

Regulierung und Verfügbarkeit von Apolipoprotein E in Astrozyten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Biol. Ulrike Hamker, geb. Heydrich

02.06.1965, München

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. rer. nat. Harald Saumweber
2. Prof. Dr. med. Thomas G. Ohm
3. Prof. Dr. rer. nat. Thomas Willnow

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Februar 2005

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|-----|
| | Inhaltsverzeichnis | ii |
| | Abstract | vi |
| | Abstrakt | vi |
| | Keywords | vii |
| | Schlagworte | vii |
| 1 | Zusammenfassung | 1 |
| 2 | Einleitung | 3 |
| 2.1 | Apolipoprotein E | 3 |
| 2.2 | ApoE und die Alzheimersche Krankheit | 3 |
| 2.3 | ApoE Struktur | 5 |
| 2.4 | ApoE-Rezeptoren | 6 |
| 2.5 | ApoE Regulierung | 7 |
| 2.6 | Experimentelle Fragestellung | 7 |
| 3 | Material und Methoden | 10 |
| 3.1 | Antikörper | 10 |
| 3.1.1 | Primäre Antikörper | 10 |
| 3.1.2 | Sekundäre Antikörper und Konjugate | 10 |
| 3.2 | Chemikalien | 11 |
| 3.3 | Medien und Lösungen | 13 |
| 3.3.1 | Zellisolierung und Zellkultur | 13 |
| 3.3.2 | Immunzytologie | 13 |
| 3.3.3 | Antikörper-Isolierung und -Biotinylierung | 13 |
| 3.3.4 | ELISA | 14 |
| 3.3.5 | SDS-PAGE | 14 |
| 3.3.6 | Western Blot, Ponceau S-Färbung und immunochemische Detektion | 15 |
| 3.3.7 | ApoE RNA-Isolierung | 15 |
| 3.4 | Methoden | 16 |
| 3.4.1 | Anlegen primärer Astrozytenkulturen | 16 |
| 3.4.2 | Kontrollexperimente | 16 |
| 3.4.3 | Histochemische Arbeitsmethoden | 17 |
| 3.4.3.1 | Immunzytochemische Charakterisierung der Zellkulturen als Astrozyten | 17 |
| 3.4.3.2 | ApoE- und β /A4-Doppel-Immunfärbung der mit β /A4-Fragmenten inkubierten Astrozyten | 17 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 3.4.3.3 | Immunzytochemische Detektion von S100 β der mit β /A4-Fragmenten inkubierten Astrozyten | 17 |
| 3.4.3.4 | bFGF-Immunfärbung der mit β /A4-Fragmenten inkubierten Astrozyten | 18 |
| 3.4.3.5 | Färbung des Golgi-Apparats der mit β /A4-Fragmenten inkubierten Astrozyten | 18 |
| 3.4.4 | Lebend-tot-Nachweis der Astrozyten | 18 |
| 3.4.5 | Biochemische Arbeitsmethoden | 19 |
| 3.4.5.1 | Anti-Apolipoprotein E-Antikörper-Affinitätsreinigung und – Biotinylierung | 19 |
| 3.4.5.2 | Quantitative Proteinbestimmung mittels BCA Protein Assay Kit | 20 |
| 3.4.5.3 | Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) für ApoE | 20 |
| 3.4.5.4 | Western Blots | 21 |
| 3.4.5.5 | Messung des NGF-Gehalts der Lysat- und Medien-Fractionen | 22 |
| 3.4.5.6 | Messung der intrazellulären Calcium-Konzentrationen in Astrozyten nach Inkubation mit β /A4-Fragmenten | 23 |
| 3.4.5.7 | ApoE-mRNA Isolierung von Astrozyten | 23 |
| 3.4.6 | Inkubation von Astrozyten Primärkulturen aus Ratten-Hippocampi | 25 |
| 3.4.6.1 | ApoE im konditionierten Medium unbehandelter Astrozytenkulturen | 25 |
| 3.4.6.2 | Inkubation mit rezeptorspezifischen Agonisten | 25 |
| 3.4.6.3 | Inkubation mit β -Amyloid-Fragmenten | 26 |
| 3.4.6.3.1 | Alterung der Amyloide | 26 |
| 3.4.6.3.2 | Kongorot-Färbung der Amyloide zum Nachweis ihrer Fibrillogenität | 27 |
| 3.4.6.3.3 | Inkubation von Astrozyten mit Amyloid-Fragmenten | 27 |
| 3.4.6.3.4 | Inkubation von konditioniertem Kulturmedium mit Amyloid-Fragmenten | 28 |
| 3.4.6.3.5 | Inkubation von Astrozytenkulturen mit β /A4(1-40) für NGF-Messungen | 28 |
| 4 | Ergebnisse | 30 |
| 4.1 | Verifizierung der Versuchsbedingungen | 30 |
| 4.1.1 | Charakterisierung der Rattenhippocampus-Primärkulturen als Astrozyten | 30 |
| 4.1.2 | Lebensfähigkeit der Astrozyten | 30 |
| 4.1.3 | Spezifität und Qualität des ApoE-ELISAs | 34 |
| 4.1.4 | Spezifität und Qualität des ApoE-Western Blot | 34 |
| 4.1.5 | Reguläre ApoE-Entwicklung der Astrozyten | 35 |
| 4.2 | Regulation der ApoE-Sekretion | 36 |
| 4.2.1 | Wirkung von dBcAMP auf die ApoE-Sekretion | 37 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.2.2 | Wirkung von dBcAMP und RA auf die ApoE-Sekretion | 38 |
| 4.2.3 | Modulation der ApoE-Sekretion durch Isoproterenol und Clonidine | 39 |
| 4.2.4 | Wirkung von PMA auf die ApoE-Sekretion | 40 |
| 4.2.5 | Wirkung von PMA auf den dBcAMP-vermittelten Anstieg der ApoE-Sekretion | 40 |
| 4.2.6 | Regulation der ApoE-Sekretion durch Arterenol, Carbachol und Serotonin | 41 |
| 4.2.7 | Wirkung von Arterenol und Serotonin auf die Isoproterenol-vermittelte Steigerung der ApoE-Sekretion | 43 |
| 4.3 | Regulation der ApoE-mRNA-Expression | 45 |
| 4.4 | Unterschiedliche Regulierung von ApoE und NGF-Sekretion | 47 |
| 4.5 | Inkubationsexperimente mit Amyloiden | 49 |
| 4.5.1 | Überprüfung der Fibrillogenität der gealterten Amyloid-Fragmente | 49 |
| 4.5.2 | Veränderung von ruhender zu aktivierter Zellform bei Inkubationen mit Amyloid und dBcAMP | 50 |
| 4.5.3 | Wirkung der verschiedenen Amyloid-Fragmente auf die ApoE-Konzentration im Medium | 53 |
| 4.5.4 | Wirkung der verschiedenen Amyloid-Fragmente auf die ApoE-Konzentrationen in konditioniertem Medium ohne Zellen | 55 |
| 4.5.5 | Immunzytochemischen Darstellung von ApoE und $\beta/A4(1-40)$ | 57 |
| 4.5.6 | ApoE in Astrozyten-Lysat-Fractionen von $\beta/A4(1-40)$ -Inkubation und PBS-Kontrolle | 60 |
| 4.5.7 | Wirkung des Amyloids $\beta/A4(1-40)$ auf die Regulation anderer Proteine der Astrozyten | 61 |
| 4.5.7.1 | ApoE- und NGF-Gehalt von Astrozyten-Fractionen | 61 |
| 4.5.7.2 | bFGF-Gehalt von $\beta/A4(1-40)$ inkubierten Astrozyten | 64 |
| 4.5.8 | Wirkung von $\beta/A4(1-40)$ auf den Golgi-Apparat | 65 |
| 4.5.9 | Wirkung der verschiedenen Amyloid-Fragmente auf die intrazelluläre Calcium-Homöostase | 67 |
| 4.6 | Zusammenfassung der Ergebnisse: | 68 |
| 4.6.1 | Einfluss des Adenylatcyclase/PKA-Pfads sowie des PLC/PKC-Pfads auf die ApoE-Sekretion | 68 |
| 4.6.2 | ApoEs Regulation, Sekretion und Verfügbarkeit in Amyloid-Inkubationen von Astrozyten | 71 |
| 5 | Diskussion | 74 |
| 5.1 | ApoEs Regulierung über den Adenylatcyclase/PKA-Pfad | 74 |
| 5.2 | ApoEs Regulierung über den PLC/PKC-Pfad | 76 |
| 5.3 | Spezifität der ApoE-Regulierung über den Adenylatcyclase/PKA-Pfad und den PLC/PKC-Pfad | 78 |
| 5.4 | Einfluss der fibrillären Amyloide auf die Regulation von ApoE | 78 |

| | | |
|------|--|-----|
| 5.5 | Ist der Einfluss der fibrillären Amyloide auf die ApoE-Regulierung spezifisch? | 80 |
| 5.6 | Wirkung der verschiedenen Amyloid-Fragmente auf die Verfügbarkeit von ApoE im Medium | 81 |
| 5.7 | Einfluss der fibrillären Amyloide auf die Zellform und die intrazelluläre Calcium-Homöostase | 83 |
| 5.8 | Eignung der reversen Sequenz $\beta/A4(40-1)$ als Kontrollsubstanz | 84 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 85 |
| 7 | Danksagung | 93 |
| 8 | Anhang | 94 |
| 8.1 | Wirkung verschiedener dBcAMP Konzentrationen auf ApoE | 94 |
| 8.2 | Wirkung von dBcAMP und RA auf die ApoE-Konzentration | 94 |
| 8.3 | Wirkung von Isoproterenol und Clonidine auf die ApoE-Konzentration | 95 |
| 8.4 | Wirkung von PMA auf die ApoE-Konzentration | 96 |
| 8.5 | Wirkung von PMA auf den dBcAMP vermittelten Anstieg der ApoE-Konzentration | 96 |
| 8.6 | Wirkung von RA und PMA auf den dBcAMP vermittelten Anstieg der ApoE-mRNA-Expression | 97 |
| 8.7 | Wirkung von Arterenol, Carbachol und Serotonin auf die ApoE-Konzentration | 98 |
| 8.8 | Wirkung von Isoproterenol und Arterenol auf die ApoE-Konzentration | 99 |
| 8.9 | Wirkung von Isoproterenol und Serotonin auf die ApoE-Konzentration | 100 |
| 8.10 | Vergleich der ApoE- und NGF-Konzentrationen bei Inkubation mit dBcAMP, RA und PMA | 101 |
| 8.11 | Wirkung der verschiedenen Amyloid-Fragmente auf die ApoE-Konzentration im Medium | 101 |
| 8.12 | Wirkung der verschiedenen Amyloid-Fragmente auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zum Zeitpunkt 72 h | 103 |
| 8.13 | NGF-Werte von PBS-Kontrolle und Inkubation mit $\beta/A4(1-40)$ | 104 |
| 9 | Selbständigkeitserklärung | 105 |
| 10 | Lebenslauf | 106 |

Abstract

Apolipoprotein E (apoE) is an abundant component of plasma lipoproteins that plays a key role in lipid transport and cholesterol homeostasis via the low density lipoprotein receptor. In the CNS, apoE is synthesized and secreted especially by astrocytes. ApoE isoforms have different effects on a number of pathological processes underlying Alzheimer's disease. Therefore, understanding the regulated synthesis of apoE is important for determining its role in Alzheimer's disease. One aim of this work was to examine whether the second-messenger-pathways „adenylyl cyclase/protein kinase A (PKA)“ and/or „phospholipase C/protein kinase C (PLC/PKC) are involved in the regulation of apoE secretion in astrocytes. Therefore rat primary hippocampal astrocyte cultures were incubated with various analogues, receptor agonists and neurotransmitters which influence these pathways. Dibutyl-cAMP (cAMP analogue) increased the apoE secretion. ApoE secretion was also modulated by receptor agonists of the adenylyl cyclase/PKA pathway. Isoproterenol (beta-adrenoceptor agonist) enhanced, while Clonidine (alpha 2-adrenoceptor agonist) decreased, the secreted apoE. In contrast, the PKC activator phorbol 12-myristate 13-acetate decreased the apoE secretion. It also reversed the effects of dibutyl-cAMP. Arterenol (alpha 1-adrenoceptor) and serotonin (neurotransmitter) enhanced, whereas carbachol (acetylcholine muscarinic receptor agonist) decreased secreted apoE. It is shown, that the used substances have different effects on the secretion of the nerve growth factor (NGF) as compared to apoE secretion, suggesting that the results obtained were unlikely to be due to a general effect on protein synthesis. It can be concluded that astrocytic apoE production can be regulated by factors that affect cAMP intracellular concentration or activate PKC. The second aim of this work was to examine whether amyloid fragments have an effect on the apoE secretion of astrocytes. Senile amyloid plaques in Alzheimer's disease brains show apoE immunoreactivity, astrocytes which surround them do not. It is shown, that aged, fibrillar amyloid (1-40) increases apoE secretion. The secreted apoE is bound to the surrounding amyloid conglomerates. The used amyloid fragments did not increase or decrease basic fibroblast growth factor secretion, suggesting that the results obtained were unlikely to be due to a general effect on protein synthesis.

Abstrakt

Apolipoprotein E (ApoE) ist eine verbreitet vorkommende Komponente der Plasmalipoproteine und spielt eine Schlüsselrolle bei Lipidtransport und Cholesterin-Homöostase über den Low Density Lipoprotein Rezeptor. Im ZNS wird ApoE hauptsächlich von Astrozyten synthetisiert und sekretiert. ApoE-Isoformen haben unterschiedliche Wirkung auf eine Zahl von pathologischen Prozessen, die der Alzheimerschen Krankheit zugrunde liegen. Um die Rolle des ApoE für die Alzheimersche Krankheit zu erhellen, ist es wichtig Kenntnisse über seine Regulation zu erlangen. Ein Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob die „Second-Messenger“-Signalpfade „Adenylatcyclase/Protein kinase A (PKA)“ und/oder „Phospholipase C/Protein kinase C (PLC/PKC)“ in die Regulation der astrozytären ApoE Sekretion eingreifen. Hierfür wurden primäre hippocampale Astrozytenkulturen von Ratten mit verschiedenen Analoga,

Rezeptoragonisten und Neurotransmittern, die diese Signalpfade beeinflussen, inkubiert. Dibutyryl-cAMP (cAMP-Analogon) erhöhte die ApoE Sekretion. Auch Rezeptoragonisten des Adenylatcyclase/PKA-Signalwegs beeinflussten die ApoE Sekretion. Isoproterenol (beta-Adrenorezeptoragonist) erhöhte die ApoE Sekretion, während Clonidine (alpha-2 Adrenorezeptoragonist) sie senkte. Der PKC-Aktivator Phorbol 12-Myristat 13-Acetat senkte die ApoE Sekretion und kehrte die dibutyryl-cAMP-vermittelte Erhöhung der ApoE Sekretion um. Arterenol (alpha-1 Adrenorezeptoragonist) und Serotonin (Neurotransmitter) erhöhten die ApoE Sekretion, wohingegen Carbachol (Acetylcholinischer muskarinischer Rezeptoragonist) die ApoE Sekretion senkte. Es wird gezeigt, dass die verwendeten Substanzen einen von der ApoE Sekretion verschiedenen Einfluss auf die Sekretion des Nervenwachstumsfaktors (NGF) haben. Dies legt die Vermutung nahe, dass die beobachteten Ergebnisse nicht auf einen generellen Effekt der Proteinsynthese zurückzuführen sind. Es kann gefolgert werden, dass die astrozytäre ApoE Sekretion von Faktoren beeinflusst werden kann, die die intrazelluläre Konzentration von cAMP verändern oder die PKC aktivieren. Das zweite Ziel der Arbeit war zu untersuchen ob Amyloid Fragmente einen Einfluss auf die astrozytäre ApoE Sekretion haben. Senile Amyloid-Plaques in Alzheimer-Gehirnen zeigen eine ApoE-Immunreaktivität, Astrozyten die diese Plaques umgeben dagegen nicht. Es wird gezeigt, dass gealtertes fibrilläres Amyloid (1-40) die ApoE Sekretion erhöht. Das sekretierte ApoE wird durch die, die Zellen umgebenden Amyloid-Konglomerate, gebunden. Die verwendeten Amyloid Fragmente beeinflussten nicht die Menge des sekretierten basischen Fibroblastenwachstumsfaktors. Dies legt nahe, dass die beobachteten Ergebnisse nicht auf einen generellen Effekt der Proteinsynthese zurückzuführen sind.

Keywords

Alzheimer's disease, cAMP, protein kinase C, amyloid

Schlagworte

Alzheimer Demenz, cAMP, Proteinkinase C, Amyloid

1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, die Beteiligung von "Second Messenger"-Wegen bei der Regulation der Apolipoprotein E (ApoE)-Sekretion im Gehirn zu untersuchen. Hierfür wurde an Primärzellkulturen von hippocampalen Astrozyten aus der Ratte die Wirkung verschiedener Substanzen auf die Regulation und Verfügbarkeit von Apolipoprotein E (ApoE) getestet. Um herauszufinden, ob die ApoE-Produktion durch den intrazellulären cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Spiegel beeinflusst wird, wurde die Adenylatcyclase durch Aktivierung von β -Adrenorezeptoren stimuliert oder durch Aktivierung von α 2-Adrenorezeptoren gehemmt. Des Weiteren wurde eine Stimulation der Adenylatcyclase durch Zugabe von Dibutyryl-cAMP (dBcAMP) bewirkt, einem zellmembrangängigen Analogon von cAMP. Hierbei stellte sich heraus, dass der intrazelluläre cAMP-Spiegel ein wichtiger Regulator der ApoE-Sekretion von Astrozyten ist.

Um zu prüfen, ob die ApoE-Produktion auch durch den Phosphatidylinositol-Hydrolyse-Weg beeinflusst wird, wurde die Phospholipase C (PLC) durch einen spezifischen α 1-Adrenorezeptor Agonisten aktiviert sowie durch Serotonin alle Serotonin-Rezeptor-Subtypen aktiviert, einschließlich derjenigen welche den PLC-Weg beeinflussen. Außerdem wurde die Proteinkinase C (PKC) durch ein Diacylglycerol-Analogon aktiviert. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass auch dieser „Second Messenger“-Pfad in die Regulation von ApoE im Gehirn involviert ist.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die ApoE-Sekretion über eine Aktivierung der Adenylatcyclase und einer damit verbundenen Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels stimuliert wird. Eine Hemmung der Adenylatcyclase oder eine Aktivierung der PLC mit anschließender Aktivierung der PKC führen zu einer verringerten ApoE-Sekretion. Quantitative Untersuchungen der Kulturen nach Inkubation mit den oben genannten Substanzen oder Kombinationen dieser Substanzen auf die Sekretion des neuronalen Wachstumsfaktors (NGF) legen nahe, dass die Wirkungen der Substanzen auf die ApoE-Sekretion spezifisch und nicht die Konsequenz einer generellen tropischen Aktion sind.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, die Wirkung von Amyloid-Fragmenten (10 μ M), wie sie aus der Alzheimer Pathologie bekannt sind, auf die Regulation, Sekretion und Verfügbarkeit von Apolipoprotein E in Astrozyten-Primärkulturen zu untersuchen. Die Fragmente β /A4(1-11) und (1-16) haben keinen oder nur einen geringfügigen Einfluss auf die freie ApoE-Konzentration im Medium. β /A4(1-28), (10-20), (12-28), (22-35), (25-35) und die reverse Sequenz β /A4(40-1) führten zu einer deutlichen Verringerung der ApoE-Konzentrationen im Medium. Nach Inkubation mit β /A4 (1-38), (1-40), (1-42) oder (1-43) war die ApoE-Konzentration hingegen stark vermindert und lag knapp über oder unter der Nachweisgrenze. Die Menge des im Medium gemessenen ApoEs bei allen Amyloid-Fragmenten nimmt mit steigender Inkubationsdauer zu (24, 48 und 72 h). Die immunzytochemische GFAP- und S100 β -Färbung der mit β /A4 (1-38), (1-40), (1-42) oder (1-43) inkubierten Astrozyten zeigt eine Veränderung der

pfannkuchenähnlichen Form bei der PBS-Kontrolle zu einer sternförmig aktivierten Form.

Wie die Zellfreien Inkubationen von Amyloid-Konglomeraten mit konditioniertem Medium und immunzytochemische Studien an Amyloid-inkubierten Astrozyten zeigten, ist die geringe Verfügbarkeit von ApoE im Medium der Amyloid-Inkubationen durch die Bindung des sekretierten ApoE an die Amyloid-Konglomerate bedingt. Die Ergebnisse von biochemischen Untersuchungen belegen jedoch, dass der Kontakt mit dem $\beta/A4(1-40)$ -Amyloid die Astrozyten zu einer erhöhten ApoE-Produktion anregt. Inkubation mit der Amyloid-Sequenz $\beta/A4(1-40)$ führten ausserdem zu einer erhöhten Produktion des neuronalen Wachstumsfaktors (NGF) in den Astrozyten, während die Produktion des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors (bFGF) unbeeinflusst war. Es ist deshalb davon auszugehen, dass der Einfluss des Amyloids auf die ApoE-Produktion spezifisch ist.

Die stärkere Markierung der Astrozyten mit S100 β bei Zugabe von Amyloid lässt vermuten, dass die intrazelluläre Calcium-Homöostase beeinflusst ist. Diese Hypothese wurde durch Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration überprüft. Nach Inkubation mit den Fragmente $\beta/A4(1-40)$, (1-42) bzw. (1-43) war die gemessene intrazelluläre Calcium-Konzentration in den Astrozyten geringfügig verringert. In Neuronen führen diese Fragmente zu einem Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels. Die Qualität und das Ausmaß der Wirkung der verschiedenen Amyloid-Sequenzen auf die Verfügbarkeit von ApoE im Medium sind von ihrer Aminosäure-Sequenz und dem Anteil an hydrophoben Aminosäuren abhängig. Des Weiteren ist auf Grund der vorliegenden Ergebnisse zu schließen, dass sich die reverse Amyloid-Sequenz $\beta/A4(40-1)$ bei derartigen Experimenten nicht als Kontroll-Substanz eignet.

2 Einleitung

2.1 Apolipoprotein E

Von den etwa 14 zurzeit bekannten Apolipoproteinen ist Apolipoprotein E (ApoE) in seiner Struktur und seinen Funktionen am besten charakterisiert (zum Überblick siehe [1]). Ganz allgemein dienen Apolipoproteine dazu den Lipoprotein-Metabolismus zu regulieren und den Transport sowie die Verteilung von Lipiden und fettlöslichen Stoffen (z.B. Cholesterin) zwischen Geweben und Zellen zu kontrollieren. Drei Eigenschaften der Apolipoproteine ermöglichen diese Rolle: (1) Mit ihrer Eigenschaft Lipide zu binden, stabilisieren sie die pseudomizellare Struktur von Lipoprotein-Partikeln. (2) Apolipoproteine können als Kofaktoren oder Aktivatoren von verschiedenen Enzymen oder Lipid-Transfer-Proteinen fungieren, die in den Remodellierungs-Metabolismus von Lipoproteinen, beispielsweise im Plasma, involviert sind. (3) Und schließlich können ApoB100 und ApoE als Liganden für Lipoprotein-Rezeptoren an Zelloberflächen dienen. Mit dieser speziellen Eigenschaft dirigieren ApoB100 und ApoE die Anlieferung und Verteilung von Lipiden zu Zellen, welche die Expression entsprechender Rezeptoren zeigen. Rezeptor-vermittelte Pfade sind Schlüsselkomponenten des Lipoprotein-Metabolismus und der Cholesterin-Homöostase [2-4].

Im Gehirn werden lediglich ApoE und ApoJ exprimiert. Dabei steht ApoE mengenmäßig und wegen seiner Rolle als Ligand für Lipoprotein-Rezeptoren im Vordergrund. Im Gegensatz zu ApoE im Plasma ist über die Regulation der ApoE-Synthese und -Sekretion im Gehirn wenig bekannt. Über seine Funktion im Lipidtransport hinaus gibt es Hinweise darauf, dass ApoE in die neuronale Homöostase eingebunden ist. In Neuronen steigt die ApoE-Menge als Antwort auf Verletzungen oder Krankheit [5-8]. Eine der drei beim Menschen hauptsächlich existierenden ApoE-Isoformen, ApoE4, gilt als Risikofaktor für die Alzheimersche Krankheit (*Alzheimer's Disease*, AD), wobei der Wirkmechanismus noch nicht aufgeklärt ist. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass ApoE-Rezeptoren in neuronale Prozesse im Allgemeinen und in die AD-Pathophysiologie im Speziellen involviert sind.

2.2 ApoE und die Alzheimersche Krankheit

AD ist ein neurodegenerativer Symptomen-Komplex, der durch Amyloid *Plaques*¹ [9], neurofibrilläre *Tangles* (NFT)² und den Verlust von Synapsen charakterisiert ist. Amyloid Plaques entstehen durch das anomale proteolytische Prozessieren des Amyloid-Vorläuferproteins APP (*amyloid precursor protein*), einem integralen Membranprotein, welches in vielen Zelltypen inklusive Neuronen und Gliazellen auftritt. NFTs entstehen als Folge einer

¹ Fleck

² Neurofibrilläre Knäuel

Mikrotubuli-Destabilisierung und einer Aggregation des Mikrotubuli-stabilisierenden Proteins Tau in Folge übermäßiger Phosphorylierung. Plaques und NFTs sind gleichermaßen Ursache und Indikatoren der neuronalen Fehlfunktionen die schließlich zu einem Schwund von Synapsen führen [10]. Die dadurch entstehende Verringerung der neuronalen Konnektivität ist eine der wahrscheinlichsten Erklärungen für den Gedächtnisverlust und die progressive Demenz, welche die klassischen klinischen Zeichen der AD darstellen. Die Wahrscheinlichkeit an der Alzheimerschen Krankheit zu erkranken nimmt mit steigendem Alter zu. Sind es in der Altersgruppe von 65 bis 74 Jahren noch 3,0 %, so steigt der Anteil auf 18,7 % in der Altersgruppe von 75 bis 84 Jahren und 47,2 % bei Menschen über 84 Jahren [11].

