 2016 Nov 21.
- <sup>280</sup> <https://flowcytometry.med.ualberta.ca/instruments/analysers/amnis-imagestream/> (06.08.2018)

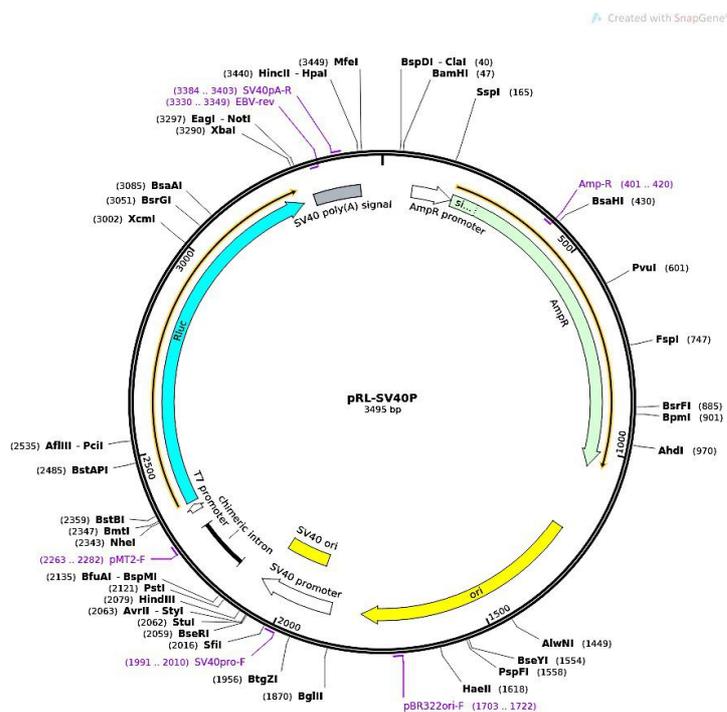
# Anhang

## A1 verwendete Plasmide

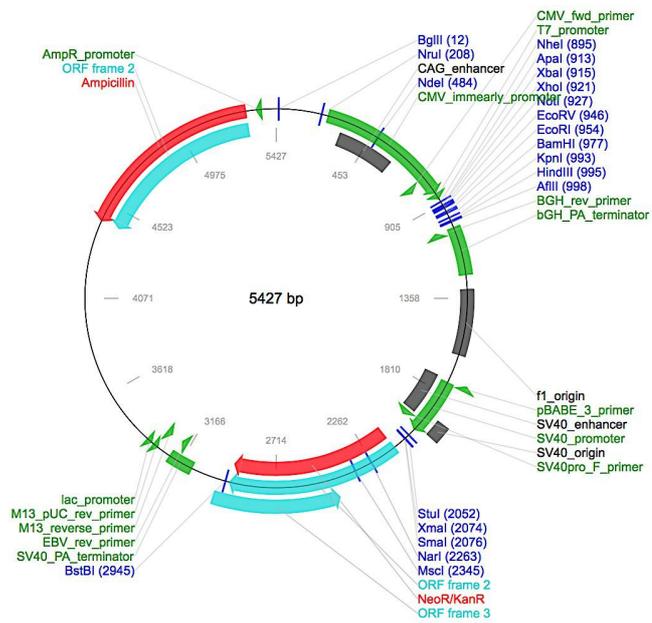
### A1.1 pGL3\_basic



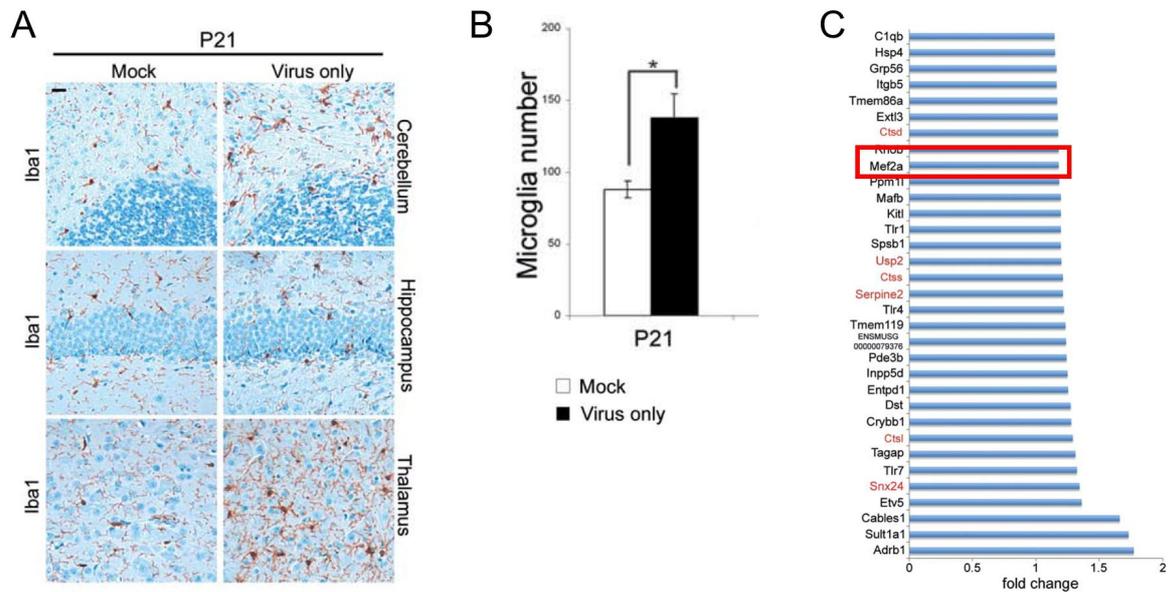
### A1.2 pRL



## A1.3 pcDNA3.1(-)



## A2 Mef2a: wichtiger Faktor in der Mikroglia-Aktivierung



**Abb. A3: Mef2a: wichtiger Faktor in der Mikroglia-Aktivierung** diese Daten wurden bereits veröffentlicht in 279 .  
**(A)** Nach Virus-Infektion erhöht sich die Anzahl an iba1-positiver Mikroglia im Cerebellum, im Hippocampus sowie im Thalamus. Die Quantifizierung **(B)** bestätigt dies. **(C)** Die RNA-Expressionsanalyse spezifischer Gene für murine Mikroglia-Zellen zeigt eine signifikante Erhöhung der Transkriptzahl für verschiedene Gene, insbesondere Mef2a.

## A3 Aminosäure-Kodierung

**Tab. A3: Aminosäure-Kodierung**

Aminosäurebezeichnung	Abkürzung	Kürzel
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## Publikation

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Brain Pathol. 2017 Sep;27(5):590-602. doi: 10.1111/bpa.12441. Epub 2016 Nov 21.

**Activation of microglia by retroviral infection correlates with transient clearance of prions from the brain but does not change incubation time.**

Muth C<sup>1</sup>, Schröck K<sup>1</sup>, Madore C<sup>2</sup>, Hartmann K<sup>1</sup>, Fanek Z<sup>2</sup>, Butovsky O<sup>2</sup>, Glatzel M<sup>1</sup>, Krasemann S<sup>1,2</sup>.

*1 Institute of Neuropathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany.  
2 Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA.*