Vor allem *Genetic Linkage*³ Studien haben geholfen die molekularen Grundlagen von AD besser zu verstehen und einige der Gene zu identifizieren, die bei der Entwicklung von AD eine Rolle spielen (Tabelle 1).

| Krankheitsbeginn | Genprodukt | Beziehung zu AD | Chromosom |
|--------------------|---|-----------------|-----------|
| <i>early onset</i> | Amyloid Vorläuferprotein (amyloid precursor protein, APP) | ++ | 21 |
| | Presenilin 1 (PS1) | ++ | 14 |
| | Presenilin 2 (PS2) | ++ | 1 |
| <i>late onset</i> | Apolipoprotein E (ApoE) | ++ | 19 |
| | LDL-receptor-related Protein (LRP) | + | 12 |
| | α_2 -Macroglobulin (α_2 M) | + | 12 |
| | FE65 | + | 11 |
| | Chromosom 12 Genprodukt, verschieden von LRP und α_2 M | + | 12 |

Tabelle 1: Dominante Mutationen, welche die *early-onset* Form des AD verursachen, wurden als APP, PS1 und PS2 identifiziert. Sie verursachen einen verstärkten Abbau des APP zu β /A4-Amyloid [12-17]. Das ApoE4-Allel wurde durch eine große Anzahl von Studien mit der *late-onset* Form von AD in Beziehung gebracht. LRP, ein multifunktionaler Rezeptor, der ApoE und zahlreiche andere Liganden bindet [18, 19], wird durch eine Reihe von Untersuchungen in eine schwächere Verknüpfung zur *late-onset* Form von AD gebracht [20, 21]. Eine genetische Verbindung von α_2 M, einem Liganden von LRP, wird von einigen [22], allerdings nicht allen Untersuchungen bestätigt. FE65 ist ein Zytoskelettprotein, das mit den zytoplasmatischen Domänen von APP [23, 24] und LRP [25] interagiert. Es wurde einerseits gezeigt, dass der intronische, biallelische Polymorphismus dieses Gens mit sporadischem AD in Verbindung steht [26] und andererseits FE65 eine Wirkung auf das Prozessieren des APPs hat [27, 28]. Es gibt Hinweise auf ein drittes, noch nicht identifiziertes Genprodukt auf Chromosom 12, das mit sporadischem *late-onset* AD in Beziehung steht, wie man von *Gene Linkage* Studien her weiß

³ Studien über die gemeinsame Vererbung und Assoziation von Genen

[29]. Stärke der Assoziation zu AD: ++: klar etabliert, +: schwächere Assoziation oder fehlende unabhängige Bestätigung.

Diese Gene können grob in zwei Klassen aufgeteilt werden, je nachdem ob sie eine Prädisposition für die *early-onset*⁴ oder für die *late-onset*⁵ Form des AD mit sich bringen (siehe Tabelle 1). Mutationen der Gene der *early-onset* Gruppe beeinflussen direkt die Geschwindigkeit des anomalen Prozessierens von APP zur amyloidogenen Form des β /A4-Peptids. Gene, die eine Prädisposition für die *late-onset* Form von AD mit sich bringen, kodieren für Produkte die wahrscheinlich alle mit einer Klasse von Zelloberflächenrezeptoren interagieren können, die als LDL-Rezeptorfamilie bekannt sind [30]. Alle Mitglieder dieser Familie sind Rezeptoren für ApoE. Im Gehirn wird der Hauptanteil von ApoE von glialen Zellen hergestellt, wohingegen die Expression der ApoE-Rezeptoren vor allem in Neuronen stattfindet [30].

Erste Hinweise auf eine Beziehung zwischen ApoE und der Alzheimerschen Krankheit gibt es seit 1991 mit der immunhistologischen Lokalisierung von ApoE in extrazellulären Amyloid-Ablagerungen, einschließlich vaskulärer Plaques, und in Neuronen mit NFTs [31, 32]. 1993 wurde bekannt, dass in einer Gruppe nicht verwandter Patienten mit familiärem⁶ *late-onset* AD das ApoE4-Allel überrepräsentiert war [6]. Dies führte zur Annahme, dass es sich hierbei um einen allel-spezifischen Effekt handelt. Auch für Patienten mit sporadischem *late-onset* AD konnte dieser Zusammenhang gezeigt werden [33]. Darüber hinaus wurde ein Gen-Dosis-Effekt von ApoE auf das Risiko und den Krankheitsbeginn etabliert [16, 17]. Bei familiärem *late-onset* AD stieg mit zunehmendem ApoE4-Allel von keinem zu einem und zwei Allelen das Risiko AD zu entwickeln von 20 auf 90 % und das mittlere Alter des Krankheitsbeginns sank von durchschnittlich 84 auf 68 Jahre. Diese Tendenz gilt auch für sporadischen *late-onset* AD. Trotz allem können unsere aktuellen Kenntnisse über die biochemischen Eigenschaften des ApoE nicht völlig die Rolle erklären, die dies Protein in dem pathogenetischen Prozess spielt der zu AD führt.

2.3 ApoE Struktur

Das 299 Aminosäuren lange Protein besteht aus zwei strukturellen Domänen, die für die unterschiedlichen Funktionen des ApoEs verantwortlich sind [34-36]. Die amino-terminale Domäne (AS 1-191) beinhaltet die Lipoprotein-Rezeptor-bindende Region (AS 136-158) [37], die C-terminale Domäne die Lipoprotein (Lipid)-bindende Region (AS 216-299) [38]. Der N-Terminus besteht aus einem Bündel von vier antiparallel angeordneten Helices [39]. Basische Aminosäuren in der Rezeptor-bindenden Region, die direkt mit den Lipoprotein-Rezeptoren interagieren, reichen aus dem Bündel heraus und formen ein positiv geladenes Areal, von dem

⁴ früh beginnende, < 50 Jahren

⁵ spät beginnende, > 65 Jahren

⁶ AD tritt in einigen Familien stark gehäuft auf und wird vererbt.

man annimmt, dass es mit einer Anhäufung negativer Ladungen auf dem Lipoprotein-Rezeptor kommuniziert. Die Struktur des Lipoprotein-bindenden C-Terminus ist nicht genau bekannt, es wird aber vermutet, dass es sich um eine Anordnung mehrerer Helices handelt. Dabei scheinen vor allem die AS 244-272 für die Bindung des Lipids und die bevorzugte Bindung der verschiedenen Lipoproteine durch die Isoformen ausschlaggebend zu sein [40].

Die drei häufigsten humanen Allele ($\epsilon 3$, $\epsilon 4$ und $\epsilon 2$) auf Chromosom 19 [41, 42] kodieren für die Haupt-Isoformen des ApoE-Proteins (E3, E4 und E2) [4, 43]. Es sind deshalb drei homozygote ($\epsilon 3/3$, $\epsilon 4/4$ und $\epsilon 2/2$) und drei heterozygote ($\epsilon 3/4$, $\epsilon 3/2$ und $\epsilon 2/4$) Kombinationen von Genotypen möglich. Die drei Haupt-Isoformen des ApoE-Proteins unterscheiden sich im Vorhandensein eines Cysteins oder Arginins an zwei polymorphen Stellen: ApoE3, die am häufigsten vorkommende Isoform, hat ein Cystein an Position 112 und ein Arginin an Position 158, wohingegen ApoE2 an beiden Positionen je ein Cystein und ApoE4 je ein Arginin besitzt [1, 4].

Strukturelle Änderungen in einer Domäne des Proteins beeinflussen die Eigenschaften der anderen Domänen, eine Erscheinung, die als Domänen-Interaktion bekannt ist [1]. Ein Cystein-Arginin-Austausch in der N-terminalen Domäne an der Aminosäure 112, die ApoE3 von ApoE4 unterscheidet, bestimmt über die Klasse von Lipoproteinen die an die C-terminale Domäne binden. ApoE3 und E2 (Cystein-112) bevorzugen *high density lipoproteins*⁷, HDL, ApoE4 hingegen *very low density lipoproteins*⁸, VLDL [38, 44, 45]. Hierin wird der Zusammenhang von ApoE4 mit erhöhten Konzentrationen von Cholesterol und LDL im Blutplasma und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen gesehen [46]. Konkret liegt bei ApoE3 und E2 die Arginin-61-Seitenkette (Helix 2) über einer Spalte zwischen den Helices 2 und 3. In ApoE4 bildet sich eine neue Salzbrücke zwischen Glutaminsäure-109 und Arginin-112. Aus diesem Grund wird die Arginin-61-Seitenkette hier von dem Helicesbündel weg in das wässrige Milieu gedrängt, bildet mit Glutaminsäure-255 eine Salzbrücke aus und verändert die Interaktion mit dem C-Terminus [38-40]. Im Vergleich mit neun weiteren Spezies, von denen ApoE sequenziert wurde, weist nur die humane ApoE4-Sequenz ein Arginin an Position 61 auf, alle anderen besitzen an dieser Stelle ein Threonin. Obwohl sieben der untersuchten Spezies eine entsprechende Arginin-112-Position enthalten, müssen sie wegen des Mangels an Arginin-61 als ApoE3-ähnlich betrachtet werden, was für die Entwicklung eines Tiermodells ein entscheidendes Problem darstellt [1].

2.4 ApoE-Rezeptoren

Alle Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie sind Rezeptoren für ApoE. Von den sieben bei Säugern bekannten Vertretern der LDL-Rezeptorfamilie sind alle sehr ähnlich aufgebaut [30]. Sie sind

⁷ Lipoproteine hoher Dichte

⁸ Lipoproteine sehr geringer Dichte

namentlich als LDL-Rezeptor, *LDL-Receptor Related Protein*⁹ (LRP), ApoE-Rezeptor-2 (ApoER2), MEGF7, VLDL-Rezeptor, Megalin und LRP1B in die Literatur eingegangen. Verschiedene zelluläre Prozesse oder Pfade, in die neuronale ApoE-Rezeptoren involviert sind, könnten die Alzheimer-Pathologie beeinflussen. Sie beinhalten Interaktionen mit APP, Modulation der Amyloid-Abräumung aus dem extrazellulären Raum und Übertragung von Signalen zu Neuronen. Jede dieser Funktionen kann durch die Bindung des ApoE an die extrazellulären Domänen der verschiedenen Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie beeinflusst werden. Die Entfernung von β /A4-Amyloid aus dem extrazellulären Raum ist ein weiterer die AD-Pathogenese beeinflussender Mechanismus der ApoE potentiell einschließt. Im Interzellularraum liegt ApoE aller Wahrscheinlichkeit in Form von discoiden Lipoproteinen vor, die an Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie binden können. Diese ApoE-Discen können β /A4-Amyloid enthalten und ihre zelluläre Aufnahme führt folglich zu einer Entfernung des β /A4-Amyloids aus dem extrazellulären Raum [47].

2.5 ApoE Regulierung

Die ApoE-Synthese kann in einer Vielzahl von Zelltypen durch hormonelle, entwicklungsbedingte und andere Faktoren reguliert werden [48-51]. Über die Regulation der Synthese und die Sekretion dieses Proteins in Zellen des Gehirns ist allerdings wenig bekannt. Die ApoE-Sekretion bei humanen Astrozyten-Primärkulturen kann durch eine Kombination von Interleukin 1 α und β und Interferon γ reduziert werden [52, 53]. Östrogen, hingegen, erhöht die ApoE mRNA-Menge in Rattengehirnen *in vivo* und in Astrozyten-Reinkulturen und Mischkulturen glialer Zellen *in vitro* [54]. Seit 1996 ist bekannt, dass bei einer kombinierten Inkubation von dBcAMP und RA von U87 Astrozytomazellen der dBcAMP-vermittelte Anstieg der ApoE-Sekretion potenziert wird [55]. dBcAMP wird von der Zelle aufgenommen, aktiviert als cAMP-Analogon die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA). All-trans-Retinolsäure (RA) bindet in seiner Eigenschaft als Ligand an die nuklearen Retinolsäure-Rezeptoren (RAR) und Retinoid-X-Rezeptoren (RXR). Die gebundenen RAR und RXR fungieren als Transkriptionsfaktoren und sind somit in der Lage die Transkriptionsrate zu erhöhen.

2.6 Experimentelle Fragestellung

Apolipoprotein E ist ein im Gehirn sekretiertes Protein, das eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimerschen Demenz innehat. Während dieser degenerativen Ereignisse entsteht in der Regel eine reaktive Gliosis, die eine Serie von morphologischen und biochemischen Veränderungen in Astrozyten auslöst. Eine dieser Veränderungen ist die überreiche Produktion von ApoE [56]. Vor kurzem veröffentlichte

⁹ LDL-Rezeptor assoziiertes Protein.

genetische Untersuchungen legen nahe, dass das Ausmaß der ApoE-Produktion das Risiko für AD bestimmt [57-60]. Dies erscheint Grund genug regulierende Faktoren zu untersuchen, welche die Sekretion dieses Proteins im Gehirn beeinflussen.

Astrozyten besitzen eine Anzahl von Rezeptoren für eine Vielzahl von Neurotransmittern und Neuromodulatoren (zum Überblick siehe [61, 62]). Von diesen stehen viele in Verbindung mit der Adenylatcyclase und cAMP als „Second Messenger“¹⁰. Andere beeinflussen die Phospholipase C (PLC)-vermittelte Spaltung von Phosphoinositiden mit anschließender PKC Aktivierung und Ca²⁺-Mobilisierung.

Die Untersuchungen an U87 Astrozytoma Zellen [55], bei welchen cAMP und RA in der Lage waren die ApoE-Synthese synergistisch hoch zu regulieren, deuten darauf hin, dass die Adenylatcyclase und nachgeschaltete Proteinphosphorylierungsprozesse bei der ApoE-Stimulierung eine Rolle spielen könnten. Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Arbeit Ratten-Astrozytenkulturen mit Rezeptor-Agonisten, cAMP-Analoga, DAG-Analoga, Transkriptionsverstärkern und Neurotransmittern inkubiert werden von denen bekannt ist, dass sie die oben genannten Signalpfade beeinflussen. Besonderes Interesse galt Substanzen, die den intrazellulären cAMP-Spiegel als cAMP-Analoga (Dibutyryl-cAMP, dBcAMP) oder über β -Adrenorezeptor-Stimulation (Isoproterenol) beziehungsweise α 2-Adrenorezeptor-Inhibierung (Clonidine) der Adenylatcyclase beeinflussen. Da auch der Phosphatidylinositol-Hydrolyse-Pfad über adrenerge Rezeptoren reguliert wird und es Hinweise auf eine Kopplung der beiden Pfade in Astrozyten gibt [63], wurden hier Diacylglycerol (DAG)-Analoga (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat, PMA), α 1-adrenerge Rezeptor-Agonisten (Arterenol), acetylcholine-muscarinische-Rezeptor-Agonisten (Carbachol) und der Neurotransmitter Serotonin getestet. All-trans-Retinolsäure bindet in seiner Eigenschaft als Ligand an die nuklearen Retinolsäure-Rezeptoren (RAR) und Retinoid-X-Rezeptoren (RXR). Die gebundenen RAR und RXR fungieren als Transkriptionsfaktoren und sind somit in der Lage die Transkriptionsrate zu erhöhen. Es sollte daher überprüft werden, ob auch RA einen Einfluss auf die ApoE-Sekretion, allein oder in Kombination mit dBcAMP, hat. Um zu erfahren, ob dBcAMP, PMA und RA alleine oder dBcAMP in Kombination mit PMA oder RA eine Wirkung auf die ApoE-mRNA-Expression haben, sollte die Menge der ApoE-mRNA nach Inkubation gemessen werden. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob mit der kombinierten Gabe verschiedener Substanzen synergistische Effekte auf die ApoE-Sekretion erzielt werden können. Um sicherzustellen, dass die hervorgerufenen Veränderungen der ApoE-Sekretion spezifisch und nicht Folge eines allgemeinen Protein-Mechanismus sind, sollte die Wirkung der verwendeten Substanzen auf die Sekretion des NGF überprüft werden.

Um zu analysieren, ob sich das in AD-Gehirnen hauptsächlich in Plaques vorkommende Amyloid auf die Regulierung, Sekretion und Verfügbarkeit von ApoE in Astrozytenkulturen auswirkt, sollten Ratten-Astrozyten Primärkulturen mit 10 μ M von verschiedenen langen β /A4-

¹⁰ Zweiter Bote, zellinternes Signal, englischer Ausdruck auch in der deutschen Fachsprache gebräuchlich

Fragmenten sowie der reversen Sequenz $\beta/A4(40-1)$ inkubiert werden. Um die Verhältnisse im AD-Gehirn nachzuahmen sollten diese Fragmente vor der Inkubation gealtert werden, sodass sich bei einigen von ihnen Fibrillen bilden. Veränderungen der ApoE-Konzentration in Fraktionen von Medium und Zelllysate sowie ApoE-Lokalisierung in den und außerhalb der Zellen wie auch Veränderungen der Zellmorphologie im Vergleich zur Kontrolle können eine Aussage darüber liefern, inwieweit $\beta/A4$ die Produktion, Sekretion und Verfügbarkeit von ApoE beeinflusst. Zu diesem Zweck sollten ApoE-Mengenbestimmungen mittels ApoE-ELISA, immunzytochemische Verfahren, Western Blot-Analysen der Medien- und Zellfraktionen, Calcium-Messungen mittels Fura-Messtechnik sowie Northern Blot-Analysen zur Bestimmung der ApoE-mRNA-Expression durchgeführt werden. Die Spezifität dieser Reaktion sollte durch den Einfluss auf die Synthese und Sekretion anderer Proteine (Neuronaler Wachstumsfaktor, Neuronal Growth Factor, NGF und, basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor, Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF) überprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Antikörper

3.1.1 Primäre Antikörper

| Antigen | Bezugsquelle | Nachweis | Wirt | Kat.Nr. |
|---|---|--|------------------------------------|---------|
| Apolipoprotein E, humanes | Europa Bioproducts, Wicken, Cambridge, Großbritannien | Apolipoprotein E | polyklonal/ Ziege | CR9016G |
| Apolipoprotein E, humanes | Europa Bioproducts, Wicken, Cambridge, Großbritannien | Apolipoprotein E | polyklonal/ Ziege | CR9016 |
| β /A4-Amyloid, humanes | DAKO, Glostrup, Dänemark | Synthetisches Amyloid-Peptid (8-17), human | monoklonal/ Klon 6F/3D/ Maus | M0872 |
| GFAP (Glial fibrillary acidic protein) | Biotrend Chemikalien, Köln | Astrozyten | polyklonal/ Kaninchen | GA1171 |
| MAP2 (Microtubule associated protein-2) | Boehringer Mannheim, Mannheim | Neurone | monoklonal/ Maus | AP20 |
| S100 β | Sigma, Deisenhofen | S100 β | monoklonal/ Maus | S2532 |
| bFGF (Basic fibroblast growth factor) | Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg | FGF-2 (147) | polyklonal/ Kaninchen | sc-79 |

3.1.2 Sekundäre Antikörper und Konjugate

| Bezeichnung | Bezugsquelle | Nachweis | Konjugat | Kat.Nr. |
|--------------------|--|---|--------------------|----------|
| Anti-Ziegen IgG | Rockland, Gilbertsville, PA, USA | Ziegen IgG | FITC | 605-4213 |
| Anti-Isolectin4B | Sigma, Deisenhofen | Mikroglia, terminale α -D-galactosyl-Reste, terminale N-acetyl- α -D-galactosyl-Reste | FITC | L2895 |
| Anti-Maus-IgG | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA | Maus IgG | Biotin | BA-2000 |
| Avidin-D | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA | Biotin | Texas-Red-avidin-D | A-2006 |
| Anti-Kaninchen-IgG | Biotrend Chemikalien, Köln | | TRITC | 711-1024 |

| | | | | |
|--------------------|---|---------------|-----------|----------|
| Anti-Kaninchen-IgG | Rockland, Gilbertsville, PA, USA | Kaninchen IgG | Texas-Red | 611-7902 |
| Anti-Maus-IgG | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA | Maus IgG | FITC | FI-2000 |
| Anti-Kaninchen-IgG | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA | Kaninchen IgG | FITC | FI-1000 |

3.2 Chemikalien

| Substanz | Hersteller | Kat.Nr. |
|---|--|---------|
| Bovines Albumin, Fraktion V = BSA | Carl Roth, Karlsruhe | 8076.3 |
| TRITON-X 100 | Merck, Darmstadt | 108603 |
| Poly-D-Lysin | Sigma, Deisenhofen | P7405 |
| Fötales Kälberserum = FCS | Sigma, Deisenhofen | C6278 |
| LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Assay Kit | Molecular Probes, Leiden, NL | L-3224 |
| Vectashield Mounting Medium | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA | H-1000 |
| TEMED | Carl Roth, Karlsruhe | 2367.1 |
| Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (19:1) | Carl Roth, Karlsruhe | A516.1 |
| 2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure] di-Ammonium Salz = ABTS | Sigma, Deisenhofen | 11557 |
| L-Glutamin | Sigma, Deisenhofen | G6392 |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan = Tris | Carl Roth, Karlsruhe | 5429.3 |
| Natriumdodecylsulfat = SDS | Carl Roth, Karlsruhe | 2326.2 |
| Gentamycin | Sigma, Deisenhofen | G1264 |
| rekombinantes Apolipoprotein E2, human, Lot Nr. 3384, 0,8 mg/ml = rApoE2 | Pan Vera Quality Reagents, Madison, WI, USA | R1195 |
| rekombinantes Apolipoprotein E3, human, Lot Nr. 4943, 0,45 mg/ml = rApoE3 | Pan Vera Quality Reagents, Madison, WI, USA | R1187 |
| rekombinantes Apolipoprotein E4, human, Lot Nr. 4538, 0,45 mg/ml = rApoE4 | Pan Vera Quality Reagents, Madison, WI, USA | R1196 |
| Normales Ziegenserum = NGS | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA | S-1000 |

| | | |
|---|-------------------------------------|--------------|
| N-hydroxysuccinimido-biotin = Biotin-Ester | Sigma, Deisenhofen | H1759 |
| 6-((N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino) hexanoyl)sphingosine (NBD C ₆ -ceramide) | Molecular Probes Europe, Leiden, NL | N-1154 |
| Fura-2-acetoxymethyl-ester (Fura-2-AM) | Molecular Probes Europe, Leiden, NL | F-1201 |
| N6,2'-O-Dibutyryladenodin 3':5'-zyklisches Monophosphat, Natrium Salz = dBcAMP | Sigma, Deisenhofen | D-0627 |
| all trans-Retinolsäure = RA | Sigma, Deisenhofen | R-2625 |
| Phorbol 12-myristat 13-acetat (Porbolester) = PMA | Sigma, Deisenhofen | P-1585 |
| (-)-Isoproterenol, freie Base | Sigma, Deisenhofen | I-6379 |
| (-)-Arterenol, Bitartrat Salz, Hydrat | Sigma, Deisenhofen | A-9512 |
| 5-Hydroxytryptamine, Creatininsulfat-Komplex = Serotonin | Sigma, Deisenhofen | H-7752 |
| Clonidine, Hydrochlorid | Sigma, Deisenhofen | C-7897 |
| Carbamoylcholine, Chlorid = Carbachol | Sigma, Deisenhofen | C-4382 |
| Perfect RNA, eukaryotisch, Mini (50 Ansätze) | Eppendorf, Hamburg | 0032 006.108 |
| M-MLV Reverse Transcriptase RNase H minus | Promega Diagnostics, Mannheim | M5301 |
| Polymerase Chain Reaction Digoxigenein (DIG) Probe Synthese Kit | Roche, Mannheim | 1636090 |
| Piperazin-N,N'-bis[2-Ethansulfonische Säure] Di-Natrium-Salz = PIPES | Merck, Darmstadt | 110220 |
| Lachssperma DNA | Amersham/Bioscience, Freiburg | 27-4546-01 |
| Enhanced Chemiluminescence Reagent (ECL) Kit | Amersham/Bioscience, Freiburg | RPN2133 |
| Hyperfilm™ ECL | Amersham/Bioscience, Freiburg | RPN2104K |

3.3 Medien und Lösungen

3.3.1 Zellisolierung und Zellkultur

| Substanz | Hersteller | Kat.Nr. |
|--|-------------------------------|-----------|
| Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium = DMEM | Life Technologies, Eggenstein | 41965-039 |
| Modifiziertes Eagle Medium = MEM | Life Technologies, Eggenstein | 11935046 |
| Hepes Pufferlösung 1 M | Life Technologies, Eggenstein | 15630080 |
| Hank's gepufferte Salzlösung = HBSS | Life Technologies, Eggenstein | 14175 |

| | |
|---------------------------------------|--|
| Homogenisierungspuffer (pH 7,0) | 100 mM TRIS 400 mM NaCl 1 Tablette Complete™ (Boehringer Proteaseinhibitoren Cocktail Tabletten mit EDTA)/50 ml Puffer |
| Lysatpuffer (pH 8,0) | 50 mM TRIS 150 mM NaCl 1 % (v/v) Nonidet P40 1 Tablette Complete™/50 ml Puffer |
| Hepes gepuffertes MEM = HMEM (pH 7,3) | 15 mM Hepes |

3.3.2 Immunzytologie

| | |
|-------------------------------|---|
| Fixierungslösung | 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS |
| Phosphatpuffer (= PB, pH 8,4) | 100 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ |
| Hepes gepuffertes MEM- HMEM | 15 mM Hepes in MEM |

3.3.3 Antikörper-Isolierung und -Biotinylierung

| | |
|--|--|
| Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS, pH 7,4) | 150 mM NaCl 50 mM KCl 200 mM NaH ₂ PO ₄ |
| Glycinpuffer (pH 2,5) | 200 mM Glycin 150 mM NaCl 15 µM BSA |
| Zitronensäurepuffer (pH 5,4) | 20 mM Zitronensäure-Monohydrat (C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O)/Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2 H ₂ O) |
| Carbonatpuffer (pH 10,3) | 200 mM Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ |

| | |
|--------------------|---|
| Biotin-Stammlösung | 30 mM N-hydroxy succinimido-biotin/Dimethylformamid |
|--------------------|---|

3.3.4 ELISA

| | |
|------------------------------|--|
| Beschichtungspuffer (pH 9,6) | 50 mM NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃ |
| Waschpuffer (pH 7,2) | 50 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 150 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20® |
| Blockierungspuffer | Waschpuffer mit 10 % (v/v) FCS |
| Antikörperpuffer | PBS mit 10 % (v/v) FCS |
| Entwicklungspuffer (pH 4,2) | 50 mM NaH ₂ PO ₄ 100 mM CH ₃ COONa x 3 H ₂ O/CH ₃ COOH |

3.3.5 SDS-PAGE

| | |
|---------------------------------|--|
| 5 x Probenpuffer, reduzierend | 310 mM TRIS 400 mM SDS 50 % (v/v) Glycerin 3 % Bromphenolblau 80 mM Dithiothreitol |
| Trenngelpuffer (pH 8,8) | 1,5 M TRIS 0,4 % (w/v) SDS |
| Sammelgelpuffer (pH 6,8) | 0,5 M TRIS 0,4 % (w/v) SDS |
| Elektrophoresepuffer (pH ≈ 8,5) | 25 mM TRIS 200 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS |

| Lösungen | Trenngel: 12,5 % (v/v) | Sammelgel: 4 % (v/v) |
|---|---------------------------|-------------------------|
| Trenngelpuffer | 2,7 ml | - |
| Sammelgelpuffer | - | 1,25 ml |
| H ₂ O | 4,86 ml | 3,14 ml |
| Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (19:1) | 3,24 ml | 0,56 ml |
| Temed | 5,4 µl | 5,0 µl |
| 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung (in H ₂ O) | 150 µl | 100 µl |

Tabelle 2: Zusammensetzung der Gele.

3.3.6 Western Blot, Ponceau S-Färbung und immunochemische Detektion

| | |
|---|---|
| Transferpuffer | 50 mM TRIS 40 mM Glycin 0,037 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol |
| Ponceau S-Lösung | 100 mg Ponceau S 40 ml Methanol 15 ml konzentrierte Essigsäure H ₂ O add 100 ml |
| TRIS gepufferte Salzlösung (TBS, pH 7,5) | 50 mM TRIS 200 mM NaCl |
| TRIS gepufferte Salzlösung mit Tween (TBST, pH 7,5) | TBS, 0,05 % (v/v) Tween 20 [®] |
| Blockierungs- und Antikörperpuffer | TBST, 1,5 % (w/v) BSA |

3.3.7 ApoE RNA-Isolierung

| | |
|---|---|
| Denhardts Puffer | 0,02% BSA 0,02% Ficoll 0,02% Polyvinylpyrrolidene 1mM EDTA 50 mM NaCl 10 mM TRIS/HCl pH 7 |
| Hybridisierungspuffer | 50 % Formamid 1 % (w/v) SDS 5 x Denhardts Puffer 5 x Na-Citrat-Salzlösung 30 mM Piperazin-N,N'-bis [2-Ethansulfonische Säure] Di-Natrium-Salz 100 µg Lachssperma DNA |
| TRIS gepufferte Salzlösung (TBS, pH 7,5) | 50 mM TRIS 200 mM NaCl |
| TRIS gepufferte Salzlösung mit Tween (TBST, pH 7,5) | TBS, 0,05 % (v/v) Tween 20 [®] |

3.4 Methoden

Das in den beschriebenen Methoden verwendete Wasser (H₂O) wurde über eine Millipore-Anlage demineralisiert.

3.4.1 Anlegen primärer Astrozytenkulturen

Die Isolierung von Hippocampus-Astrozyten aus dem Rattengehirn erfolgte in Anlehnung an die von McCarthy and DeVellis (1987) beschriebene Methode [64]. Die Hippocampi 1-Tag-alter Wistar-Ratten (P1) wurden unter sterilen Bedingungen auf Eis präpariert und die Meningen entfernt. Das Gewebe wurde in gepufferter Salzlösung gewaschen (HBSS) und 30 Minuten (min) mit einer 0,25 %igen Trypsinlösung in HBSS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Nach 3 x Waschen mit Astrozytenmedium (DMEM, 10 % FCS, 1 % Glutamin, 1 % Gentamycin) wurde das Gewebe mit einer feuerpolierten Pasteurpipette titriert¹¹. Die Ausplattierung der Zellen auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern in Zellkulturplatten (Falcon, Becton Dickson Labware, Oxnard, CA) oder Zellkulturflaschen (23 cm², NunclonTM surface, Nunc Brand Products, Dänemark) erfolgte in einer Dichte von 60.000 Zellen/cm². Nachdem die Zellen auf den Deckgläsern anhafteten, wurde das Medium gewechselt und die Primärkulturen im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ (v/v) und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zweimal pro Woche erfolgte ein partieller Wechsel des Mediums. Für die Experimente wurden 10-14-Tage-alte Kulturen verwendet. Zur Entfernung der Oligodendrozyten und Mikroglia wurden vor dem Medienwechsel die Kulturplatten oder Flaschen vorsichtig gegen die Hand geschlagen. Unter diesen Kulturbedingungen dominierten Astrozyten, die eine konfluente Lage von Zellen auf der Oberfläche des Deckglases bildeten.

3.4.2 Kontrolleexperimente

Damit Astrozyten-Primärkulturen unter Bedingungen wachsen, die eine hohe Reproduzierbarkeit der Inkubationsversuche gewährleisten, wurden regelmäßig Zelldichte, -form (siehe Abbildung 19a, c; Kapitel 4.5.2) und -überlebensfähigkeit (siehe Kapitel 4.1.2) überprüft. Auch ELISA (siehe Kapitel 4.1.3) und Western Blot (siehe Kapitel 4.1.4) unterlagen mittels Regressionsgeraden bzw. Positivkontrollen einer regelmäßigen Kontrolle.

¹¹ Die Gewebestückchen werden durch die verengte Pasteurpipette aufgezogen und wieder ausgeblasen. Vorgang wird fünfmal wiederholt.

3.4.3 Histochemische Arbeitsmethoden

Alle in den Versuchen verwendeten Antikörper wurden vor Verwendung auf Kreuzreaktionen überprüft und dann so ausgewählt, dass in den verwendeten Konzentrationen keine Kreuzreaktionen auftraten.

3.4.3.1 *Immunzytochemische Charakterisierung der Zellkulturen als Astrozyten*

Zur immunzytochemischen Charakterisierung der verwendeten Astrozyten-Primärkulturen aus P1 Wistar-Ratten (siehe 3.3.1) wurden die Zellen 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen und für 20 min mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x 5 min mit 1,5 % (w/v) BSA in PBS (BSA/PBS) gewaschen, für 20 min mit 0,1 % (v/v) Triton-X 100 und BSA/PBS permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen blockiert. Daran schloss sich eine einstündige Inkubation mit Anti-MAP2-Antikörpern, FITC-konjugiertem Isolectin4B oder Anti-GFAP-Antikörpern (1:200 verdünnt mit BSA/PBS) an. Zur Detektion wurden FITC-anti-Maus-IgG-Antikörper oder Texas-Red-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, beide 1:100 verdünnt mit BSA/PBS, verwendet. Doppel-Immunfärbungen wurden in den Kombinationen MAP2/GFAP oder Isolectin4B/GFAP durchgeführt. Nach Fixierung und jeder Antikörper-Inkubation wurde 3 x 5 min mit BSA/PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingebettet und mit Nagellack versiegelt.

3.4.3.2 *ApoE- und $\beta/A4$ -Doppel-Immunfärbung der mit $\beta/A4$ -Fragmenten inkubierten Astrozyten*

Für die ApoE- und $\beta/A4$ -Doppel-Immunfärbung der mit $\beta/A4$ -Fragmenten inkubierten Astrozyten (siehe 3.4.6.3.3) wurden die Zellen wie oben beschrieben fixiert, permeabilisiert und blockiert. Daran schloss sich eine einstündige Doppel-Immunfärbung mit Anti-ApoE-Antikörpern und Anti- $\beta/A4$ -Antikörpern (1:100 verdünnt in BSA/PBS) an. Für die Detektion wurden die Zellen 1 h mit FITC-konjugierten Anti-Ziegen-IgG-Antikörpern und Biotin-markierten Anti-Maus-IgG-Antikörpern (1:100 verdünnt in BSA/PBS) inkubiert. Schließlich folgte eine einstündige Inkubation mit Texas-Red-Avidin-D. Diese Prozedur wurde nur bei Verwendung von Amyloiden durchgeführt, die die Amyloid-Aminosäuren 8-17 beinhalten (gegen diese richteten sich die Anti-Amyloid-Antikörper).

3.4.3.3 *Immunzytochemische Detektion von S100 β der mit $\beta/A4$ -Fragmenten inkubierten Astrozyten*

Für die S100 β - und $\beta/A4$ -Doppel-Immunfärbung der mit $\beta/A4$ -Fragmenten inkubierten Astrozyten (siehe 3.4.6.3.3) wurden die Zellen wie oben beschrieben fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Daran schloss sich eine einstündige Doppel-Immunfärbung mit Anti-S100 β -Antikörpern (1:200 verdünnt in BSA/PBS) und Anti- $\beta/A4$ -Antikörpern (1:100 verdünnt in BSA/PBS) an. Für die Detektion wurden die Zellen 1 h mit

TRITC- konjugierten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern und Biotin-markierten Anti-Maus-IgG-Antikörpern, beide 1:100 verdünnt in BSA/PBS inkubiert. Schließlich folgte eine einstündige Inkubation mit Texas-Red-Avidin-D. Diese Prozedur wurde nur bei Verwendung von Amyloiden durchgeführt, die die Amyloid-Aminosäuren 8-17 beinhalten.

3.4.3.4 bFGF-Immunfärbung der mit β /A4-Fragmenten inkubierten Astrozyten

Für die bFGF-Färbung der mit β /A4(1-40)-Fragmenten inkubierten Astrozyten (siehe 3.4.6.3.3) wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und blockiert. Daran schlossen sich je einstündige Inkubationen mit anti-bFGF-Antikörpern (1:100 verdünnt in BSA/PBS) und FITC-anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern (1:100 verdünnt in BSA/PBS) an.

3.4.3.5 Färbung des Golgi-Apparats der mit β /A4-Fragmenten inkubierten Astrozyten

Astrozyten wurden 72 h mit Kontrollmedium (PBS) oder mit 10 μ M β /A4(1-40) inkubiert. Die Färbung des Golgi-Apparats wurde mit BSA-gekoppeltem NBD C₆-Ceramide durchgeführt [65]. Dazu wurde eine 1 mM Stammlösung von NBD C₆-Ceramide in Chloroform/Ethanol (19:1 v/v) hergestellt. 50 μ l dieser Stammlösung wurden unter Stickstoff-Atmosphäre getrocknet und in 200 μ l Ethanol gelöst. Unter Vortexen wurde diese Ethanolösung in 10 ml HMEM (Hepes gepuffertes MEM) mit BSA (3,4 mg/ ml) zugegeben (Endkonzentration NBD: 5 μ M, BSA: 5 μ M). Um den Ethanol zu entfernen wurde die Lösung über Nacht bei 4°C gegen 500 ml HMEM dialysiert und in 2 ml Aliquots bei -20°C gelagert. Für die Golgi-Färbung wurden die Zellen 30 min bei 2°C zunächst mit der Färbelösung, dann in BSA/HMEM für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und wie oben beschrieben immunzytochemisch für den Nachweis von Amyloid gefärbt. Die optische Analyse erfolgte mit einem Inversmikroskop (Olympus IX 70) und Filtern für FITC und TRITC.

3.4.4 Lebend-tot-Nachweis der Astrozyten

Um auszuschließen, dass unterschiedliche Überlebensraten der Zellen die Ergebnisse beeinflussen, wurde für alle im Rahmen dieser Arbeit mit Chemikalien behandelten Zellen im Anschluss an die erste Inkubation ein Lebend-tot-Nachweis mit dem LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity Assay Kit von Molecular Probes nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Methode beruht auf der unterschiedlichen Aufnahme von Ethidiumhomodimer-1 (EthD-1), einem Indikator für tote Zellen. Dieser dringt durch geschädigte Membranen in die Zellen ein und wird in seiner Fluoreszenz 40-fach verstärkt, wenn er an Nucleinsäuren bindet. Bei Anregung mit ~495 nm zeigt es eine rote Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum von ~635 nm. Calcein-acetoxymethyl-ester (Calcein AM), ein Indikator für lebende Zellen, wird von den Zellen aufgenommen und wird durch die in lebenden Zellen ubiquitär vorkommende Esteraseaktivität hydrolysiert, die das nicht-fluoreszierende Calcein AM in fluoreszierendes Calcein umwandelt. Bei Anregung mit ~495 nm zeigt es eine grüne

Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum von ~515 nm. Die Überlebensrate der Zellen wurde analysiert, indem die Zellzahl verschiedener Inkubationen und der Kontrollen verglichen und das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen bestimmt wurde. Zu diesem Zweck wurde ein Inversmikroskop (Olympus IX 70) mit Filtern für FITC und TRITC verwendet.

3.4.5 Biochemische Arbeitsmethoden

3.4.5.1 Anti-Apolipoprotein E-Antikörper-Affinitätsreinigung und –Biotinylierung

Für die Affinitätsreinigung des anti-Apolipoprotein E-Antikörpers (a-ApoE-Ak) wurden 4 Nitrozellulose-Membranen (Zellulosenitrat BA38, Schleicher & Schuell) mit 10 µg Antigen (rekombinantes Apolipoprotein E2, E3 und E4, Pan Vera Quality Reagents) je cm² beladen. Dazu wurden rApoE2, E3 und E4 in PBS über Nacht bei RT mit den in PBS angefeuchteten Nitrozellulose-Membranen auf dem Schüttler inkubiert.

Nach 3 x Waschen der Membran für 10 min mit PBS wurden die nicht mit Antigen abgesättigten Bindungsstellen der Nitrozellulose-Membranen mit 5 % (v/v) *Normal Goat Serum* (NGS, Ziegenserum) in PBS 1 h bei RT auf dem Schüttler blockiert. Anschließend wurde Anti-ApoE-Antikörper Rohserum (Rolf Greiner BioChemica) in einer Verdünnung von 1:200 zu der Blockierlösung gegeben und damit 5 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nicht gebundene Antikörper und Serum wurden durch 3 x Waschen mit PBS entfernt. Die Antikörper wurden für 30 min mit Glycinpuffer eluiert. Das Eluat wurde 1 x über Nacht und 2 x für 3 Stunden (h) gegen Citratpuffer (pH 5,4) bei 4°C dialysiert, mittels Filtervorsatz (0,45 µm, Schleicher/Schuell) sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. Dieser Vorgang wurde 5 x wiederholt (Blockierung, Antikörper-Inkubation und Elution).

Für die weitere Reinigung und Konzentrierung wurde die Antikörperlösung mit in Citratpuffer (pH 5,4) aufgequollenem SP-Sephadex C50 für 1,5 h bei RT auf dem Schüttler in einem großen Becherglas inkubiert (1:10 v/v) und anschließend dekantiert. Nach 3 x Waschen mit Citratpuffer für 10 min bei RT auf dem Schüttler wurde der Überstand dekantiert und der Niederschlag in 15 ml Röhrchen überführt. Das Säulenmaterial wurde 10 min bei RT und 10.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Elution wurden 5 ml Carbonatpuffer/Röhrchen (pH 10,3) mit dem Säulenmaterial gemischt und erneut für 10 min bei RT und 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und die Prozedur mit 5 ml Carbonatpuffer/Röhrchen wiederholt. Erster und zweiter Überstand wurden 1 x über Nacht und 2 x für je 3 h gegen PBS dialysiert und im Dialyseschlauch mittels Polyethylenglycol-Flocken (MG 20.000, Roth) eingeeengt. Die aus diesem Verfahren resultierende Antikörperlösung beinhaltete ausschließlich Anti-ApoE-Antikörper und wurde mittels BCA-Test (siehe 3.4.5.2) auf ihren Proteingehalt untersucht. Der ganze Prozess wurde mehrfach durchgeführt, wobei die einzelnen Isolationsschritte im ELISA kontrolliert wurden.

Das verwendete Verfahren zur Biotinylierung von DNA und RNA stammt von Leary et al. (1983) und wurde von Goers (1993) zur Biotinylierung von Proteinen angepasst [66]. Hierfür wurde die

bei der Isolierung durch Elution mittels Carbonatpuffer erhaltene Antikörperlösung nicht gegen PBS sondern gegen 150 mM NaCl dialysiert und dann pro ml Antikörperlösung (0,1 – 10 mg/ml) 100 µl 1 M Carbonatpuffer (pH 8,9) zugefügt. Pro mg Antikörper wurden 60 µl Biotin-Stammlösung (3,3 mg/ml) zugegeben, 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert und 1 x über Nacht sowie 2 x für 3 h gegen PBS bei 4°C dialysiert. Die Antikörper-Lösung wurde in den Dialyseschläuchen über Polyethylenglycol-Flocken eingeeengt. Die resultierende Lösung wurde mittels Gelfiltration über einer Sephadex G-50-Säule gereinigt.

3.4.5.2 *Quantitative Proteinbestimmung mittels BCA Protein Assay Kit*

Zur quantitativen Proteinbestimmung von Zelllysaten wurde der BCA-Test von Pierce nach den Angaben des Herstellers verwendet. Als Mengenreferenz wurde eine Standardreihe aus BSA eingesetzt (125 bis 2000 µg/ml gelöst in Lysatpuffer). Wenn im Einzelnen nicht anders beschrieben wurden sowohl Standard als auch Proben in Dreifachmessung analysiert.

3.4.5.3 *Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) für ApoE*

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Apolipoprotein E in konditionierten Zellüberständen wurde ein indirekter Sandwich-ELISA entwickelt. Die Methode beruht auf der unspezifischen Bindung von Proteinen an die Oberfläche einer Polyvinyl-Platte mit 96 Vertiefungen (Flexible Microtiter Plate, Falcon) mittels hydrophober Wechselwirkungen. Bis auf die Blockierung mit 150 µl und das Waschen mit 200 µl wurden pro Vertiefung jeweils 100 µl eingesetzt. Die Vertiefungen wurden über Nacht bei RT mit 23 nM Anti-ApoE-Antikörpern beschichtet (3,4 µg/ml in Beschichtungspuffer, eigene Herstellung). Es folgte eine einstündige Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der Polyvinyl-Oberfläche mit Blockierungspuffer. Nach 3 x Waschen mit Waschpuffer wurde die Platte gut ausgeklopft und 2 h mit den jeweiligen Proben, den Standards und dem Blindwert inkubiert. Als Standard diente rekombinantes Apolipoprotein E3 (rApoE3) in Kulturmedium in einer Konzentrationsreihe von 0,25 nM, 0,5 nM, 0,75 nM, 1,75 nM, 2,5 nM und 5 nM ApoE3. Der Blindwert bestand aus frischem Kulturmedium ohne rApoE3.

Nach 4 x Waschen mit PBS erfolgte eine zweistündige Inkubation mit 100 nM biotinyliertem Anti-ApoE-Antikörper in 10 % (v/v) FCS in PBS und wieder 4 x Waschen mit PBS. Darauf folgte eine einstündige Inkubation mit *Horseradish Peroxidase* (= HRP, Meerrettich Peroxidase)-markierten Anti-Biotin-Antikörpern (1:1.500 in 10 % (v/v) FCS in PBS) und 4 x Waschen mit PBS. Die Entwicklung der Farbreaktion erfolgte mittels 1 mg/ml ABTS und 0,03 % (v/v) H₂O₂ in Entwicklungspuffer. Die Farbentwicklung wurde nach 5 min mit 0,01 % (w/v) Natriumazid in PBS gestoppt und die ELISA-Platte unmittelbar darauf im ELISA-Lesegerät bei 405 nm und 630 nm gemessen. Die Messung bei 630 nm wurde durchgeführt um eventuell vorhandene Unterschiede der Polyvinyl-Platte abzugleichen. Des Weiteren wurde auf jeder Platte getestet, ob 1., 2. und 3. Antikörper sowie die Entwicklungsreaktion korrekt funktionierten. Hierfür wurden drei Vertiefungen der Platte mit 13 nM rApoE3 in Beschichtungspuffer beschichtet. Nach Blockierung und Waschen folgte in der 1. Vertiefung eine Inkubation mit Anti-ApoE-Antikörpern,

Waschen, eine Inkubation mit HRP-markierten Anti-Ziegen IgG-Antikörpern. Zur Kontrolle des 2. und 3. Antikörpers wurden die 2 restlichen Vertiefungen mit biotinyliertem Anti-ApoE-Antikörpern inkubiert, gewaschen und in einem Fall mit HRP-markiertem Anti-Ziegen IgG-Antikörpern, im anderen Fall mit HRP-markiertem Anti-Biotin-Antikörpern inkubiert. Blockierung sowie alle weiteren Schritte erfolgten bei RT auf dem Schüttler.

Um die Spezifität des ELISAs für ApoE zu bestimmen, wurden verschiedene Konzentrationen von Apolipoprotein A-I (ApoA-I), Apolipoprotein A-II (ApoA-II) und Apolipoprotein B-100 (ApoB-100) getestet. Da in jedem ApoE-ELISA das frische Kulturmedium als Blindwert diente, wurde gleichzeitig geprüft, ob das ApoE des verwendeten Serums im Kulturmedium das Messergebnis stören könnte. Da es sich in diesem Fall um Hitze-inaktiviertes, tiefgefrorenes und wieder aufgetautes Kälberserum handelte, waren offenbar durch die Vorbehandlung die Epitope des vorhandenen bovinen ApoE inaktiviert worden.

Die Analyse der ApoE-Extinktionswerte erfolgte mittels der auf jeder ELISA-Platte gemessenen Standardreihe. Alle Messwerte einer Experimentreihe wurden auf einem ELISA-Lesegerät gemessen. Um eine Abschätzung für die Genauigkeit der Messungen vornehmen zu können, wurde jeder Standardwert und jede Probe in drei Vertiefungen aufgetragen und zur weiteren Analyse deren Mittelwert verwendet. Die ApoE-Konzentration der Proben wurde anhand der Geradengleichung der Regressionsgeraden der Standardreihe ermittelt. Die Analyse der Differenzen der ApoE-Konzentrationen, bei Gabe der Substanzen und Kombinationen, in Bezug auf die ApoE-Konzentrationen der Kontroll-Inkubationen wurde mit Hilfe eines ungepaarten, zweiseitigen T-Tests (Student) errechnet. Zu diesem Zweck wurden die Messwerte als Prozente der jeweiligen Kontrolle ausgedrückt. Ein Wert von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet. Bei diesem Verfahren wurde von einer annäherungsweisen Normalverteilung der Abweichungen ausgegangen.

3.4.5.4 Western Blots

Durch eine Proteinbestimmung mittels BCA-Kit wurde die Gesamtproteinmenge der Proben ermittelt (siehe 3.4.5.2). In der Regel wurden die Proben unter reduzierenden Bedingungen in 5 x konzentriertem SDS-Probenpuffer aufgenommen (Endkonzentration: 1 x konzentrierter Probenpuffer), im Heizblock für 5 min auf 95°C erhitzt und bei -20°C gelagert. Bei Gebrauch wurden die Proben für 5 min auf 95°C erhitzt und zentrifugiert. Je Tasche des Polyacrylamid-Gels wurden 10 µg Gesamtprotein eingesetzt.

Für die Auftrennung der Proteinproben wurden vertikale, kontinuierliche 12,5 %ige Polyacrylamidgele mit einer Dicke von 1 mm gegossen. Hierzu wurden die Gelgießgestelle der Mini-Protean-II-Zelle (BioRad, München) benutzt. Der verwendete Kamm führte zu 10 Taschen mit je 35 µl Fassungsvermögen. Die Proteinauftrennung erfolgte mit Hilfe einer vertikalen Mini-Protean-II-Gelkammer (BioRad, München) bei RT. Die angelegte Spannung wurde zunächst für 30 min auf 30 V limitiert, sobald die Probe vollständig in das Sammelgel eingewandert war, wurde die Elektrophorese für 3,5 h bei konstanten 110 V fortgesetzt.

Um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können, wurde pro Gel eine Tasche mit farbmarkierten Molekulargewichts-Standardproteinen (Rainbow™ coloured protein molecular weight markers, BioRad, München) nach den Angaben des Herstellers gefüllt. Als Positiv-Kontrolle wurde eine Tasche pro Gel mit 10 ng rApoE3 in Probenpuffer versehen. Um die Spezifität des Western Blots zu testen wurden zu Beginn der Experimentreihen verschiedene Apolipoproteine (ApoA, ApoB) getestet.

Für den Proteintransfer vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidene fluoride, Immobilon-P transfer membrane, Kat.Nr. IPVH00010, Millipore) wurde eine Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, München)-Einheit und ein einfaches Puffersystem verwendet. Die PVDF-Membranen wurden vor Gebrauch mit Methanol aktiviert, kurz in H₂O gespült und für mindestens 5 min in Transferpuffer inkubiert. Auf die Anode wurde eine Schicht mit Transferpuffer getränktes Filterpapier sowie die PVDF-Membran gelegt. Auf diese wurde das Trenngel geschichtet und mit einem weiteren in Transferpuffer getränktem Filterpapier überdeckt. Der Transfer wurde 90 min bei 100 mA und 15 V (bei 2 Blots; 9 V bei 1 Blot) durchgeführt. Um die Lage der Probenbahnen und -Banden erkennen zu können und um zu kontrollieren, ob der Elektrotransfer erfolgreich war, wurden die Blots mit Ponceau S gefärbt. Dazu wurde der Blot nach dem Transfer in H₂O und dann in frischer Ponceau S-Lösung geschwenkt. Nach 2-5 min wurde der überfärbte Blot mit H₂O, dann mit TBST differenziert bis nur die Protein-Banden rot gefärbt waren. Für die Immunfärbung wurde mit der Blockierung fortgefahren.

Nach dem Transfer wurden die PVDF-Membranen kurz in H₂O gespült und die unspezifischen Bindungsstellen der PVDF-Membran mit 1,5 % (w/v) BSA in TBST (BSA/TBST) für 1 h blockiert. Hierauf schloss sich eine einstündige Inkubation mit Anti-ApoE-Antikörpern, verdünnt 1:5.500 in BSA/TBST, und 4 x Waschen für je 5 min in TBST an. Nach 1 h Inkubation mit Anti-Ziegen IgG-Antikörpern, verdünnt 1:10.000 in BSA/TBST, und 4 x Waschen für je 5 min in TBST, wurde die Entwicklung mittels des Renaissance-Kits von NEN (Luminol) nach Herstellerangaben in der Dunkelkammer durchgeführt. Blockierung, Inkubationen mit Antikörpern und Waschschrte erfolgten bei RT auf dem Schüttler.