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben!

Bei **Prof. Dr. med. Markus Glatzel** bedanke ich mich recht herzlich für die Möglichkeit, die Arbeit im „Institut für Neuropathologie“ am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf anzufertigen und für die Bereitstellung aller Geräte und Arbeitsmaterialien sowie die beratende Unterstützung während meiner Promotion.

Ein besonderer Dank gilt **PD Dr. Susanne Krasemann** für die Bereitstellung des interessanten Themas, der Betreuung sowie die Einwerbung des Werner-Otto-Stipendiums, über welches ich diese Arbeit anfertigen konnte. Weiterhin möchte ich ihr für die anregenden Diskussionen und ihrer konstruktiven Kritik bei der Fertigstellung sowie der Durchsicht dieser Doktorarbeit danken.

Darüber hinaus danke ich dem gesamten Team des „Instituts für Neuropathologie“ für die Unterstützung während der letzten Jahre.

Ein weiterer Dank gilt **Prof. Dr. Julia Kehr** (Arbeitsgruppe „Molekulare Pflanzengenetik“ des „Biozentrums Klein Flottbeck“) für die Bereitschaft zur Betreuung und Unterstützung meiner Promotion.

Der größte Dank gilt meinem Verlobten **M.Sc. Alexander Hartmann** für seine Liebe, sein Verständnis und seine stetige Unterstützung.

Vielen Dank!

## **Eidesstaatliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe und dass alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, kenntlich gemacht sind. Mir ist bekannt, dass die Prüfung wegen einer Pflichtwidrigkeit für nicht bestanden erklärt werden kann.

Ich versichere außerdem, dass ich die vorliegende Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

---

Hamburg, 10.08.2018

M.Sc. Christiane Muth