3.4.5.5 Messung des NGF-Gehalts der Lysat- und Medien-Fractionen

Die NGF-Messungen wurden freundlicherweise von PD Dr. Rainer Hellweg (Psychiatrische Klinik der Freien Universität Berlin, Eschenallee 3, 14050 Berlin) durchgeführt. Der dabei eingesetzte 2-Seiten-ELISA wurde bereits detailliert beschrieben [67, 68]. Die mittlere Wiederfindungsrate des zum Medium hinzugefügten Mäuse-NGFs (125 pg/ml) variierte von 60 bis 90 %. Die NGF-Messungen jeder Fraktion und jedes Zellkulturüberstandes wurden in Vierfach-Bestimmung durchgeführt. Der NGF-Gehalt wurde in Äquivalenten von Maus 2,5 S NGF ausgedrückt. Die Detektionsgrenze dieses Messaufbaus liegt bei 0,25 pg/ml NGF. Für die Analyse der Daten wurden NGF-Mengen von behandelten Zellen jeweils als % der bei jedem Experiment mitgetesteten Kontrolle dargestellt.

3.4.5.6 Messung der intrazellulären Calcium-Konzentrationen in Astrozyten nach Inkubation mit β /A4-Fragmenten

Die Messung der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration in mit Amyloid-Fragment behandelten Astrozyten (siehe 3.4.6.3.3) wurde in enger Zusammenarbeit mit meinem Kollegen Dr. Volker Meske durchgeführt und die Ergebnisse wurden von uns beiden 1998 veröffentlicht [69]. Die Inkubationen der Zellen mit Amyloiden wurden von der Autorin durchgeführt, die Fura-Fluoreszenz-Messungen und -Auswertungen von Dr. Meske. Der hierfür verwendete ungeladene Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-acetoxymethyl-ester (Fura-2-AM), dringt in die Zelle ein. Unspezifische Esterasen hydrolysieren alle 4 Acetomethylester an den Aminodiacetat-Gruppen. Das jetzt geladene Molekül kann nicht mehr durch die Zellmembran nach außen diffundieren und bildet mit dem Ca^{2+} -Ion ein Chelat. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Fura-Indikators von 363 nm des Ca^{2+} -freien Chelators zu 335 nm des Ca^{2+} -gebundenen. Das Emissionsspektrum ist dabei relativ unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration.

Die Zellen wurden nach Inkubation 2 x mit PBS gewaschen und mit 3 μM Fura-2-AM in normalem Kulturmedium für 40 min im Brutschrank inkubiert. Die Farbstoff-Lösung wurde durch Medienwechsel entfernt und die Zellen weitere 30 min in Kulturmedium im Brutschrank inkubiert. Unmittelbar vor Messung wurden die Deckgläser mit den Zellen in eine Durchfluss-Kammer (gefüllt mit 2 ml HBSS/10 mM HEPES) transferiert und kontinuierlich mit demselben Puffer bei einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min überspült. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit Hilfe eines IX 70 Mikroskops von Olympus in Verbindung mit einem Ratiometrie-Imaging-System (T.I.L.L Photonics, Planegg) gemacht. Zur Messung wurden 20 x und 40 x Objektive (UApo 340) verwendet. Dabei wurde sichergestellt, dass alle Messungen im linearen Bereich der CCD-Kamera durchgeführt wurden und anscheinende Veränderungen des Calcium-Spiegels nicht durch Licht-Sättigungs-Effekte hervorgerufen wurden.

Die hier verwendete Messtechnik für Veränderungen des intrazellulären Calcium-Spiegels wurde ursprünglich für Veränderungen des Calcium-Spiegels im Sekundenbereich konzipiert. Da der Fura-Farbstoff auf längere Sicht als Puffer für Calcium-Ionen wirkt, kann diese Eigenschaft erheblich zu einer Verschiebung der gemessenen Calcium-Konzentration in den Zellen führen. Um trotzdem eine Aussage zu erhalten, wurden besonders viele Zellen in mehreren unabhängigen Experimenten analysiert (n = 5 für die Fragmente β /A4(1-40), (1-43), (10-20), (12-28) und (25-35), für jedes Fragment wurden 2000 Zellen analysiert. n = 6 für die Fragmente β /A4(1-11), (1-16), (1-28), (1-38), (22-35) und (40-1), für jedes Fragment wurden 2400 Zellen analysiert. n = 12 für β /A4(1-42), es wurden 4800 Zellen analysiert. n = 15 für die PBS-Kontrolle, es wurden 6800 Zellen analysiert).

3.4.5.7 ApoE-mRNA Isolierung von Astrozyten

Nach der Inkubation von Astrozyten mit Rezeptor-spezifischen Agonisten, Analoga und

Neurotransmittern schloss sich eine Isolierung der Total-mRNA an. Hierzu wurde der Perfect RNA Eukaryotic Kit (Eppendorf, Hamburg) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Alle darauf folgenden Schritte wurden von Dr. Carsten Jacobi durchgeführt. Alle Standardmethoden, wie gelelektrophoretische Trennung und SDS-PAGE, wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Für den DNA-Verdau wurde das resultierende Pellet in 42 µL Diethylpyrocarbonate-Wasser (DPC-Wasser) gelöst. Die Endkonzentrationen der Reaktionskomponenten für den Verdau waren: 3 mM MgCl₂, 50 mM TRIS-HCl (pH 9,0), 75 mM KCl, 10 Einheiten DNase I (Boehringer Mannheim, Mannheim), die Inkubation erfolgte für 15 min bei 37°C. Eine Ethanol-Präzipitation schloss sich über Nacht bei -80°C an [70]. Die mRNA-Konzentrationen der Proben wurden photometrisch ermittelt.

Für die reverse Transkription wurde 1,5 µg Total-mRNA der Astrozytenkulturen eingesetzt. Die Endkonzentrationen der Reaktionskomponenten waren: 3 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl (pH 9,0), 75 mM KCl, 1 mM jeder dNTP, eine Einheit RNasin® Ribonuclease-Inhibitor (Boehringer Mannheim), 200 Einheiten M-MLV Reverse Transcriptase RNase H minus (Promega, Mannheim), 10 pM Random Hexamer Primer. Die reverse Transkription wurde bei 45°C für 60 min durchgeführt. Zur Herstellung der Nucleotid-Proben wurde der Polymerase Chain Reaction Digoxigenin (DIG) Probensynthese Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Als Primer wurden verwendet: Oligonucleotide für Aktin Sense-Nucleotide 261-280 und Aktin Antisense-Nucleotide 2508-2528 (NCBI GenBank accession number V01217.1; T_m=59°C) sowie Oligonucleotide für die Amplifikation von ApoE Sense-Nucleotide 91-110 und ApoE Antisense-Nucleotide 687-706 (NCBI GenBank accession number S76779; T_m=62°C). 10 µl der PCR-Reaktion wurden auf einem 1,2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt und die PCR-Produkte unter UV-Licht sichtbar gemacht [70]. Die Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem DNA-Purification Kit der Firma Biozym (Hessisch Oldendorf) nach den Angaben des Herstellers eluiert.

Die Dot-Blots wurden wie bei [71] beschrieben ausgeführt. 6 µg Total-RNA (der Astrozytenkulturen) wurden auf eine Nucleinsäuren-absorbierende Membran (Amersham, Ismaning) aufgetragen. Die RNA wurde anschließend mit UV-Licht vernetzt (cross link) und in Hybridisierungs-Puffer für 3 h bei 56°C prähybridisiert. Die DIG-gekoppelten DNA-Proben wurden bei 95°C für 5 min denaturiert. Der Dot-Blot wurde über Nacht bei 56°C mit 50 ng/ml denaturierter DIG-Probe in Hybridisierungs-Puffer hybridisiert.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran wie folgt gewaschen: 2 x für 15 min in 2 x SSC; 2 x für 15 min in 1 x SSC; 2 x für 15 min in 0,25 x SSC sowie für 15 min in TBS. An die Blockierung (1 h bei RT in 10 % Magermilch in TBST) schloss sich eine Inkubation der Membran für 2 h bei RT mit Fab-Fragment (Boehringer Mannheim, Mannheim, 1:1000 verdünnt in 3 % Magermilch in TBST) an. Der Dot-Blot wurde anschließend 3 x 10 min mit TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem Enhanced Chemiluminescence-Kit auf Hyperfilm ECL (beides Amersham, Ismaning) nach Herstellerangaben. Die Quantifizierung erfolgte

densitometrisch.

3.4.6 Inkubation von Astrozyten Primärkulturen aus Ratten-Hippocampi

3.4.6.1 ApoE im konditionierten Medium unbehandelter Astrozytenkulturen

Um die reguläre Entwicklung von ApoE in den Astrozytenkulturen abschätzen zu können wurde das Medium 10-Tage-alter Astrozytenkulturen untersucht. Zu Versuchsbeginn wurden die Kulturen mit frischem Astrozytenmedium überschichtet. Zu den Zeitpunkten 0; 0,5; 1; 2; 4; 12; 24; 48; 72; 96 und 120 h nach Mediumzugabe wurden je 400 µl Medienproben gezogen, bei 4°C, 10.000 x g für 15 min zentrifugiert, der Überstand in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Alle Proben wurden mittels ELISA auf ihre ApoE-Konzentration untersucht.

3.4.6.2 Inkubation mit rezeptorspezifischen Agonisten

Astrozytenkulturen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der rezeptorspezifischen Agonisten inkubiert (Tabelle 3). Alle Inkubationen wurden mit 3 Vertiefungen einer 6-Vertiefungen-Schale je Ansatz (Einzelsubstanz oder Kombination) und Konzentration durchgeführt und erfolgten über 48 h bei 37°C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchte im Brutschrank. Zu den Zeitpunkten 5 h, 24 h und 48 h wurden je 400 µl der Medienproben gezogen, bei 10.000 x g und 4°C 10 min zentrifugiert, die Überstände aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Die Medienproben wurden im ELISA auf ihren ApoE-Gehalt hin untersucht (siehe 3.3.4). Ein Teil der Zellüberstände wurde zusätzlich auf den NGF-Gehalt hin untersucht (siehe 3.4.5.5). Mit den Zellen wurden Lebend-tot-Versuche (siehe 3.4.4) durchgeführt.

| Substanz/ Kombination | Konzentration | Stammlösung gelöst in | Kontrolle |
|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|---|
| dBcAMP | 100, 500 μ M 1 mM | Ethanol | Kulturmedium |
| RA | 100 nM, 500 nM 1 μ M | Ethanol | $4,8 \times 10^{-6}$ % Ethanol in Kulturmedium |
| PMA | 16, 160, 480 nM | Ethanol | $4,8 \times 10^{-6}$ % Ethanol in Kulturmedium |
| dBcAMP/ RA | 1 mM/ 1 μ M | Ethanol | $4,8 \times 10^{-6}$ % Ethanol in Kulturmedium |
| dBcAMP/ PMA | 1 mM/ 160 nM | Ethanol | $4,8 \times 10^{-6}$ % Ethanol in Kulturmedium |
| dBcAMP/ PMA | 1 mM/ 480 nM | Ethanol | $4,8 \times 10^{-6}$ % Ethanol in Kulturmedium |
| Isoproterenol | 50, 500 nM 5 μ M | DMSO | $1,5 \times 10^{-7}$ % DMSO in Kulturmedium |
| Arterenol | 1, 10, 100 μ M | Kulturmedium | Kulturmedium |
| Serotonin | 2,5, 25, 250 μ M | Kulturmedium | Kulturmedium |
| Clonidine | 25, 250 nM 2,5 μ M | Kulturmedium | Kulturmedium |
| Carbachol | 10, 100 μ M 1 mM | Kulturmedium | Kulturmedium |
| Isoproterenol/ Arterenol | 50 nM/ 10 μ M | DMSO/ Kulturmedium | $1,5 \times 10^{-7}$ % DMSO in Kulturmedium |
| Isoproterenol/ Serotonin | 50 nM/ 2,5 μ M | DMSO/ Kulturmedium | $1,5 \times 10^{-7}$ % DMSO in Kulturmedium |

Tabelle 3: Liste der getesteten Substanzen.

3.4.6.3 Inkubation mit β -Amyloid-Fragmenten

3.4.6.3.1 Alterung der Amyloide

In senilen Plaques liegen Amyloide in β -Faltblatt-Konformation vor und bilden Aggregate. Synthetische Amyloide liegen in wässriger Lösung zunächst in gelöster Form vor. Gibt man zu der wässrigen Lösung PBS und inkubiert sie für einige Tage bei 37°C so bilden sich Aggregate. Diese Fibrillen zeigen β -Faltblatt-Konformation, schlechte Löslichkeit und positive Kongorot-Färbung und besitzen damit die gleichen Eigenschaften wie die aus senilen Plaques isolierten Amyloide [72]. Deshalb wurden für die Inkubation mit verschiedenen β /A4-Fragmenten diese zunächst wie folgt gealtert. Synthetische β /A4-Fragmente mit den Aminosäuren 1-11, 1-16,

1-28, 1-38, 1-40, 1-42, 1-43, 10-20, 12-28, 22-35, 25-35 und der reversen Sequenz 40-1 als Kontrolle (Bachem, Heidelberg) wurden für eine Stammlösung von 6 mg/ml in H₂O gelöst (siehe Tabelle 4). Das Peptid β /A4(1-43) mit dem höchsten Anteil an hydrophoben Aminosäuren musste zunächst im alkalischen Bereich in Lösung gebracht werden. Dazu wurden wenige μ l 1 N NaOH zugegeben und nach Lösung des Amyloids mit wenigen μ l 1 M HCl wieder in den neutralen pH-Bereich titriert. Die Stammlösungen wurden in Aliquots bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurden die Fragmente mit PBS auf 1 mg/ml verdünnt und 7 Tage bei 37°C gelagert.

| Amyloide | Kat.Nr. | Chargen Nr. | MG [g/Mol] | Reinheit [%] | Gehalt [%] |
|----------|---------|----------------|------------|--------------|------------|
| 1-11 | H-2956 | 514511 | 1325,3 | >98 | 75,4 |
| 1-16 | H-2958 | 512699 | 1955 | >98 | 76,1 |
| 1-28 | H-7865 | 507662 | 3262 | >94 | 77 |
| 1-38 | H-2966 | 513204, 515109 | 4131 | >97 | 79,1 |
| 1-40 | H-1194 | 510313, 518765 | 4325 | n.g. | n.g. |
| 1-42 | H-1368 | 511907 | 4509 | n.g. | n.g. |
| 1-43 | H-1586 | 507406 | 4610 | n.g. | n.g. |
| 10-20 | H-1388 | 507302 | 1447 | >97 | n.g. |
| 12-28 | H-7910 | 123030 | 1955 | >99 | 73 |
| 22-35 | H-1976 | 507197 | 1402 | >95 | 81 |
| 25-35 | H-1192 | 514718, 516877 | 1060 | >97 | 89 |
| 40-1 | H-2972 | 512833 | 4325 | n.g. | n.g. |

Tabelle 4: Liste der eingesetzten Amyloid-Fragmente. n.g: vom Lieferanten nicht genannt.

3.4.6.3.2 Kongorot-Färbung der Amyloide zum Nachweis ihrer Fibrillogenität

Die Aggregation der gealterten Amyloide wurde mittels Kongorot-Färbung nachgewiesen. Dafür wurden je 150 μ l der in PBS gealterten 1 mg/ml-Stammlösungen der verschiedenen Amyloid-Fragmente 2 μ l Kongorot (1,7 mg/ml) zugegeben und bei RT 1 h inkubiert. Nach Zentrifugation der Proben mit 10.000 x g bei RT für 5 min wurden 100 μ l des Überstandes mit 200 μ l H₂O gemischt und die Absorption bei 490 nm gemessen [73]. Zur Kontrolle wurde PBS verwendet, welches einen Maximalwert für die Absorption lieferte und als 100 % Absorption definiert wurde. Je mehr Kongorot an das aggregierte Amyloid gebunden hatte, desto weniger Kongorot wurde im Verhältnis zur Kontrolle gemessen.

3.4.6.3.3 Inkubation von Astrozyten mit Amyloid-Fragmenten

Je drei Vertiefungen einer 24-Vertiefungen-Platte mit 10-Tage-alten Astrozyten-Primärkulturen wurden mit je 10 μ M eines der in 3.4.6.3.1 beschriebenen gealterten Amyloid-Fragmente über

einen Zeitraum von 72 h inkubiert. Als Kontrollen dienten 10 μ M der reversen Amyloid-Sequenz β /A4(40-1) und PBS alleine sowie 1 mM dBcAMP, frisch in Kulturmedium angesetzt. dBcAMP diente hierbei als Kontrolle für die Aktivierung der Astrozyten. Zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h wurden je 400 μ l der einzelnen Medienproben gezogen, bei 10.000 x g und 4°C 10 min zentrifugiert, die Überstände aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei –80°C gelagert. Mit den Zellen wurden Lebend-tot-Versuche (siehe 3.4.4) durchgeführt. Die Medienproben wurden im ELISA auf ihren ApoE-Gehalt hin untersucht (siehe 3.3.4). Insgesamt wurden alle genannten Fragmente in 4-7 verschiedenen Experimenten à drei Ansätzen getestet. Nachdem nach 72 h das restliche Medium abgezogen wurde, wurden die Zellen 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Mit den Zellen wurde entweder eine Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration (siehe 3.4.5.6), eine ApoE- und β /A4-Doppel-Immunfärbung durchgeführt (siehe 3.4.3.2), eine immunchemische Charakterisierung vorgenommen (siehe 3.4.3.1), ein Lebend-tot-Nachweis erbracht (siehe 3.4.4) oder es wurden Protein-Lysate hergestellt. Für Letzteres wurden die Zellen mit Lysatpuffer (siehe 3.3.1) und einem Zellschaber geerntet. Die Proben wurden mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei –80°C gelagert. Für die ApoE- und β /A4-Doppel-Immunfärbung und die immunchemische Charakterisierung wurden die Zellen fixiert. Die je drei Vertiefungen pro Ansatz wurden verwendet, um eine interne Kontrolle über die Versuchsparameter zu erhalten.

3.4.6.3.4 Inkubation von konditioniertem Kulturmedium mit Amyloid-Fragmenten

Hierfür wurde Medium verwendet, welches 4 Tage von 10-Tage-alten Astrozyten Primärkulturen konditioniert worden war. Dieses Medium wurde in 1,5 ml Portionen aliquotiert und für 72 h im Brutschrank mit 10 μ M gealtertem β /A4 inkubiert. Es wurden alle Amyloid-Fragmente untersucht. Nach 72 h wurden die Medien bei 4°C und 10.000 x g für 15 min zentrifugiert. Die Überstände wurden mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei –80°C gelagert. Alle Proben wurden auf ihren ApoE-Gehalt im ELISA gemessen.

3.4.6.3.5 Inkubation von Astrozytenkulturen mit β /A4(1-40) für NGF-Messungen

Die NGF-Messungen wurden freundlicherweise von PD Dr. Rainer Hellweg (Psychiatrische Klinik der Freien Universität Berlin, Eschenallee 3, 14050 Berlin, durchgeführt). Je Versuch wurden zwei Kulturflaschen (Fläche: 23 cm²) von 10-Tage-alten, konfluenten, hippocampalen Astrozyten-Primärkulturen verwendet. Eine Flasche wurde mit 10 μ M gealtertem β /A4 (1-40) in 10 ml frisch angesetztem Kulturmedium versetzt, die Kontroll-Kulturen mit dem gleichen Volumen PBS im Kulturmedium. Die Inkubation der Kulturen erfolgte über 72 h bei 37°C und 5 % (v/v) CO₂. Nach 72 h wurden die Medien abgenommen, bei 4°C, 10.000 x g für 15 min zentrifugiert, Pellet und Überstand separat mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Kulturen wurden auf Eis mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 300 μ l Homogenisierungspuffer überschichtet. Mit einem Zellschaber (Nunc) wurden die Zellen möglichst vollständig vom Boden der Flasche abgekratzt und in einen Glashomogenisator

(Dounce) gebracht. Auf Eis wurde das Gewebe mit 15 Auf- und Abbewegungen des Glasstößels zerkleinert und anschließend 15 min bei 4°C und 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen (Beckman Coulter, Krefeld) übertragen und bei 4°C und 350.000 x g für 40 min in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand der Ultrazentrifugation wurde als Zytosol-Fraktion bezeichnet. Das Pellet der Ultrazentrifugation wurde in 50 µl Homogenisierungspuffer resuspendiert und als Vesikel-Fraktion bezeichnet. Das aus der ersten Zentrifugation resultierende Pellet wurde auf Eis in weiteren 300 µl Homogenisierungspuffer resuspendiert und ein weiteres Mal in Glashomogenisator zerkleinert. Nach einer weiteren Zentrifugation (4°C, 15 min, 10.000 x g) wurde der Überstand als Debris-Fraktion bezeichnet und beinhaltete Zellmembranen und im Falle der β /A4-Amyloid-Inkubationen auch die membrangebundenen Amyloidkomplexe. Das entsprechende Pellet wurde verworfen. Alle Fraktionen wurden mittels BCA-Test (siehe 3.4.5.2) in dreifacher Bestimmung (Vesikel-Fraktion mangels Masse nur in Einfachbestimmung) bezüglich ihrer Proteinkonzentration getestet, mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

4 Ergebnisse

4.1 Verifizierung der Versuchsbedingungen

4.1.1 Charakterisierung der Rattenhippocampus-Primärkulturen als Astrozyten

Primäre Zellkulturen aus dem Hippocampus der Ratte enthalten je nach Wahl der Versuchsbedingungen mehr Neurone oder Gliazellen. Über immunzytochemische Charakterisierung mittels spezifischer Antikörper gegen Marker-Proteine kann kontrolliert werden, zu welchem Anteil Astrozyten und Neurone in der Kultur vorhanden sind. Unter den beschriebenen Kulturbedingungen dominierten Astrozyten, die eine konfluente Lage von Zellen auf der Oberfläche des Deckglases bildeten. Wie mittels immunzytochemischer Charakterisierung über spezifische Marker, wie anti-GFAP, anti-S100 β und anti-MAP2 nachgewiesen wurde (siehe 3.4.3.1), waren lediglich einige wenige Neurone und Mikrogliazellen anwesend. Dieses Ergebnis steht in strikter Übereinstimmung mit dem Bild, das sich im Verlaufe der nativen Fura-Fluoreszenz-Darstellung ergab [69]. Hierbei können Astrozyten durch ihre schwache Fluoreszenz, Neurone hingegen durch ihre intensive und helle Fluoreszenz identifiziert werden. Die durchschnittliche Zelldichte lag zwischen 200-300 Zellen pro mm².

4.1.2 Lebensfähigkeit der Astrozyten

Um sicherzustellen, dass eine mögliche Verringerung der ApoE-Konzentration im Messansatz nicht durch einen im Vergleich zur PBS-Kontrolle übermäßigen Tod der Astrozyten bei Inkubation mit verschiedenen Substanzen zurückzuführen ist, wurde die Lebensfähigkeit der Astrozyten mehrfach überprüft.

Nach Inkubation der Zellen für 48 h mit dBcAMP, RA, PMA, Clonidine, Carbachol, Arterenol, Isoproterenol, Serotonin oder PBS (Kontrolle) waren 2 bis 3 % der Zellen tot. Hierbei gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zellen der PBS-Kontrolle und denen der getesteten Substanzen (siehe Abbildung 1).

Lebende Zellen dBcAMP, RA, PMA, Rezeptoragonisten

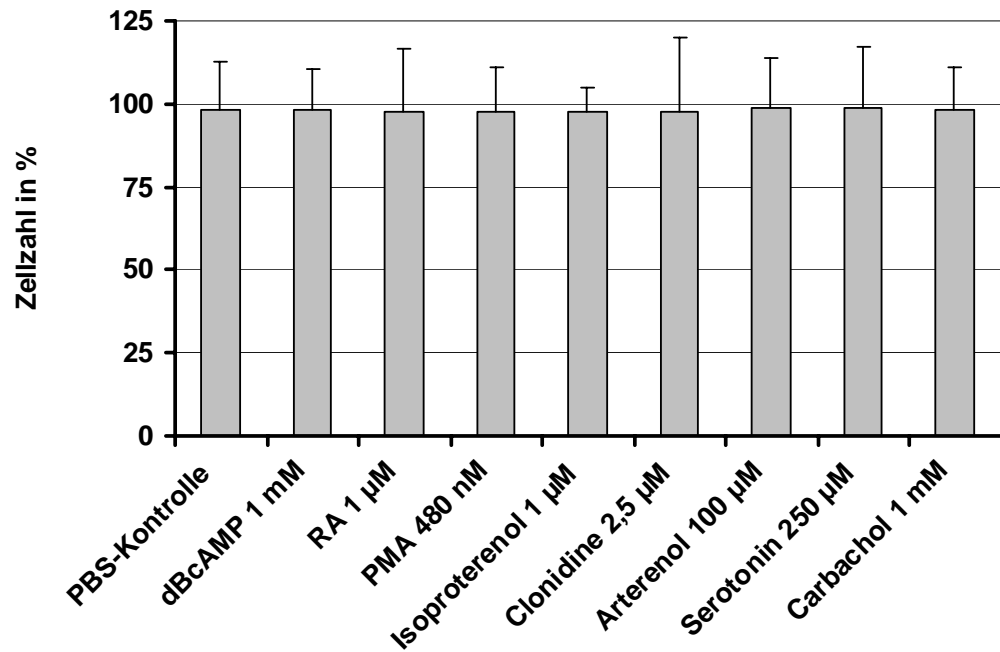


Abbildung 1: Die Säulen stellen den Anteil der lebenden Zellen dar, ausgedrückt in Prozent der Gesamtzahl der gezählten Zellen 48 h nach Inkubation mit dBcAMP (1 mM), RA (1 µM), PMA (480 nM), Isoproterenol (1 µM), Clonidine (2,5 µM), Arterenol (100 µM), Serotonin (250 µM), Carbachol (1 mM) oder PBS (Kontrolle). Verglichen mit der PBS-Kontrolle beeinflussten die getesteten Substanzen die Lebensfähigkeit nicht ($P > 0,05$). Die gemessenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Anzahl der Experimente war $n = 3$, es wurden ca. 1200 Zellen je Substanz analysiert. Auf Signifikanzen wurde mit einem zweiseitigen t-Test (Student) getestet.

Nach einer Kultivierung der Astrozyten mit 10 µM Amyloid über einen Zeitraum von 72 h waren 10-15 % der Zellen tot. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen PBS-Kontrolle, dBcAMP, der reversen $\beta/A4$ Sequenz (40-1) oder den anderen 11 getesteten $\beta/A4$ -Fragmenten (siehe Abbildung 2).

Lebende Zellen - Amyloid

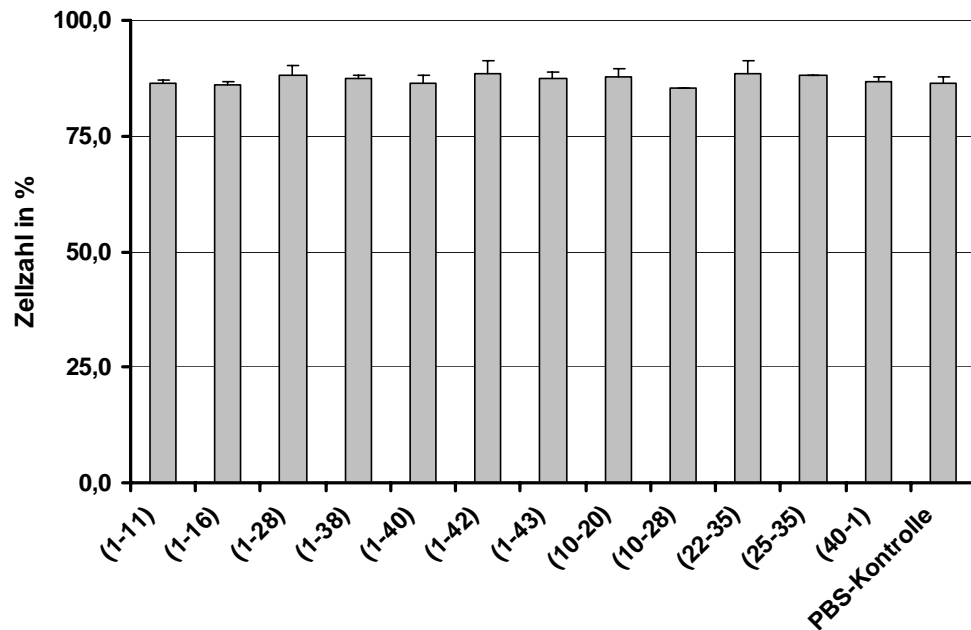


Abbildung 2: Die Säulen stellen den Anteil der lebenden Zellen dar, ausgedrückt in Prozent der Gesamtzahl der gezählten Zellen 72 h nach Inkubation mit 10 μ M der verschiedenen β /A4-Fragmente oder PBS (Kontrolle). Verglichen mit der PBS-Kontrolle beeinflussten die β /A4-Fragmente die Lebensfähigkeit nicht ($P > 0,05$). Die gemessenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Anzahl der Experimente war $n = 5$ für die Fragmente β /A4(1-40), (1-43), (10-20), (12-28) und (25-35), es wurden ca. 2000 Zellen je Fragment analysiert. $n = 6$ für die Fragmente β /A4(1-11), (1-16), (1-28), (1-38), (22-35) und (40-1), es wurden ca. 2400 Zellen je Fragment analysiert. $n = 12$ für Fragment β /A4(1-42), ca. 4800 Zellen wurden analysiert. $n = 15$ für PBS, ca. 6800 Zellen wurden analysiert. Auf Signifikanzen wurde mit einem zweiseitigen t-Test (Student) getestet.

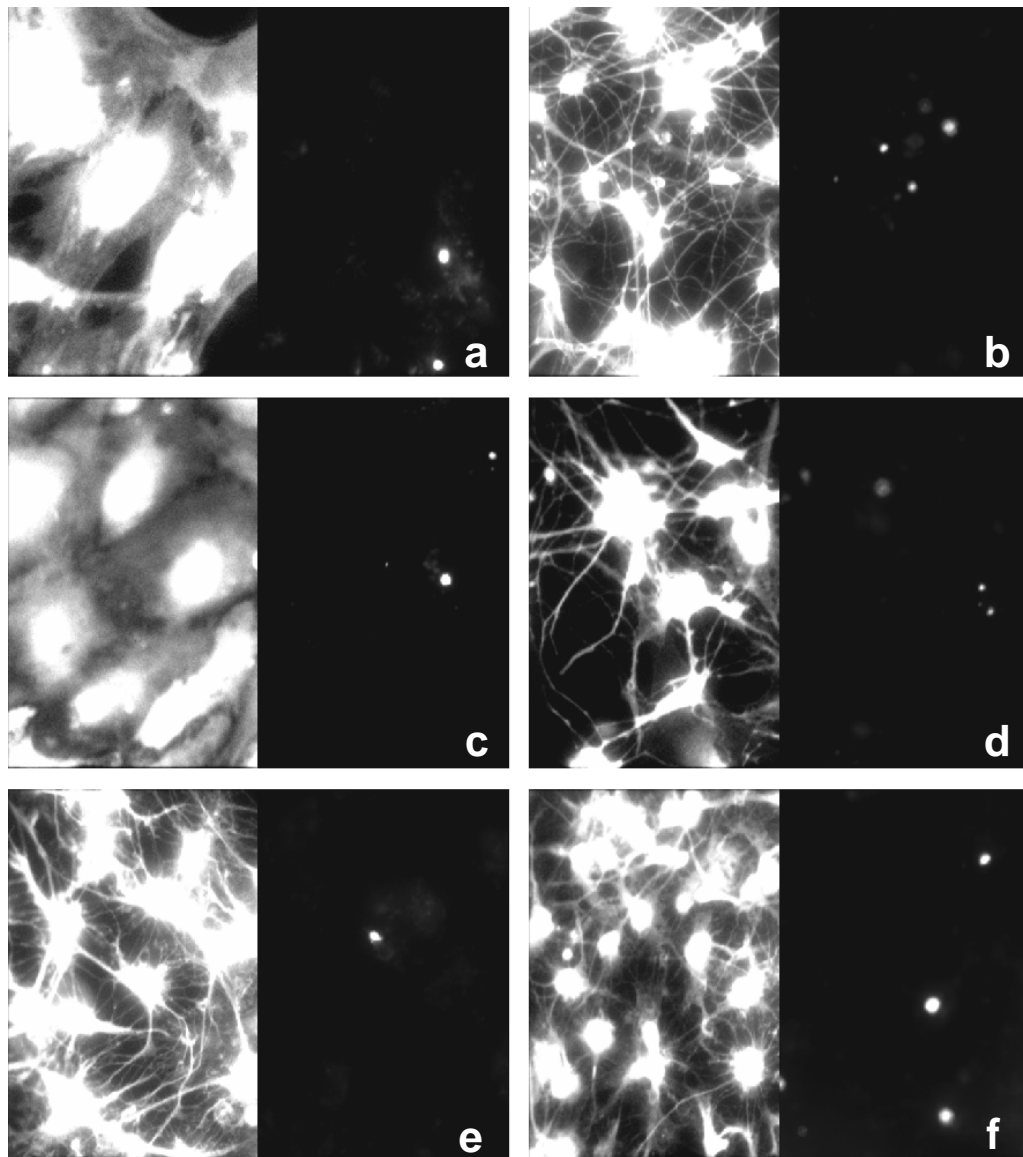


Abbildung 3: Astrozyten nach Färbung für den Lebend-Tot-Versuch. Die linke Seite der Abbildungen zeigt die lebenden Zellen, die rechte Seite zeigt die Kerne der toten Zellen des identischen Ausschnitts. Vergrößerung: x 150. Kontrollzellen nach 72 h Inkubation mit: a) PBS, b) dBcAMP und c) der reversen Amyloid-Sequenz $\beta/A4(40-1)$. Zellen nach Inkubation mit den Amyloid-Fragmenten d) $\beta/A4(1-40)$, als Beispiel für Inkubationen mit $10 \mu\text{M}$ $\beta/A4(1-40)$, (1-42) und (1-43), e) $\beta/A4(25-35)$ und f) $\beta/A4(10-20)$. Keine der Behandlungen erhöhte den Anteil der toten Zellen im Vergleich zur PBS-Kontrolle. Zu beachten ist die unterschiedliche Zellform. Die Inkubation mit den Amyloid-Fragmenten $\beta/A4(1-40)$, (1-42), (1-43), (25-35) und (10-20) änderte die Morphologie der Zellen von flach, Pfannenkuchen-ähnlich zu sternförmig, wie dies auch bei dBcAMP geschieht. Die anderen der getesteten Fragmente hatten keinen Einfluss auf die Morphologie der Zellen.

Der generelle Unterschied in den Prozentsätzen der toten Zellen zwischen den beiden Versuchsreihen ist möglicherweise auf unterschiedliche Außenfaktoren zurückzuführen. Die verschiedenen Versuchsreihen fanden zu verschiedenen Jahreszeiten statt, daraus ergeben sich Unterschiede in Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit bei der Präparation der Zellen. Da der Prozentsatz der toten Zellen innerhalb der Versuchsreihen zu dem jeweiligen Messzeitpunkt konstant war und sich nicht signifikant von der jeweiligen Kontrolle unterschied, wurde diesem

Unterschied keine Bedeutung beigemessen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die in der Folge geschilderten Veränderungen der ApoE-Konzentration in den Messansätzen nicht auf unterschiedliche Überlebensraten der Astrozyten in den verschiedenen Inkubationen zurückzuführen sind.

4.1.3 Spezifität und Qualität des ApoE-ELISAs

Um die Qualität des ApoE-ELISAs sicherzustellen, wurde er einer Überprüfung unterzogen. Die Variationskoeffizienten innerhalb eines ELISAs und bezüglich zweier verschiedener ELISAs lagen bei 4,5 % und 6 % respektive. Der Extinktionswert weder von ApoA-I, ApoA-II bzw. von ApoB-100 lag im ApoE-ELISA über dem des Blindwerts. Der verwendete ELISA ist also spezifisch für ApoE. Die Standardreihe wurde auf jeder ELISA-Platte mit gemessen und diente einer ständigen Qualitätskontrolle. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass gemessene Veränderungen der ApoE-Konzentrationen in den verschiedenen Messansätzen tatsächliche Veränderungen darstellen und nicht auf einer Ungenauigkeit des ELISAs beruhen.

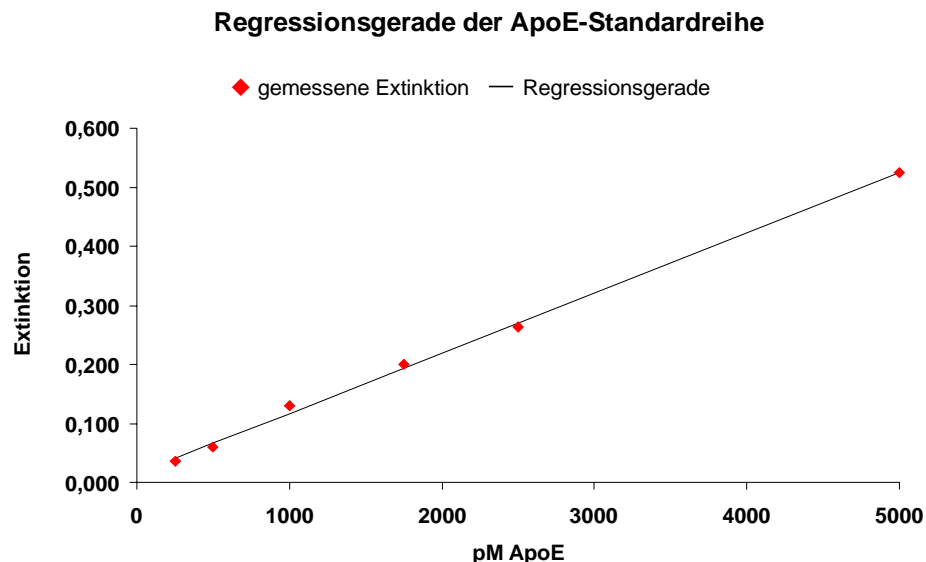


Abbildung 4: Exemplarische Darstellung einer, im Versuch gemessenen ApoE-Standardreihe. Alle ApoE-Konzentrationen wurden in Dreifachbestimmung gemessen.

4.1.4 Spezifität und Qualität des ApoE-Western Blot

Die Spezifität der Anti-ApoE-Antikörper wurde an Western Blots mit rekombinantem humanem ApoE sowie Apolipoproteinen des Kaninchens aus β VLDL überprüft. In den erstellten ApoE-Western Blots, liegt die ApoE-Bande für das Kaninchen-ApoE aus β VLDL (Abbildung 5, c.), wie aus der Literatur bekannt [12], etwas höher als das rekombinante humane ApoE3, welches als Positivkontrolle diente (Abbildung 5, a.). Die Höhe der Kaninchen-ApoE Hauptbande entspricht einem ungefähren Molekulargewicht von 36 kD, die des humanen rekombinanten ApoEs einem

Molekulargewicht von ca. 34 kD. Der nicht affinitätsgereinigte ApoE-Antikörper von Europa Bioproducts zeigt bei am Kaninchen- β VLDL mehrere Banden, die entsprechend ihres Molekulargewichts mit verschiedenen Apolipoproteinen übereinstimmen. Da für die Versuche nur die Darstellung des ApoEs interessant war, wurde in der Folge der affinitätsgereinigte Anti-ApoE-Antikörper verwendet. Es ist davon auszugehen, dass unter den gewählten Bedingungen der Western Blot für ApoE spezifisch und die Qualität des affinitätsgereinigten Anti-ApoE-Antikörpers gut ist.

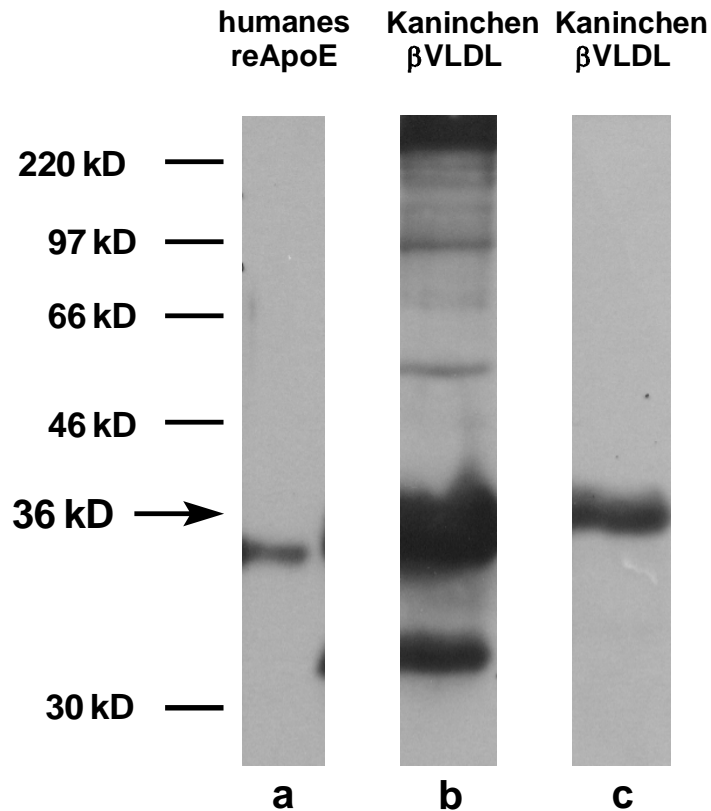


Abbildung 5: Western Blot zur Kontrolle der Spezifität des ApoE-Antikörpers. a: 0,5 ng rekombinantes humanes Apolipoprotein E. Die ApoE-Bande liegt erwartungsgemäß bei ca. 34 kD. b. und c. Apolipoproteine des β VLDL aus Kaninchenserum (isoliert von Arbeitsgruppe Winfried März, Freiburg). c: Die ApoE-Bande liegt erwartungsgemäß bei ca. 36 kD. Verwendet wurde für a. und c. der selbst affinitätsgereinigte ApoE-Antikörper, für b. der nicht affinitätsgereinigte ApoE-Antikörper von Europa Bioproducts CR9016.

4.1.5 Reguläre ApoE-Entwicklung der Astrozyten

Für die sinnvolle Planung von Inkubationsversuchen mit Astrozytenkulturen musste zunächst für die gewählten Kulturbedingungen die reguläre Entwicklung der ApoE-Konzentration in dem von den Astrozyten konditionierten Kulturmedium ermittelt werden. Abbildung 6 zeigt diese exemplarisch. Da zu Versuchsbeginn das konditionierte Medium abgezogen wurde und die Zellen neues Kulturmedium erhielten, war zum Zeitpunkt 0 h kein ApoE im Medium vorhanden. Zum Zeitpunkt 120 h waren in dem dargestellten Experiment ca. 12 nM ApoE nachzuweisen. In einer zweiten Versuchsreihe mit Zellen von einem anderen Tier war zum Zeitpunkt 120 h 4 nM

im Medium vorhanden. Der zeitliche Verlauf blieb allerdings vergleichbar. Um verschiedene Experimente miteinander vergleichen zu können, wurden im Folgenden die gemessenen ApoE-Konzentrationen als Prozente der Kontrollinkubation mit PBS angegeben. Diese wurde zu jedem der Messzeitpunkte (24, 48 und 72 h) als 100 % definiert. Es zeigte sich außerdem, dass jüngere Zellkulturen (7 Tage Zellkultur vor Versuchsbeginn) mehr ApoE sekretierte als alte (21 Tage Zellkultur vor Versuchsbeginn).

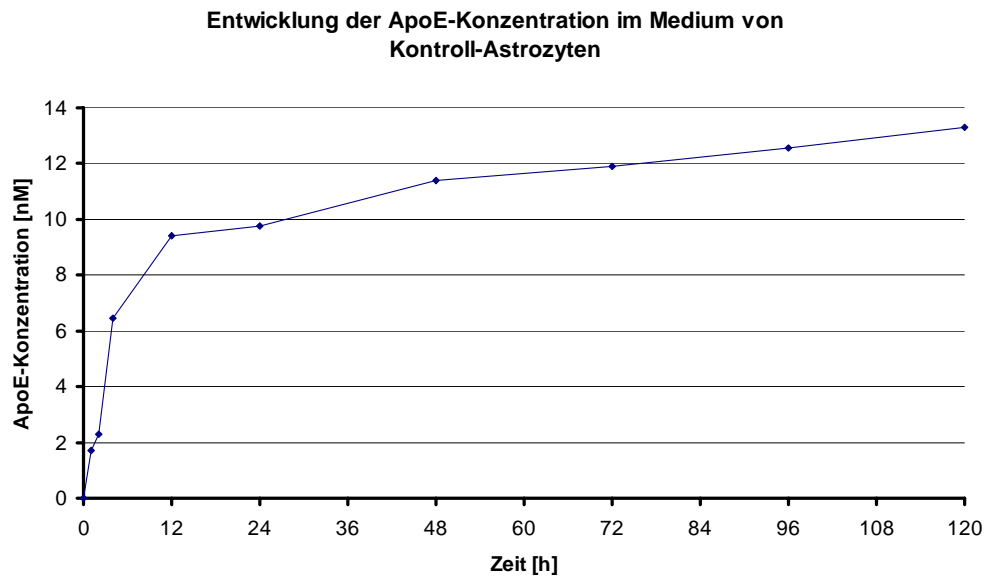


Abbildung 6: Mit ApoE-ELISA gemessene Entwicklung der ApoE-Konzentration im Medium von Astrozyten über 120 h. Bis ca. 12 h stieg die ApoE-Konzentration im Medium rasch, von dort bis zum Zeitpunkt 120 h nur noch langsam.

4.2 Regulation der ApoE-Sekretion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde an hippocampalen Astrozyten Primärzellkulturen aus der Ratte die Wirkung verschiedener Substanzen auf die Regulation und Verfügbarkeit von Apolipoprotein E im Gehirn untersucht. Besonderes Interesse galt Substanzen, die den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) aktivieren und somit die Phosphorylierung bestimmter Zielproteine beeinflussen können. Dies ist theoretisch durch mehrere Substanzen und Wirkungsweisen möglich. Das membrangängige dBcAMP aktiviert als cAMP-Analogon die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA). Desgleichen ruft Isoproterenol über β -Adrenorezeptor-Stimulation eine Aktivierung der Adenylatcyclase und damit eine Erhöhung des zytoplasmatischen cAMP-Spiegels hervor. Arterenol führt als α 1-Adrenorezeptor-Agonist zu einer Inhibierung der Adenylatcyclase. Da von Astrozyten bekannt ist, dass zwischen dem cAMP-System und der Phosphatidylinositol-Hydrolyse eine Kommunikation besteht, interessierten Substanzen, die letztere beeinflussen [63]. Die Phosphatidylinositol-Hydrolyse greift über eine Erhöhung des freien zytoplasmatischen Ca^{2+} in ein weiteres wichtiges Second

Messenger-System der Zellen ein. Clonidine beeinflusst als α_2 -Adrenorezeptor-Agonist die Aktivierung des G_q -Proteins, dessen α -Untereinheit die β_1 -Phospholipase C (PLC β_1) aktiviert und somit in die Phosphatidylinositol-Hydrolyse eingreift. Letzteres führt über die Freisetzung von Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP $_3$) zu einem erhöhten zytoplasmatischen Ca $^{2+}$ -Spiegel. Als weitere Substanzen, die in die Phosphatidylinositol-Hydrolyse eingreifen, gelten Carbachol als Agonist acetylcholinер-muscarinischer Rezeptoren und der Neurotransmitter Serotonin. Phorbol ester (PMA) aktiviert als Diacylglycerol (DAG)-Analogon irreversibel die Proteinkinase C (PKC). All-trans-Retinolsäure (RA) bindet in seiner Eigenschaft als Ligand an die nuklearen Retinolsäure-Rezeptoren (RAR) und Retinoid-X-Rezeptoren (RXR). Die gebundenen RAR und RXR fungieren als Transkriptionsfaktoren und sind damit in der Lage die Transkriptionsrate zu erhöhen.

4.2.1 Wirkung von dBcAMP auf die ApoE-Sekretion

Um zu überprüfen, ob die Aktivierung der PKA zu einer Veränderung der ApoE-Konzentration im Medium führt, wurden Astrozyten mit unterschiedlichen dBcAMP-Konzentrationen (100 μ M bis 1 mM) behandelt und die Menge des sekretierten ApoEs zu den Inkubations-Zeitpunkten 5, 24 und 48 h gemessen (siehe Abbildung 7). dBcAMP erhöhte die sekretierte ApoE-Menge zeit- und dosisabhängig. Der Maximalwert wurde für 1 mM dBcAMP beim Zeitpunkt 48 h gemessen und betrug circa 180 % des Kontrollwerts (für die genauen Daten siehe Anhang 8.1).

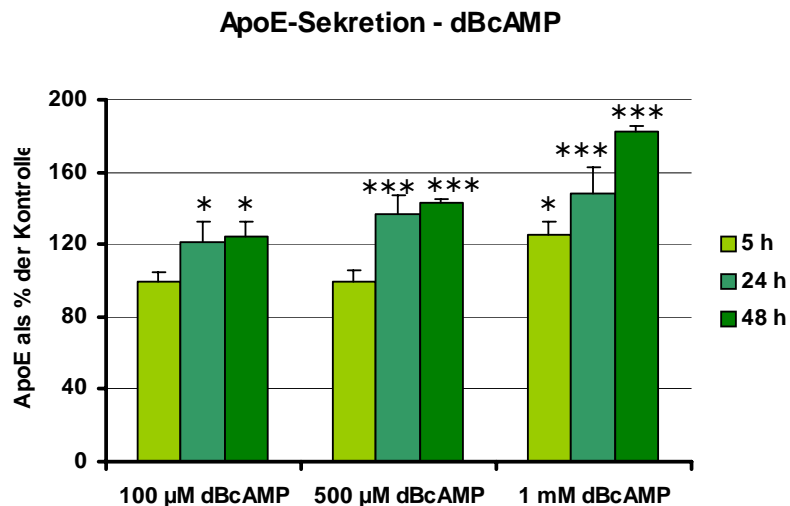


Abbildung 7: Wirkung von dBcAMP auf die ApoE-Sekretion in Astrozytenkulturen. Wurden die Zellen über einen Zeitraum von 48 h mit verschiedenen Konzentrationen dBcAMP (100 μ M, 500 μ M und 1 mM) inkubiert, erhöhte sich die ApoE-Sekretion im Vergleich zu Kontrollkulturen in Zeit- und Dosis-abhängiger Weise. ApoE-Konzentrationen, ausgedrückt in Prozent der Kontrollinkubationen zu den jeweiligen Messzeitpunkten, sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Zahl der Experimente war n = 5. Signifikanzen wurden über ANOVA, gefolgt von Fisher post-hoc-Test ermittelt: * $P < 0,05$ und *** $P < 0,001$ bezogen auf den jeweiligen PBS-Kontrollwert. Jede Substanz und jede Dosis wurden im Dreifachansatz getestet.

Die Erhöhung des zytoplasmatischen cAMP-Spiegels und die damit verbundene Aktivierung der cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) sowie der nachgeschalteten Informationswege scheint also eine Möglichkeit zu sein, über welche die Sekretion von ApoE in Astrozyten reguliert wird.

4.2.2 Wirkung von dBcAMP und RA auf die ApoE-Sekretion

Seit 1996 ist bekannt, dass All-trans-Retinsäure (RA) den dBcAMP-vermittelten Anstieg der ApoE-Sekretion in U87 Astrozytomazellen verstärkt [55]. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch in den hier verwendeten Zellkulturen eintritt, wurden Astrozyten jeweils mit einer Reihe von dBcAMP (100 μ M bis 1 mM) und RA (1 μ M) Konzentrationen behandelt und die Menge des sekretierten ApoEs zu den Inkubations-Zeitpunkten 5, 24 und 48 h gemessen. RA alleine hatte keinen Einfluss auf die ApoE-Sekretion. Wurden dagegen Astrozyten mit einer Kombination von 1 mM dBcAMP und 1 μ M RA inkubiert, war die Stimulation der ApoE-Sekretion signifikant höher als durch die alleinige Verwendung von dBcAMP (bis zu ungefähr 300 % der Kontrolle zu den Zeitpunkten 24 und 48 h, siehe Abbildung 8 und Anhang 8.2).

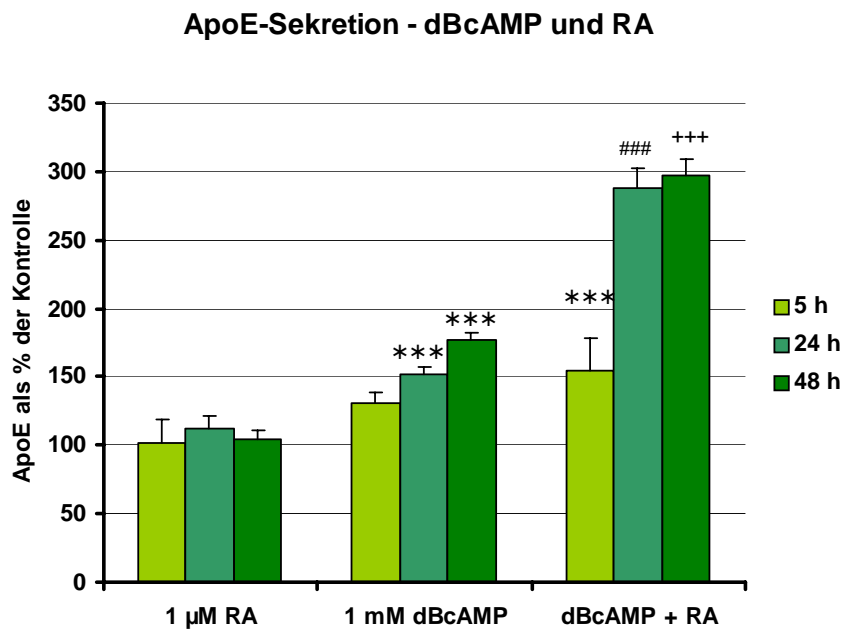


Abbildung 8: Wirkung von dBcAMP und RA auf die Zeit-abhängige ApoE-Sekretion in Astrozytenkulturen. Die Zellen wurden hierfür über einen Zeitraum von 48 h mit 1 mM dBcAMP, 1 μ M RA oder beidem inkubiert. RA erhöhte dabei die dBcAMP-induzierte Steigerung der ApoE-Konzentration im Vergleich zu Kontrollkulturen in Zeit-abhängiger Weise. ApoE-Konzentrationen, ausgedrückt in Prozent der Kontrollinkubationen zu den jeweiligen Messzeitpunkten, sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Zahl der Experimente war $n = 5$. Signifikanzen wurden über ANOVA, gefolgt von Fisher post-hoc-Test ermittelt: *** $P < 0,001$ bezogen auf den PBS-Kontrollwert, ### $P < 0,001$ bezogen auf den Wert für dBcAMP, 1 mM, 24 h, +++ $P < 0,001$ bezogen auf den Wert für dBcAMP, 1 mM, 48 h. Jede Substanz wurde im Dreifachansatz getestet.

Diese Ergebnisse bestätigen den Verdacht, dass RA einen Einfluss auf die cAMP-vermittelte

Steigerung der ApoE-Sekretion innehat. Ob Letzteres über RAs Funktion als Ligand der nuklearen Rezeptoren RAR und RXR gelenkt wird, kann durch diesen Versuchsaufbau jedoch nicht geklärt werden.

4.2.3 Modulation der ApoE-Sekretion durch Isoproterenol und Clonidine

Isoproterenol und Clonidine sind Rezeptoragonisten, die den intrazellulären cAMP-Spiegel über β -Adrenorezeptor-Stimulation beziehungsweise α_2 -Adrenorezeptor-Inhibierung der Adenylatcyclase beeinflussen. Eine Konzentration von 50 nM Isoproterenol erhöhte die ApoE-Sekretion zu den Zeitpunkten 5 und 24 h signifikant auf 123 % und 140 % des jeweiligen Kontrollwerts (siehe Abbildung 9, Anhang Tabelle 12). 500 nM und 1 μ M Isoproterenol führten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer signifikanten Veränderung der ApoE-Konzentration im Medium.

Wirkung von Isoproterenol und Clonidine auf die ApoE-Sekretion

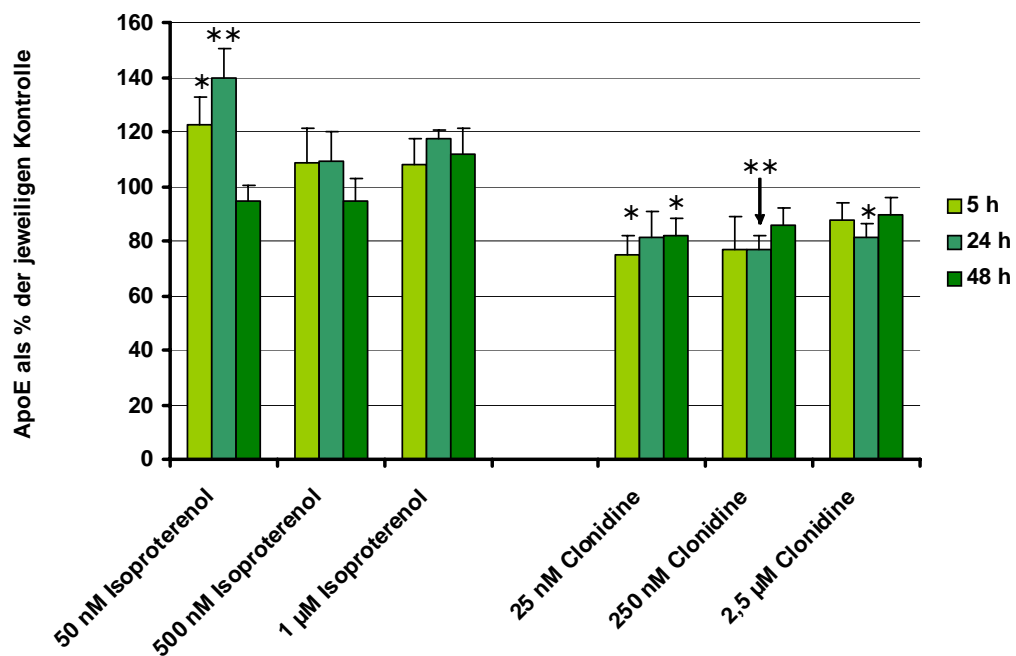


Abbildung 9: ApoE-Konzentrationen von Astrozyten die für 5, 24 und 48 h mit 50, 500 nM und 1 μ M Isoproterenol oder 25, 250 nM und 2,5 μ M Clonidine inkubiert wurden. Die Daten wurden als Prozente des jeweiligen Kontrollwerts angegeben und sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von n = 3 bis 6 Experimenten. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe ANOVA gefolgt von Fisher post-hoc-Test ermittelt. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert. Jede Substanz und jede Dosis wurden im Dreifachansatz getestet.

Der α_2 -Adrenorezeptor-Agonist Clonidine führte zu allen Zeitpunkten zu einer im Vergleich zur Kontrolle niedrigeren ApoE-Sekretion. Hierbei riefen alle Clonidine-Konzentrationen zu

verschiedenen Zeitpunkten zum PBS-Kontrollwert signifikant unterschiedliche ApoE-Konzentrationen hervor (siehe Abbildung 9, Tabelle 12). Die maximale Wirkung (75 % des PBS-Kontrollwerts) wurde mit 25 nM Clonidine zum Zeitpunkt 5 h gemessen.

4.2.4 Wirkung von PMA auf die ApoE-Sekretion

In der Vergangenheit wurde berichtet, dass die Stimulierung der PKC, je nach Zelltyp, unterschiedliche Effekte auf die ApoE-Sekretion haben kann [74, 75]. Um den Einfluss der PKC-Aktivierung auf die ApoE-Sekretion in den hier verwendeten Astrozytenkulturen zu untersuchen wurden Astrozyten mit PMA inkubiert. PMA gilt als DAG-Analogon und aktiviert die PKC irreversibel. Die ApoE-Sekretion für die Konzentrationen 16 und 160 nM war zu keinem Zeitpunkt signifikant von der Kontrolle verschieden. Eine Inkubation mit 480 nM PMA zeigte jedoch eine bezüglich der Kontroll-Inkubation signifikant niedrigere ApoE-Sekretion zu den Zeitpunkten 24 und 48 h von 80 % bzw. 60 % (siehe Abbildung 10, Tabelle 13).

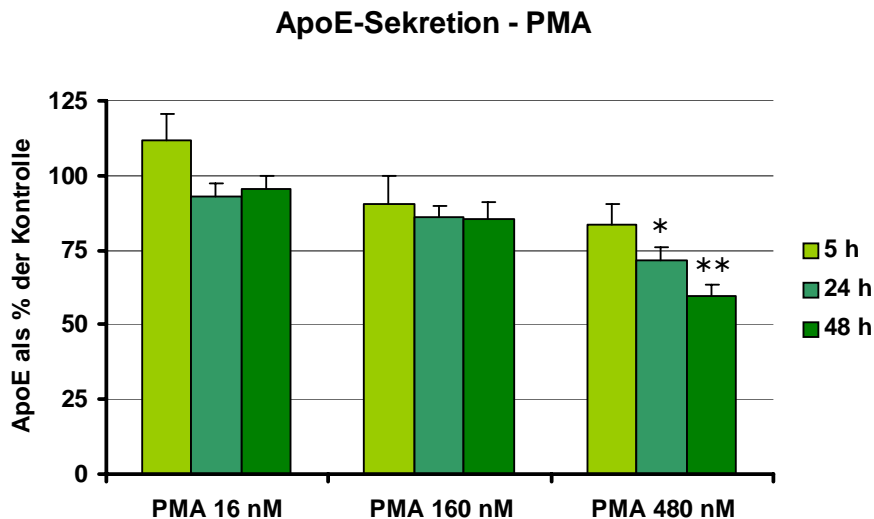


Abbildung 10: Wirkung von PMA auf die ApoE-Sekretion in Astrozytenkulturen zu den Zeitpunkten 5, 24 und 48 h. Die Zellen wurden hierfür über einen Zeitraum von 48 h mit 16, 160 und 480 nM PMA inkubiert. PMA senkte dabei die ApoE-Konzentration im Vergleich zu Kontrollkulturen in Zeit- und Dosis-abhängiger Weise. ApoE-Konzentrationen, ausgedrückt in Prozent der PBS-Kontrollwerte zu den jeweiligen Messzeitpunkten, sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Zahl der Experimente war $n = 4$. Signifikanzen wurden über ANOVA, gefolgt von Fisher post-hoc-Test ermittelt: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ bezogen auf die jeweilige Kontrolle. Jede Substanz und jede Dosis wurden im Dreifachansatz getestet.

4.2.5 Wirkung von PMA auf den dBcAMP-vermittelten Anstieg der ApoE-Sekretion

Da von Astrozyten bekannt ist, dass zwischen dem cAMP-System und der Phosphatidylinositol-Hydrolyse eine Kommunikation besteht [63], wurde darüber hinaus der Einfluss einer Koinkubation mehrerer PMA-Konzentration (16 nM und 480 nM) mit 1 mM dBcAMP zum

Zeitpunkt 5 und 24 h analysiert. In beiden Fällen wurde der dBcAMP vermittelte Anstieg der ApoE-Konzentration (24 h: 152 % und 48 h: 177 % des Kontrollwerts) durch die Zugabe von PMA auf das Niveau des Kontrollwerts herunterreguliert (siehe Abbildung 11, Tabelle 14). Dabei waren die ApoE-Konzentrationen von dBcAMP in Kombination mit 16 nM als auch mit 480 nM PMA signifikant von denen der Inkubation mit dBcAMP alleine verschieden. Die PKC-Aktivierung durch PMA ist offensichtlich in der Lage die ApoE-Sekretions-Steigernde Wirkung von dBcAMP zu unterdrücken.

PMA's Wirkung auf den dBcAMP-vermittelten Anstieg der ApoE-Sekretion

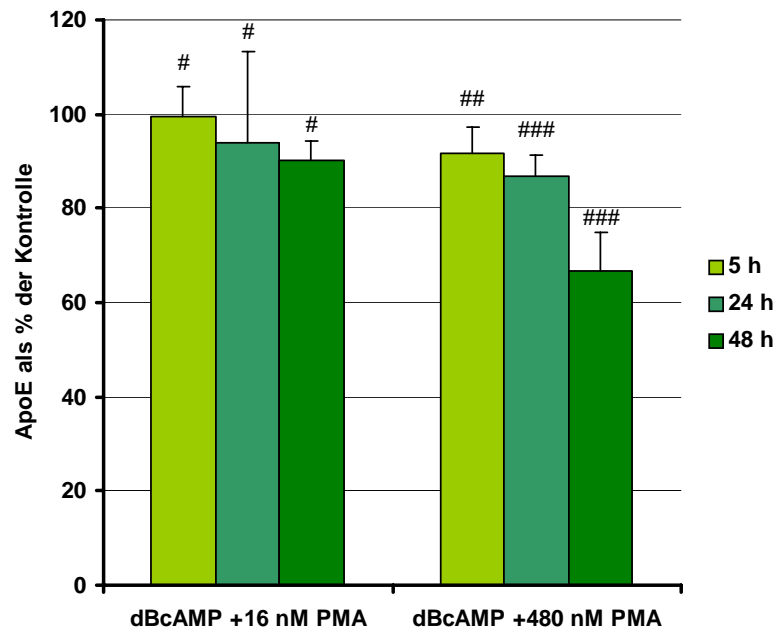


Abbildung 11: Einfluss von PMA auf die dBcAMP-vermittelte Steigerung der ApoE-Konzentration in Astrozyten zu den Zeitpunkten 5, 24 und 48 h. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 48 h entweder mit 1 mM dBcAMP, zweierlei PMA-Konzentrationen (16 und 480 nM), einer Kombination von 1 mM dBcAMP + 16 nM PMA oder einer Kombination von 1 mM dBcAMP + 480 nM PMA inkubiert. Die Daten werden als Prozente der ApoE-Konzentration des PBS-Kontrollwerts angegeben und zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n = 3$ Experimenten. Die Signifikanzen wurden über einen zweiseitigen t-Test (Student) ermittelt: # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ verglichen mit der ApoE-Konzentration des dBcAMP-Ansatzes. Jede Substanz oder Kombination und jede Dosis wurden im Dreifachansatz getestet. Für die Daten von 1 mM dBcAMP und 16 sowie 480 nM PMA alleine siehe Abbildung 7 und Abbildung 10.

4.2.6 Regulation der ApoE-Sekretion durch Arterenol, Carbachol und Serotonin

Außerdem wurden Agonisten der Rezeptoren, die den Phosphoinositol-Hydrolyse-Weg beeinflussen, auf ihre Wirkung bezüglich der ApoE-Sekretion untersucht.

Arterenol ist ein spezifischer Agonist für α 1-Adrenorezeptoren, der in Astrozytenkulturen zu einer Anhäufung intrazellulärer Inositolphosphate führte [76]. Mit der Konzentration von 1 μ M erhöhte Arterenol in den vorliegenden Untersuchungen die ApoE-Sekretion zum Zeitpunkt 5 h signifikant auf 137 % des PBS-Kontrollwerts (siehe Abbildung 12, Anhang Tabelle 16).

Carbachol stimuliert alle acetylcholin-muscarinischen Rezeptoren, welche die PLC aktivieren [77]. Wie Arterenol führt auch Carbachol in Astrozytenkulturen zu einer erhöhten Produktion intrazellulärer Inositolphosphate [76]. Mit den Konzentrationen 10 und 100 μ M senkte Carbachol zum Zeitpunkt 48 h die ApoE-Sekretion signifikant auf 82 und 86 % der PBS-Kontrolle (siehe Abbildung 12).

Serotonin aktiviert alle 5-HT Rezeptor-Subtypen, sowohl derer, die an PLC gebunden sind als auch der 5-HT₆- und 5-HT₇-Subtypen die die Anhäufung von intrazellulärem cAMP in Astrozyten stimulieren [78]. In primären Astrozytenkulturen führt es zu einer Anhäufung von Inositolphosphaten [63]. In der vorliegenden Untersuchung verursachte Serotonin mit 2,5 μ M zum Zeitpunkt 5 h eine signifikante Stimulierung der ApoE-Sekretion auf 130 % der PBS-Kontrolle.

Alle anderen Arterenol-, Carbachol- und Serotonin-Konzentrationen und Zeitpunkte unterschieden sich in ihren ApoE-Konzentrationen nicht signifikant vom PBS-Kontrollwert (siehe Abbildung 12, Anhang Tabelle 16).

ApoE-Sekretion bei Inkubation mit Arterenol, Carbachol und Serotonin

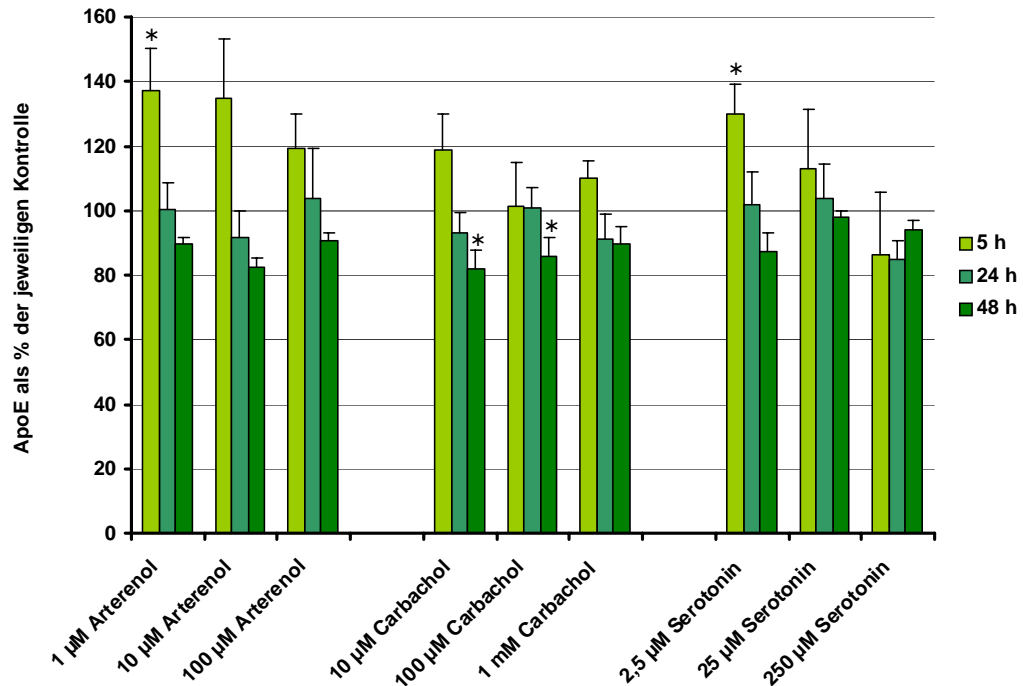


Abbildung 12: ApoE-Konzentrationen von Astrozyten die für 5, 24 und 48 h mit 1, 10 und 100 µM Arterenol, 10, 100 µM und 1 mM Carbachol oder 2,5; 25 und 250 µM Serotonin inkubiert wurden. Die Daten wurden als Prozente der entsprechenden Kontrollen angegeben. Es handelt sich um Mittelwerte ± Standardabweichung von n = 3 bis 6 Experimenten. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe ANOVA gefolgt von Fisher post-hoc-Test ermittelt. * $P < 0,05$ bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert. Jede Substanz und jede Dosis wurden im Dreifachansatz getestet.

4.2.7 Wirkung von Arterenol und Serotonin auf die Isoproterenol-vermittelte Steigerung der ApoE-Sekretion

Es wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass sowohl Phenylephrine (Arterenol-ähnlicher α_1 -Adrenorezeptor-Agonist) durch seine α_1 -adrenerge Stimulierung als auch Serotonin in der Lage sind, den Isoproterenol-vermittelten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration zu potenzieren. Beide Substanzen haben allein keinen Einfluss auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration [63]. Um zu untersuchen, ob dies in gleicher Weise für den Isoproterenol-vermittelten Anstieg der ApoE-Konzentration im Medium gilt, wurden die Zellen entweder mit 50 nM Isoproterenol oder mit 10 µM Arterenol oder einer Kombination von beiden zum Zeitpunkt 5 und 24 h auf die ApoE-Sekretion untersucht. Arterenol potenzierte den Isoproterenol-vermittelten Anstieg der ApoE-Sekretion. Am ausgeprägtesten war der Effekt zum Zeitpunkt 5 h, da hier Arterenol die Isoproterenol-vermittelte Steigerung der ApoE-Konzentration von 130 % auf 170 % des Kontrollwerts erhöhte (siehe Abbildung 13, Anhang Tabelle 17).

Wirkung von Arterenol auf den Isoproterenol-vermittelten Anstieg der ApoE-Sekretion

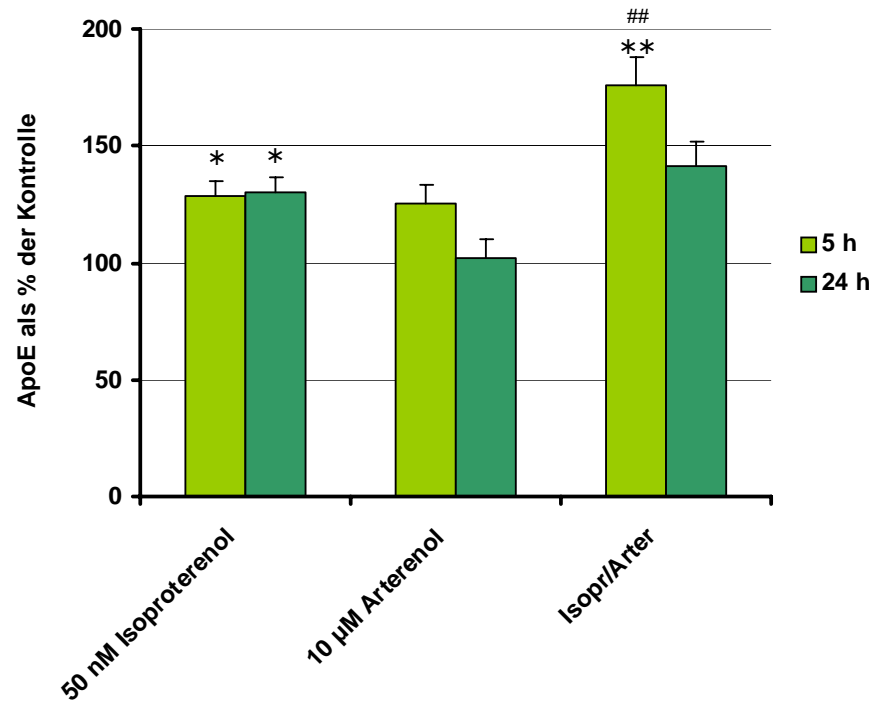


Abbildung 13: Wirkung von Arterenol auf die Isoproterenol-vermittelte Steigerung der ApoE-Konzentration zu den Zeitpunkten 5 und 24 h. Astrozyten wurden über einen Zeitraum von 24 h mit 50 nM Isoproterenol, 10 µM Arterenol oder einer Kombination von beiden inkubiert. Die Balken zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n = 3$ Experimenten. Die Daten wurden als Prozent der ApoE-Sekretion unter Kontrollbedingungen dargestellt. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe ANOVA gefolgt von Fisher post-hoc-Test ermittelt. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ bezogen auf die ApoE-Konzentration der Kontrolle. ## $P < 0,01$ bezogen auf die ApoE-Konzentration des Isoproterenol. Jede Substanz und Kombination wurde im Dreifachansatz getestet.

Des weiteren wurde überprüft, ob Serotonin in der Lage ist den Isoproterenol-vermittelte Anstieg der ApoE-Sekretion im Medium zu potenzieren. Dazu wurden die Zellen entweder mit 50 nM Isoproterenol oder mit 2,5 µM Serotonin oder einer Kombination von beiden zum Zeitpunkt 5 und 24 h auf die ApoE-Sekretion untersucht. Die Kombination Isoproterenol/Serotonin war nicht in der Lage die ApoE-Sekretion signifikant über die ApoE-Konzentration zu erhöhen, welche bei separater Gabe der Substanzen hervorgerufen wurde (siehe Abbildung 14, Tabelle 18).

Wirkung von Serotonin auf den Isoproterenol-vermittelten Anstieg der ApoE-Sekretion

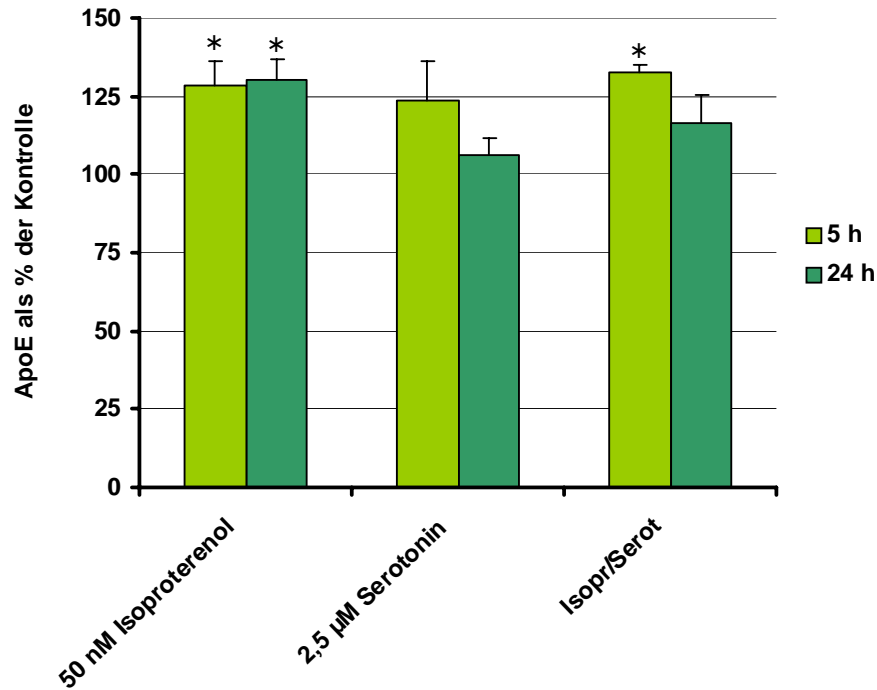


Abbildung 14: Wirkung von Serotonin auf die Isoproterenol-vermittelte Steigerung der ApoE-Konzentration zu den Zeitpunkten 5 und 24 h. Astrozyten wurden mit 50 nM Isoproterenol, 2,5 µM Serotonin oder einer Kombination von beiden über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Die Balken zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n = 3$ Experimenten. Die Daten sind als Prozent der ApoE-Sekretion unter Kontrollbedingungen dargestellt. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe ANOVA gefolgt von Fisher post-hoc-Test ermittelt. * $P < 0,05$ bezogen auf die ApoE-Konzentration der Kontrolle. Jede Substanz und Kombination wurde im Dreifachansatz getestet.

4.3 Regulation der ApoE-mRNA-Expression

Um herauszufinden, ob die bei Inkubation mit dBcAMP beobachtete Erhöhung der ApoE-Sekretion auf eine vorhergehende Erhöhung der ApoE-mRNA zurückzuführen ist, wurden Astrozyten Primärkulturen mit 1 mM dBcAMP und 1 µM RA alleine oder in Kombination inkubiert und die Menge an ApoE-mRNA zu den Zeitpunkten 1, 6, 24 und 48 h analysiert.

Für die Inkubation der Zellen mit dBcAMP ergab sich ein früher Anstieg der ApoE-mRNA zum Zeitpunkt 1 h (203 % des PBS-Kontrollwerts, siehe Abbildung 15, Anhang Tabelle 15), die zu den späteren Zeitpunkten gemessenen ApoE-mRNA-Mengen unterschieden sich nicht signifikant vom PBS-Kontrollwert. Damit geht dem dBcAMP-bedingten Anstieg der ApoE-Sekretion zum Zeitpunkt 24 und 48 h ein Anstieg der ApoE-mRNA zum Zeitpunkt 1 h voraus.

Obwohl RA alleine bezüglich der ApoE-Sekretion bei den Zellen keine Wirkung zeigte, konnte

auf mRNA-Ebene zum Zeitpunkt 6 h eine signifikante Erhöhung der ApoE-mRNA-Expression im Vergleich zum PBS-Kontrollwert beobachtet werden (140 % des PBS-Kontrollwerts, siehe Abbildung 15, Anhang Tabelle 15). Die zu den anderen Zeitpunkten gemessenen ApoE-mRNA-Mengen waren nicht signifikant vom PBS-Kontrollwert verschieden.

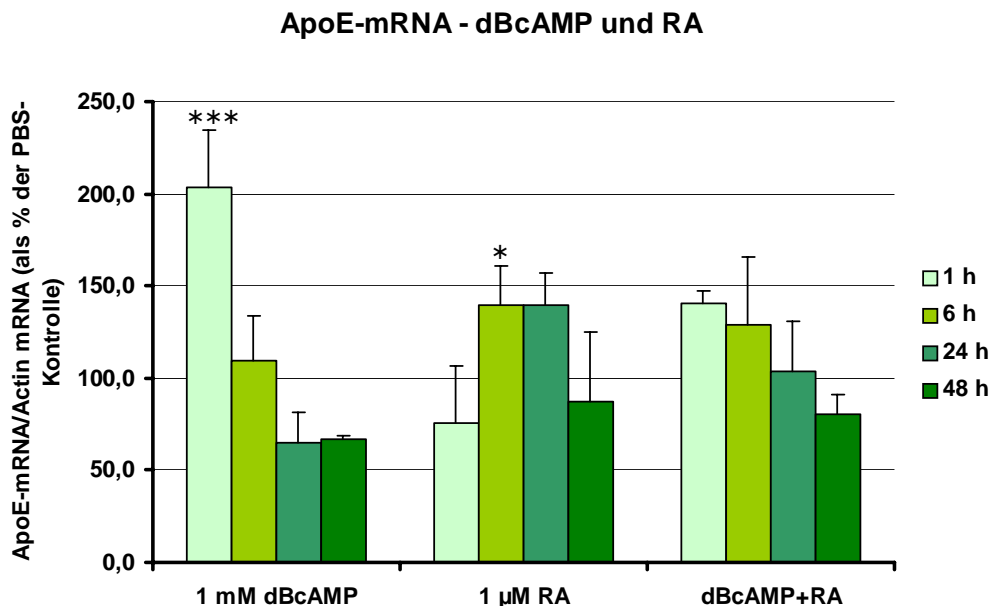


Abbildung 15: Auswirkungen von dBcAMP und RA auf die ApoE-mRNA-Expression in primären Ratten Astrozytenkulturen. Die ApoE-mRNA Mengen wurden nach Inkubation der Zellen mit 1 mM dBcAMP oder 1 µM RA allein sowie 1mM dBcAMP/1 µM RA in Kombination zu den Zeitpunkten 1, 6, 24 und 48 h gemessen. Die einzelnen Werte wurden normalisiert, indem die Messwerte für ApoE-mRNA durch die Messwerte von Aktin-mRNA derselben Zellpopulation dividiert wurden. Die hier geschilderten Daten sind die Differenzen (ApoE/Aktin) in % der PBS-Kontrolle zu den jeweiligen Messzeitpunkten. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n = 3$ Experimenten. Jede Substanz und Kombination wurde im Dreifachansatz gemessen. Signifikanzen wurden mit ANOVA gefolgt von Fisher post-hoc Test errechnet. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

Wurden die Astrozyten mit dBcAMP und RA in Kombination inkubiert, so resultierte bezüglich der ApoE-Sekretion eine Verstärkung des bei Inkubation mit dBcAMP beobachteten Effekts. Betrachtete man die ApoE-mRNA-Expression, so war dagegen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine signifikante Steigerung der ApoE-mRNA gegenüber dem PBS-Kontrollwert zu sehen (siehe Abbildung 15, Anhang Tabelle 15).

Um zu analysieren, ob der Aktivierung der PKC durch PMA, die im Vorfeld eine Verringerung der ApoE-Sekretion zur Folge hatten, eine Veränderung der ApoE-mRNA-Expression vorweg geht, wurden primäre Ratten-Astrozytenkulturen mit 1 mM dBcAMP oder 480 nM PMA in Kombination inkubiert. Die ApoE-mRNA-Mengen wurden zu den Zeitpunkten 1, 6, 24 und 48 h untersucht.

Wurden die Astrozyten mit 1 mM dBcAMP und 480 nM PMA in Kombination inkubiert, so verursachte dies eine Verringerung der ApoE-Sekretion. Dem ging eine Reduktion der ApoE-

mRNA-Expression vorweg. Zu den Zeitpunkten 6, 24 und 48 h sank die ApoE-mRNA-Menge signifikant unter den PBS-Kontrollwert (42, 45 und 46 % des PBS-Kontrollwerts, siehe Abbildung 16, Anhang Tabelle 15).

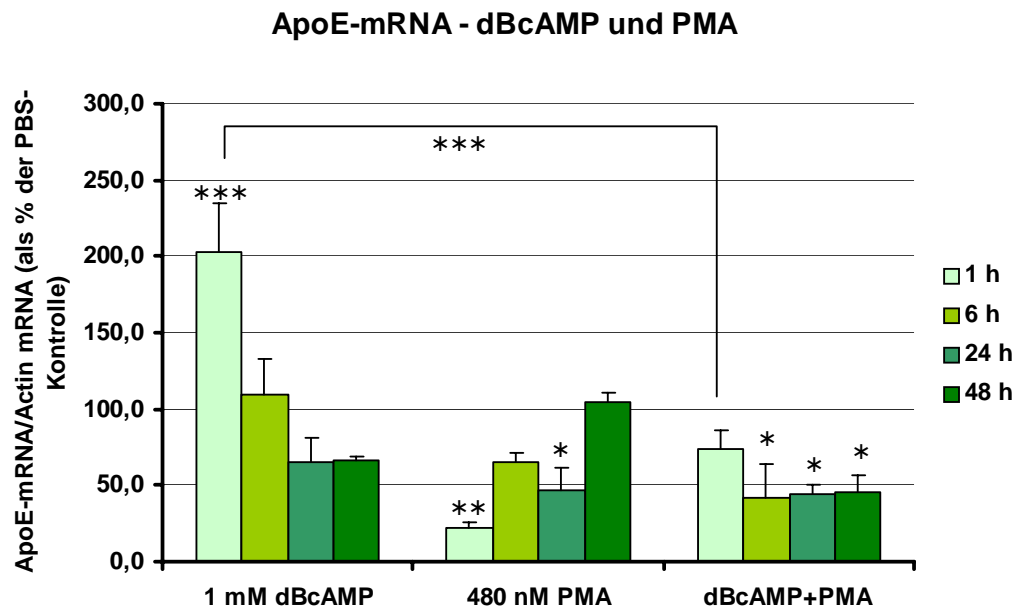


Abbildung 16: Auswirkungen von dBcAMP und PMA auf die ApoE-mRNA-Expression in primären Ratten Astrozytenkulturen. Die ApoE-mRNA Mengen wurden nach Inkubation der Zellen mit 1 mM dBcAMP oder 480 nM PMA allein sowie 1 mM dBcAMP/480 nM PMA in Kombination zu den Zeitpunkten 1, 6, 24 und 48 h gemessen. Die einzelnen Werte wurden normalisiert, indem die Messwerte für ApoE-mRNA durch die Messwerte von Aktin-mRNA derselben Zellpopulation dividiert wurden. Die hier geschilderten Daten sind die Differenzen (ApoE/Aktin) in % der PBS-Kontrolle zu den jeweiligen Messzeitpunkten. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n = 3$ Experimenten. Jede Substanz und Kombination wurde im Dreifachansatz gemessen. Signifikanzen wurden mit ANOVA gefolgt von Fisher post-hoc Test errechnet. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$.

4.4 Unterschiedliche Regulierung von ApoE und NGF-Sekretion

Es sollte überprüft werden, ob es sich bei der Regulierung der Astrozyten bezüglich der ApoE-Sekretion um eine spezifische oder um eine allgemeine Wirkung auf die Sekretion von Proteinen handelt. Dazu wurde die NGF-Sekretion zum Zeitpunkt 48 h im Medium von Astrozyten untersucht, die mit jenen Substanzen, Kombinationen und Konzentrationen inkubiert worden waren, die bei der Untersuchung zur ApoE-Regulation die stärksten Effekte hervorgerufen hatten.

Im Gegensatz zu der Steigerung der ApoE-Sekretion (177 % bzw. 104 % des ApoE-Kontrollwerts), reduzierten sowohl dBcAMP als auch RA die NGF-Sekretion signifikant (56 % bzw. 52 % des NGF-Kontrollwerts). Wurden dBcAMP und RA als Kombination verabreicht, ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der NGF-Sekretion im Vergleich zur Kontrolle.

Die ApoE-Sekretion stieg dagegen um das signifikante dreifache der ApoE-Kontrolle (298 % des Kontrollwerts, siehe Abbildung 17, Anhang Tabelle 19).

Des Weiteren wurde die Wirkung von Isoproterenol und Clonidine auf die Sekretion von NGF untersucht. Wie oben geschildert sind beides Rezeptoragonisten, die den intrazellulären cAMP-Spiegel über β -Adrenorezeptor-Stimulation beziehungsweise α_2 -Adrenorezeptor-Inhibierung der Adenylatcyclase beeinflussen. Eine Konzentration von 50 nM Isoproterenol reduzierte die NGF-Sekretion signifikant auf 68 % des Kontrollwerts (siehe Abbildung 17), wohingegen die ApoE-Sekretion zum Zeitpunkt 48 h keine signifikante Veränderungen zum ApoE-Kontrollwert aufwies. Bei Inkubation mit 25 nM Clonidine veränderte sich die NGF-Sekretion verglichen mit dem Kontrollwert nicht signifikant. Die ApoE-Sekretion hingegen sank verglichen mit dem ApoE-Kontrollwert auf signifikante 82 % des Kontrollwerts.

Unterschiedliche Regulation von ApoE und NGF

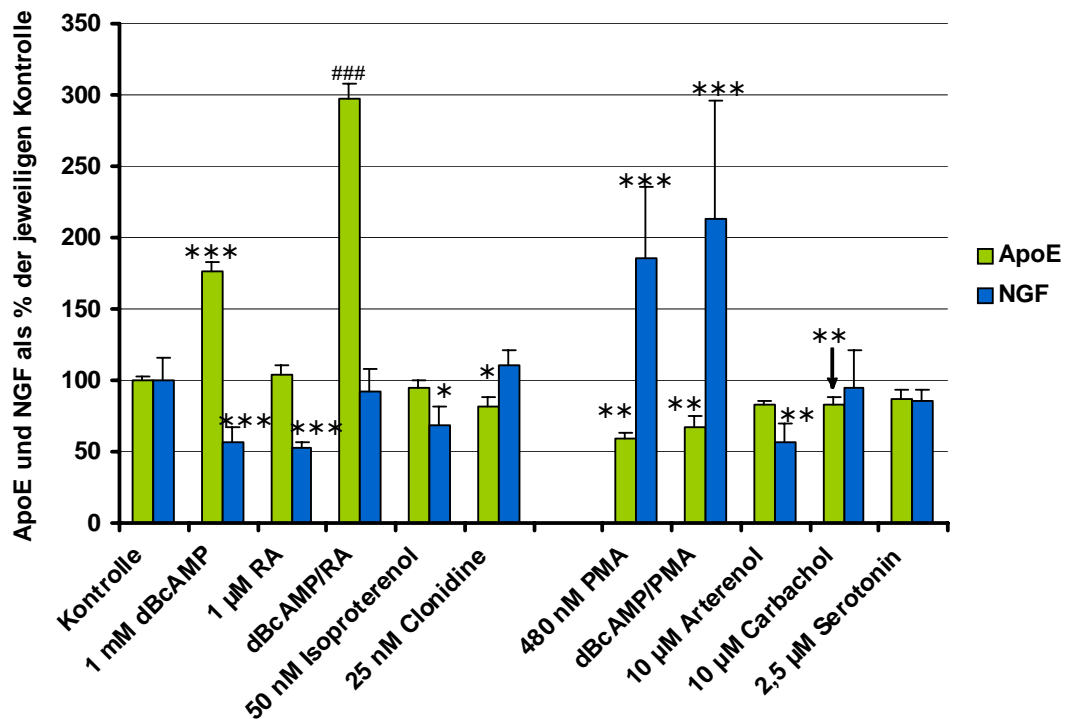


Abbildung 17: Gegenüberstellung der unterschiedlichen Einflüsse von dBcAMP, RA, Isoproterenol, Clonidine, PMA, Arterenol, Carbachol und Serotonin auf ApoE- und NGF-Konzentration in Astrozytenkulturen über einen Zeitraum von 48 h. Die Zellen wurden entweder mit 1 mM dBcAMP, 1 µM RA und deren Kombination, 50 nM Isoproterenol, 25 nM Clonidine, 480 nM PMA und einer Kombination von 1 mM dBcAMP und 480 nM PMA, 10 µM Arterenol, 10 µM Carbachol und 2,5 µM Serotonin inkubiert. Die NGF- und ApoE-Konzentrationen wurde zum Zeitpunkt 48 h gemessen. Die Daten wurden als Prozente der NGF- bzw. ApoE-Konzentration des jeweiligen Kontrollwerts angegeben und zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n = 3$ Experimenten. Die Signifikanzen wurden über einen zweiseitigen t-Test (Student) ermittelt: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ verglichen mit der NGF- bzw. ApoE-Konzentration der jeweiligen Kontrolle. # $P < 0,05$ verglichen mit der NGF-

bzw. ApoE-Konzentration des dBcAMP. Jede Substanz und Kombination wurde im Dreifachansatz getestet.

Im Gegensatz zur ApoE-Sekretion (59 % des ApoE-Kontrollwerts), induzierte der PKC-Aktivator PMA (480 nM) eine Steigerung der NGF-Sekretion im Vergleich zur NGF-Kontrolle. Diese war sowohl bezüglich des NGF-Kontrollwerts (185 % des Kontrollwerts) als auch bezüglich des NGF-Werts der dBcAMP-Inkubation signifikant verschieden. Wiederum im Gegensatz zur ApoE-Sekretion (67 % des ApoE-Kontrollwerts) führte die Kombination dBcAMP/PMA zu einer Steigerung der NGF-Sekretion, die bezüglich des NGF-Kontrollwerts und des Werts der dBcAMP-Inkubation signifikant verschieden war (214 % des Kontrollwerts, siehe Abbildung 17).

Zusätzlich wurden Agonisten der Rezeptoren, die den Phosphoinositol-Hydrolyse-Weg beeinflussen, bezüglich ihrer unterschiedlichen Wirkung auf die NGF- bzw. ApoE-Sekretion untersucht. Die Inkubation der Astrozyten mit dem spezifischen $\alpha 1$ -Adrenoreceptor Agonisten Arterenol (10 μ M) reduzierte die NGF-Sekretion signifikant auf 57 % der Kontrolle. Die ApoE-Sekretion war hier bezüglich der ApoE-Kontrolle nicht signifikant verschieden. Die Inkubation mit dem acetylcholin-muscarinischen-Rezeptoragonisten Carbachol (10 μ M) beeinflusste die NGF-Sekretion im Vergleich zum NGF-Kontrollwert nicht signifikant. Die ApoE-Sekretion sank dagegen auf signifikante 82 % des ApoE-Kontrollwerts. Inkubation mit 2,5 μ M Serotonin veränderte weder die NGF- noch die ApoE-Konzentration bezüglich der jeweiligen Kontrolle in signifikantem Ausmaß.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die veränderte Produktion von ApoE durch die eingesetzten Substanzen spezifisch ist.

4.5 Inkubationsexperimente mit Amyloiden

4.5.1 Überprüfung der Fibrillogenität der gealterten Amyloid-Fragmente

Um den Einfluss von nicht fibrillären im Gegensatz zu fibrillären Amyloiden auf die ApoE-Entwicklung im Kulturmedium von primären Astrozytenkulturen abschätzen zu können, wurden zunächst vorbereitende Studien durchgeführt. Ziel dieser Studien war es zu bestimmen, ob unter den verwendeten Versuchsbedingungen die gewählten gealterten Amyloide in fibrillärer Form vorlagen. Dazu wurden die verwendeten Amyloid-Fragmente gealtert (siehe 3.4.6.3.1) und die Produkte der Alterung mit Kongorot gefärbt und auf ihre Fibrillogenität analysiert. Es zeigte sich, dass - unter den in dieser Arbeit gewählten Alterungskonditionen - die für AD typischen, aus der Literatur bekannten Amyloide (1-38), 1-40), (1-42) und (1-43) in fibrillärer Form vorlagen (siehe Abbildung 18). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass auch die reverse Amyloid-Sequenz β /A4(40-1) in fibrillärer Form vorlag. Von den kürzeren Amyloid-Fragmenten lagen außerdem β /A4(1-28), (12-28), (22-35) und (25-35) als Fibrillen vor. Die Fragmente β /A4(1-11), (1-16), und (10-20) lagen dagegen in nicht fibrillärer Form vor (siehe Abbildung 18).

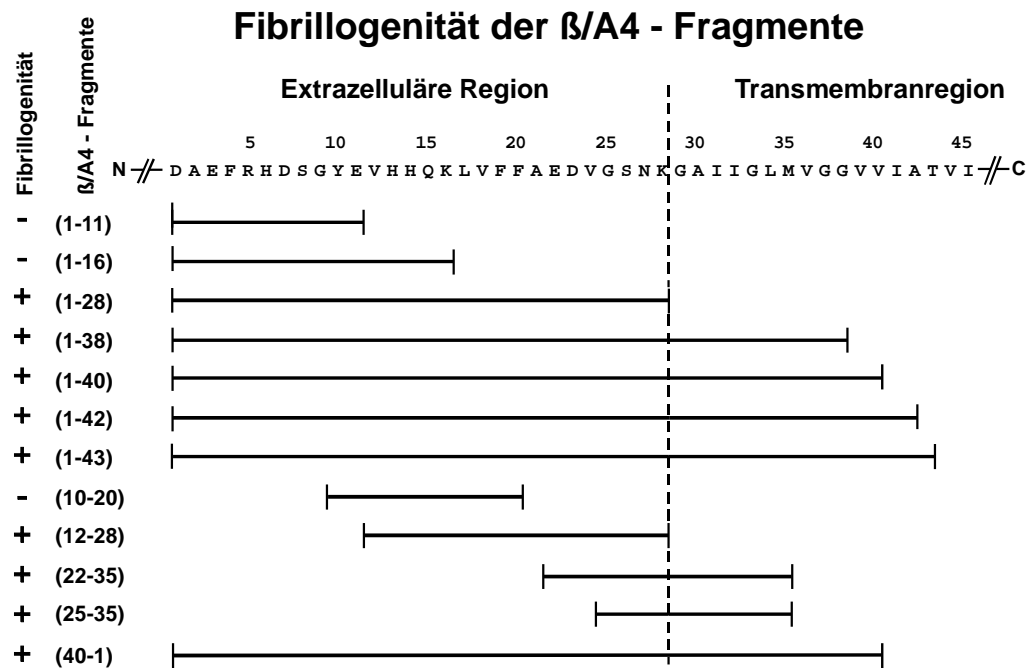


Abbildung 18: Aminosäuresequenzen und Fibrillogenität der in den Inkubationen verwendeten Amyloid-Fragmente. Die unter diesen Versuchsbedingungen fibrillären Amyloid-Fragmente sind mit einem + gekennzeichnet, die nicht fibrillären Fragmente mit einem -.

4.5.2 Veränderung von ruhender zu aktivierter Zellform bei Inkubationen mit Amyloid und dBcAMP

In vielen Veröffentlichungen wurde berichtet, dass Astrozyten in Kultur eine flache, Pfannkuchen-artige Form besitzen. Sie werden als ruhende Astrozyten bezeichnet. Wurden die Zellen in den hier geschilderten Versuchen über 72 h mit PBS-Kontrollmedium inkubiert behielten sie diese Form bei. Dies galt ebenso für Inkubationen mit 10 μ M der reversen Amyloid-Sequenz β /A4(40-1) (siehe Abbildung 19a, c). Von Astrozyten, die mit Amyloid-Fragmenten oder dBcAMP inkubiert worden waren, wurde dagegen berichtet, dass die Zellen eine sternförmig-aktivierte Form annehmen [79, 80]. Um sicherzustellen, dass die Zellen der hier vorliegenden Experimente in gleicher Weise auf Amyloid und dBcAMP reagieren und damit ein Vergleich zwischen den Experimenten anderer Veröffentlichungen zu ermöglichen, wurden die verwendeten Zellen mittels indirekter GFAP- und S100 β -Immunfärbung auf ihre Formänderung hin analysiert.

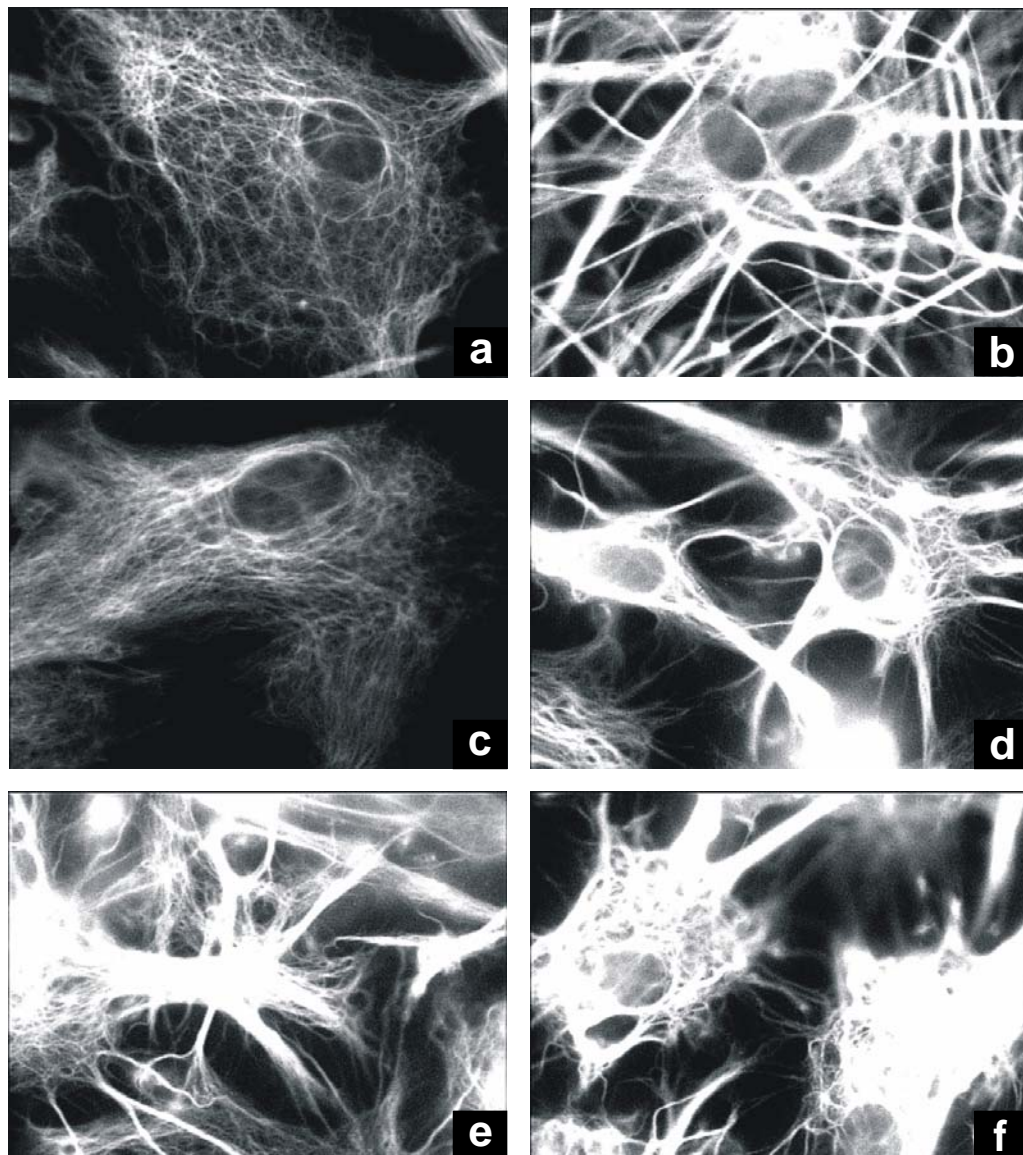


Abbildung 19: Indirekte GFAP Immunfärbung. Vergrößerung: x 750. Kontrollzellen nach 72 h Inkubation mit: a) PBS, b) dBcAMP und c) der reversen Amyloid-Sequenz $\beta/A4(40-1)$. Zellen nach Inkubation mit den Amyloid-Fragmenten d) $\beta/A4(1-40)$, als Beispiel für Inkubationen mit $\beta/A4(1-40)$, (1-42) und (1-43), e) $\beta/A4(25-35)$ und f) $\beta/A4(10-20)$. Im Vergleich mit den Kontrollinkubationen zeigten die Zellen, die mit den Amyloid-Fragmenten $\beta/A4(1-40)$, (1-42), (1-43), (25-35) und (10-20) inkubiert worden waren eine verstärkte GFAP-Immunfärbung und eine sternförmige Form, vergleichbar mit der Inkubation mit dBcAMP. Die anderen getesteten Fragmente hatten keine Effekte.

Bei der indirekten GFAP-Immunfärbung zeigten Astrozyten die mit 1 mM dBcAMP sowie mit 10 μM der Amyloide $\beta/A4(1-40)$, (1-42), (1-43), (25-35) und (10-20) inkubiert worden waren eine sternförmig aktivierte Form (Abbildung 19b, d, e und f). Hierbei ging die Veränderung der ruhenden Form zur sternförmig aktivierten bei Inkubation mit dBcAMP (nach 6 h) zeitlich der bei Inkubation mit Amyloid (nicht vor 48 h) voraus. Mit PBS-Kontrollmedium oder 10 μM der reversen Amyloid-Sequenz $\beta/A4(40-1)$ inkubierte Astrozyten behielten ihre flache, Pfannkuchen-artige Form und ähnelten damit nicht-aktivierten Astrozyten (siehe Abbildung 19).

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei indirekter S100 β -Immunfärbung (Abbildung 20). Mit PBS-Kontrollmedium oder 10 μ M der reversen Amyloid-Sequenz β /A4(40-1) inkubierte Astrozyten zeigten eine flache, Pfannkuchen-artige Form (siehe Abbildung 20a, c). Dagegen zeigten Astrozyten die mit dBcAMP, β /A4(1-40), (1-42), (1-43), (25-35) und (10-20) inkubiert worden waren eine sternförmig aktivierte Form (Abbildung 20b, d, e und f). Auch in diesem Fall trat die Änderung von ruhender zu aktivierter Form bei Inkubationen mit dBcAMP (nach 6 h) zeitlich vor der mit Amyloid (nach 48 h) ein.

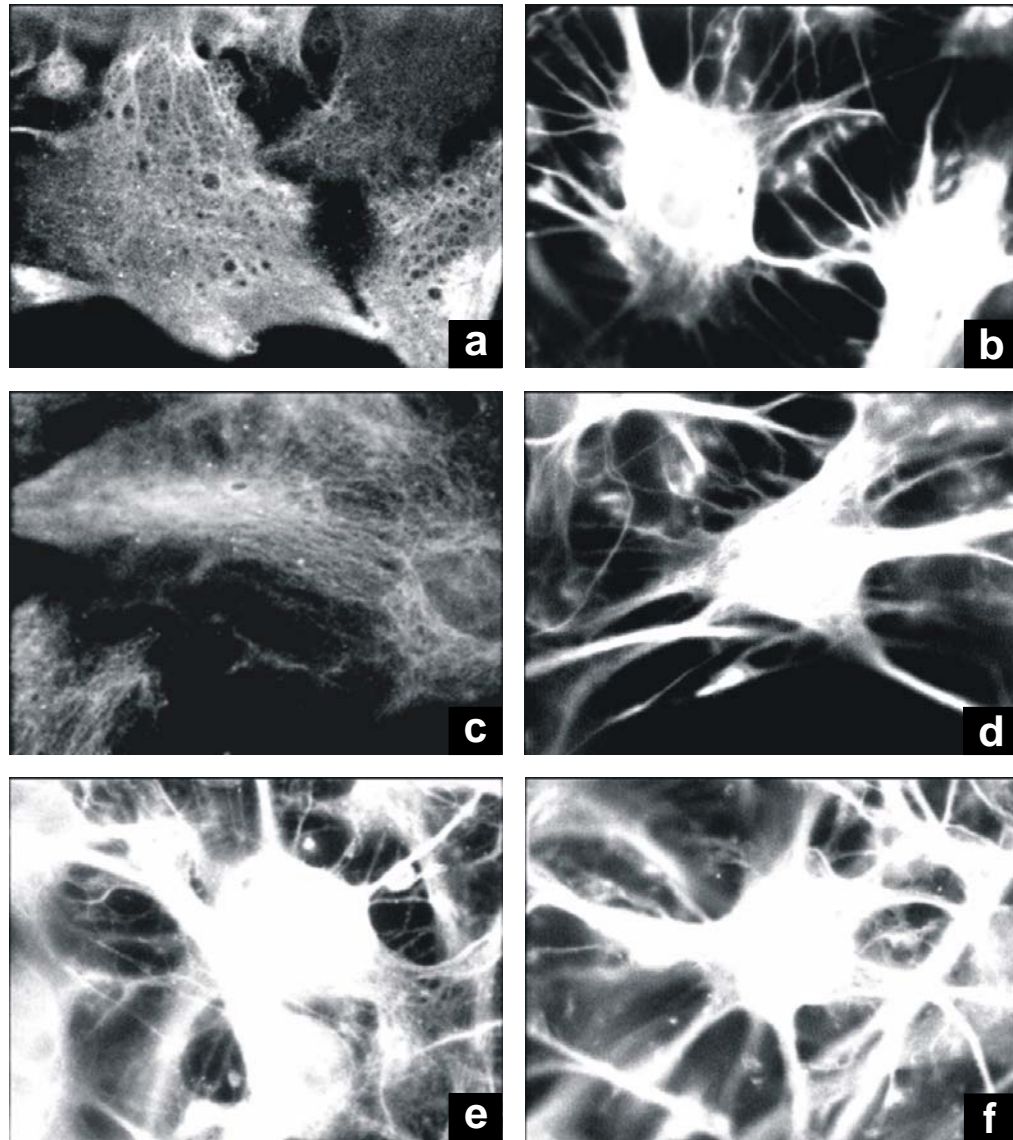


Abbildung 20: Indirekte S100 β -Immunfärbung. Vergrößerung: x 750. Kontrollzellen nach 72 h Inkubation mit: a) PBS, b) dBcAMP und c) der reversen Amyloid-Sequenz β /A4(40-1). Zellen nach Inkubation mit den Amyloid-Fragmenten d) β /A4(1-40), als Beispiel für Inkubationen mit β /A4(1-40), (1-42) und (1-43), e) β /A4(25-35) und f) β /A4(10-20). Im Vergleich mit den Kontrollinkubationen zeigten die Zellen die mit den Amyloid-Fragmenten β /A4(1-40), (1-42), (1-43), (25-35) und (10-20) inkubiert worden waren eine verstärkte S100 β -Immunfärbung und eine sternförmige Form, vergleichbar mit der Inkubation mit dBcAMP. Die anderen getesteten Fragmente hatten keine Effekte.

4.5.3 Wirkung der verschiedenen Amyloid-Fragmente auf die ApoE-Konzentration im Medium

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, welche Epitope des $\beta/A4$ -Amyloids die Verfügbarkeit von ApoE im Kulturmedium von Astrozyten beeinflussen, wurden die Zellen mit verschiedenen Amyloid-Fragmenten über 72 h inkubiert und zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 h die Menge des ApoEs im Medium analysiert. Die im Verlauf dieser Inkubationsexperimente verwendete Konzentration der Amyloid-Fragmente war jeweils 10 μM . Für die genauen Werte und Signifikanzen siehe Anhang Tabelle 20 und Tabelle 21.

Lediglich bei einem Fragment - $\beta/A4(1-11)$ – war zu den Zeitpunkten 48 h (121 % des PBS-Kontrollwerts) und 72 h (118 % des PBS-Kontrollwerts) eine zum PBS-Kontrollwert signifikante geringfügige Steigerung der gemessenen ApoE-Konzentration im Medium zu beobachten. Die gemessenen ApoE-Konzentrationen bei Inkubation mit $\beta/A4(1-16)$ waren mit den PBS-Kontrollwerten vergleichbar und zu keinem Zeitpunkt signifikant von ihr verschieden.

Die gemessenen ApoE-Konzentrationen bei Inkubationen mit den Fragmenten $\beta/A4(1-38)$, (1-40), (1-42) und (1-43) waren zu jedem Zeitpunkt von den Werten der jeweiligen PBS-Kontrolle signifikant verschieden. Die ApoE-Konzentration im Medium lag hier über den gesamten Zeitraum hinweg auf einen nicht mehr nachweisbaren Wert oder knapp über der Nachweisgrenze des ApoE-ELISAs (0,25 nM).

Die verbleibenden Amyloid-Fragmente $\beta/A4(10-20)$, (12-28), (22-35), und (25-35) führten zu einer Reduktion der gemessenen ApoE-Konzentration im Medium (20 – 80 % des PBS-Kontrollwerts).

Bei der Inkubation von Astrozyten war die reverse Sequenz $\beta/A4(40-1)$, die in der Literatur häufig als Kontrolle betrachtet wird, bezüglich ihrer Wirkung auf die gemessene ApoE-Konzentrationen im Medium verglichen mit den jeweiligen PBS-Kontrollwerten zu jedem Zeitpunkt signifikant verschieden. Zum Zeitpunkt 24 h erreichte die gemessene ApoE-Konzentration im Medium mit $\beta/A4(40-1)$ nur 22 %, bei 48 und 72 h nur jeweils 45 % PBS-Kontrollwerts und weicht damit erheblich von der PBS-Kontrolle ab (Abbildung 21, Anhang Tabelle 20, Tabelle 21).

Bezog man die gemessenen ApoE-Konzentrationen des Mediums auf die Werte der reversen Sequenz $\beta/A4(40-1)$ waren sie bei Inkubation mit $\beta/A4(1-11)$ zu jedem Zeitpunkt signifikant verschieden. Die gemessenen ApoE-Konzentrationen des Mediums bei Inkubation mit $\beta/A4(1-16)$ unterschieden sich von denen der reversen Sequenz $\beta/A4(40-1)$ zu allen drei Zeitpunkten signifikant (Abbildung 21, Anhang Tabelle 20, Tabelle 21). Betrachtete man ApoE-Konzentrationen der Inkubationen mit den Fragmenten $\beta/A4(1-38)$, (1-40), (1-42) und (1-43), so waren alle gemessenen ApoE-Konzentrationen im Medium signifikant von der reversen Sequenz verschieden. Bei Inkubationen mit den Fragmenten $\beta/A4(10-20)$, (12-28), (22-35), und (25-35) waren nur die gemessenen ApoE-Konzentration der Inkubation mit $\beta/A4(12-28)$ zum

Zeitpunkt 24 h und β /A4(10-20) zu den Zeitpunkten 24 h und 72 h signifikant von der reversen Sequenz verschieden.

Vor allem die hauptsächlich in den Amyloid-Plaques vorkommenden Amyloid-Fragmente β /A4(1-38), (1-40), (1-42) und (1-43) verringern die Menge des im Medium verfügbaren ApoEs in einem erheblichen Maße.

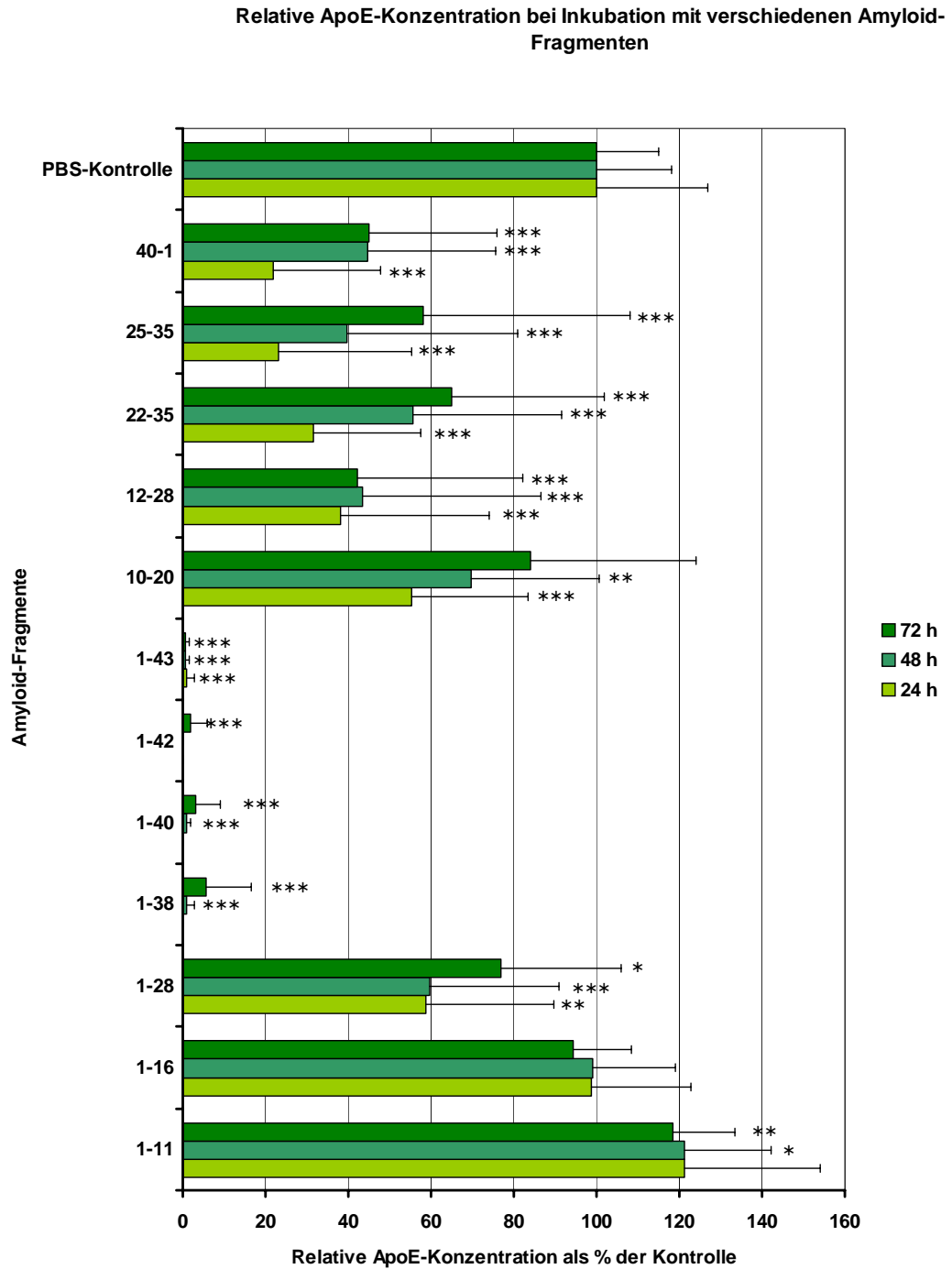


Abbildung 21: ApoE-Konzentrationen (in % des PBS-Kontrollwerts) im Medium von Astrozyten, die über einen Zeitraum von 72 h mit verschiedenen Amyloid-Fragmenten (10 µM) inkubiert wurden. ApoE-Konzentrationen, ausgedrückt in Prozent des PBS-Kontrollwerts zu den jeweiligen Messzeitpunkten (24, 48 und 72 h), sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Dabei wurde die gemessene ApoE-Konzentration des PBS-Kontrollwerts zum jeweiligen Messzeitpunkt als 100 % definiert. Die Zahl der Experimente war n = 9 für β/A4(1-11), (1-28) und (1-38); n = 12 für β/A4(1-16), (1-40), (1-42), (10-20) und (40-1); n = 15 für β/A4(1-43), (12-28) und (22-35); n = 18 für β/A4(25-35) sowie n = 24 für die PBS-Kontrolle. Die Berechnung der statistischen Signifikanzen erfolgte über einen zweiseitigen T-Test (Student) mittels STATVIEW. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ bezogen auf die PBS-Kontrollwerte (siehe Anhang Tabelle 21). Da die ApoE-Menge der Inkubationen mit β/A4(1-38), (1-40) und (1-42) zum Zeitpunkt 24 h und mit β/A4(1-42) zum Zeitpunkt 48 h unterhalb der Nachweisgrenze des ELISAs lag, sind auch diese Werte signifikant von der PBS-Kontrolle verschieden.

4.5.4 Wirkung der verschiedenen Amyloid-Fragmente auf die ApoE-Konzentrationen in konditioniertem Medium ohne Zellen

Die nicht oder nur im geringen Maße nachweisbaren ApoE-Konzentrationen im Medium von Astrozyten, die mit 10 µM verschiedener Amyloid-Fragmente inkubiert worden waren (siehe 4.5.3), können durch eine verringerte ApoE-Sekretion der Zellen und/oder einer Bindung des in das Medium abgegebenen ApoEs an das Amyloid hervorgerufen werden. Um zu überprüfen, ob und in welchem Ausmaß sekretiertes ApoE von den Amyloiden gebunden werden kann, wurde Medium, welches für drei Tage von den Astrozyten konditioniert worden war, von den Zellen abgezogen und ohne Zellen *in vitro* mit verschiedenen gealterten Amyloiden inkubiert. Da die Fragmente β/A4(1-11), (1-16) und (10-20) nur unerhebliche Wirkung auf die Verfügbarkeit von ApoE im Medium hatten, wurde in diesem Experiment auf sie verzichtet.

Nach der *in vitro* Inkubation war bei keinem der Amyloid-Fragmente eine Steigerung der ApoE-Konzentration über die Werte der PBS-Kontrolle (als 100 % definiert) zu beobachten. Im Vergleich zu der PBS-Kontrolle geringfügig niedrigere ApoE-Konzentrationen waren bei β/A4(1-28) und der reversen Sequenz β/A4(40-1) zu sehen (86 % und 93 % des Kontrollwerts, siehe Abbildung 22). Dagegen reduzierten die Amyloid-Fragmente β/A4(1-38), (1-40), (1-42) und (1-43) die gemessenen ApoE-Konzentrationen auf einen nicht mehr nachweisbaren Wert (Nachweisgrenze des ApoE-ELISAs: 0,25 nM). Inkubationen mit den Fragmenten β/A4(12-28), (22-35) und (25-35) führten mit 37, 15 und 70 % des PBS-Kontrollwerts, zu ApoE-Konzentrationen im Medium die zwischen dem PBS-Kontrollwert und denen der langen Amyloiden lagen (siehe Abbildung 22).

ApoE-Konzentration in konditioniertem Medium nach zellfreier Inkubation mit Amyloid-Fragmenten

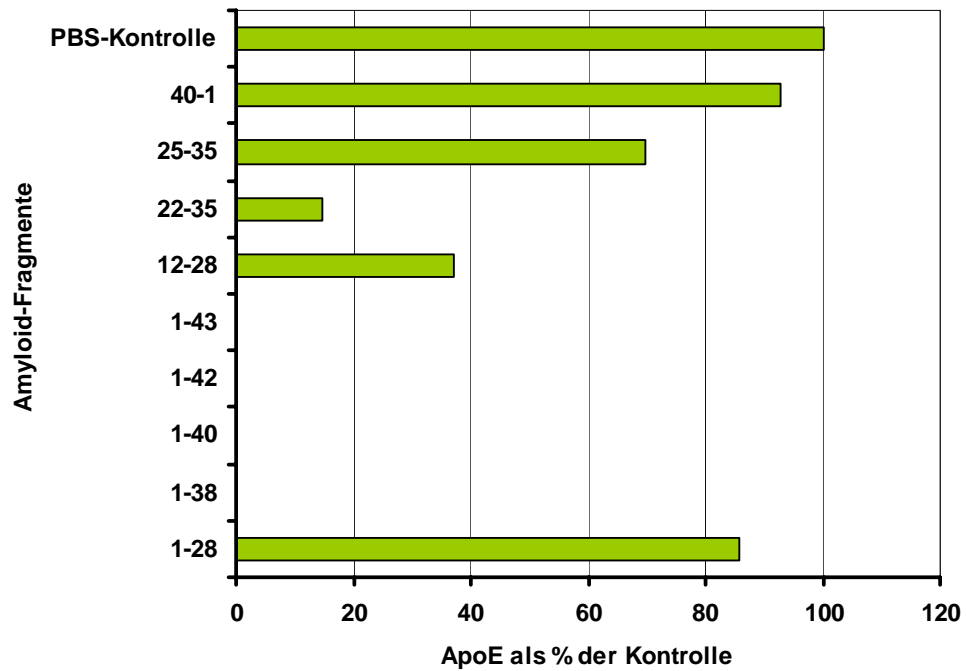


Abbildung 22: Gemessene ApoE-Konzentrationen (als % des PBS-Kontrollwerts) nach 72 h Inkubation von konditioniertem Astrozyten-Medium mit verschiedenen Amyloid-Fragmenten (10 μ M) unter zellfreien Bedingungen. Zahl der Experimente für alle Amyloide und die PBS-Kontrolle: n = 2.

Vergleicht man die zellfreie Amyloid-Inkubation des im Vorfeld konditionierten Mediums (4.5.4) mit der Amyloid-Inkubation in Gegenwart der Astrozyten (4.5.3) bezüglich der Konzentration frei verfügbaren ApoEs im Medium, so stellt man Folgendes fest (siehe Tabelle 5):

| Amyloid-Fragmente | frei im Medium verfügbares ApoE in zellfreier Amyloid-Inkubation des im Vorfeld konditionierten Mediums (4.5.4) =: <i>in vitro</i> ApoE [% der PBS-Kontrolle] | frei im Medium verfügbares ApoE der Amyloid-Inkubation in Gegenwart der Astrozyten (4.5.3) =: <i>in vivo</i> ApoE [% der PBS-Kontrolle] ± Standardabweichung |
|--------------------------|--|--|
| (1-28) | 86 | 77 ± 29 |
| (1-38) | 0 | 6 ± 11 |
| (1-40) | 0 | 3 ± 6 |
| (1-42) | 0 | 2 ± 4 |
| (1-43) | 0 | 1 ± 1 |
| (12-28) | 37 | 42 ± 40 |
| (22-35) | 15 | 65 ± 37 |
| (25-35) | 70 | 58 ± 50 |
| (40-1) | 93 | 45 ± 31 |
| PBS-Kontrolle | 100 | 100 ± 15 |

Tabelle 5: Vergleich der zellfreien Amyloid-Inkubation des im Vorfeld konditionierten Mediums (4.5.4, =: *in vitro*) mit der Amyloid-Inkubation in Gegenwart der Astrozyten (4.5.3, =: *in vivo*) bezüglich der Konzentration frei verfügbaren ApoEs im Medium zum Zeitpunkt 72 h.

Bis auf die Fragmente $\beta/A4(22-35)$ und $(40-1)$ liegt die Menge des im Medium frei verfügbaren ApoEs *in vitro* in etwa der gleichen Größenordnung vor wie *in vivo*. Bei $\beta/A4(22-35)$ ist die ApoE-Konzentration *in vitro* um 50 % niedriger als *in vivo*. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass ApoE in beiden Fällen vom Amyloid gebunden wird, *in vivo* allerdings stets neu produziert wird und trotz Bindung an das Amyloid in geringfügigen Mengen in das Medium gelangt. Bei $\beta/A4(40-1)$ ist die ApoE-Konzentration *in vitro* um 48 % höher als *in vivo*. Dies würde weniger auf eine Bindung des ApoE an das Amyloid sondern eher auf eine Herabregulierung der ApoE-Produktion hindeuten. Da der *in vitro*-Versuch lediglich zweimal durchgeführt wurde und hierfür keine Signifikanzen angegeben werden können diese Ergebnisse lediglich als Hinweis auf veränderte ApoE-Regulationsmechanismen gelten.

4.5.5 Immunzytochemischen Darstellung von ApoE und $\beta/A4(1-40)$

Um zu analysieren in welcher Art das hauptsächlich in den Amyloid-Plaques von AD-Gehirnen vorkommende $\beta/A4(1-40)$ ApoE bindet, wurden Astrozyten 72 h mit 10 μM des gealterten Amyloid-Fragments $\beta/A4(1-40)$ oder der Kontrolle (Medium mit PBS) inkubiert. Anschließend wurde mittels immunzytochemischer Darstellung ApoE und $\beta/A4(1-40)$ lokalisiert.

Die immunzytochemische Färbung der Zellen der PBS-Kontrolle für Amyloid (rot) zeigte keinerlei Markierung (siehe Abbildung 23, c). Die Färbung der Zellen für ApoE (grün) zeigte,

dass ApoE in konkret eingegrenzten Strukturen markiert wurde, die auf eine Gegenwart von ApoE in Vesikeln hinweisen (siehe Abbildung 23, c'). Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Beobachtungen, die davon ausgehen, dass zytoplasmatisches, freies ApoE sogar toxisch wäre [81]. Die perinukleare Lage der Vesikel-ähnlichen Strukturen deutete darauf hin, dass sich ApoE in Vesikeln des Golgi-Apparats befindet. Andererseits fanden sich Vesikel-förmige Strukturen auch in den sternförmigen Ausläufern der Astrozyten (siehe Abbildung 23, c').

Die Zellen der Inkubation mit dem gealterten Amyloid-Fragment $\beta/A4(1-40)$ (siehe Abbildung 23, Zellen a, a' und b, b') zeigten eine im Verhältnis zur PBS-Kontrolle reduzierte Fläche des Zellkörpers, wie sie in der Literatur für Astrozyten im aktivierten Zustand, z.B. nach Inkubation mit dBcAMP, beschrieben wird. Es zeigte sich, dass die Amyloid-Konglomerate in Schwaden locker auf den Zellen auflagen und nicht in die Zellen aufgenommen wurden. Die Verbindung zwischen den Amyloid-Konglomeraten und der Zelloberfläche war so intensiv, dass sich die Konglomerate nicht von den Zellen abgewaschen ließen (rot, siehe Abbildung 23, a, b). Die ApoE-Färbung zeigte bei Inkubation mit Amyloid im Vergleich zur PBS-Kontrolle eine Veränderung der Lokalisierung von ApoE (grün, siehe Abbildung 23, a', b'). Bei den mit Amyloid inkubierten Astrozyten zeigten weniger Zellen die Färbung von Vesikel-ähnlichen Strukturen als bei den Astrozyten der PBS-Kontrolle. Dies galt im gleichen Maße für die Vesikel-ähnlichen Strukturen die auf den Golgi-Apparat hindeuten, als auch für die in den Zellkörper-Ausläufern.

Um einen Gesamteindruck von der Lage der ApoE- und Amyloid-Markierung in den Zellen zu erhalten wurden je Zelle 20 Fokussierungsebenen übereinander gelegt (siehe Abbildung 23) und diese Gesamtdarstellungen der ApoE- und Amyloid-Markierung auf Übereinstimmungen in der Lage der Markierungen überprüft. Wurden bei der PBS-Kontrolle beide Markierungen übereinander gelegt (Abbildung 23, c'') konnte keine Doppelt-Markierung (gelb) sondern nur eine Markierung für ApoE (grün) festgestellt werden.

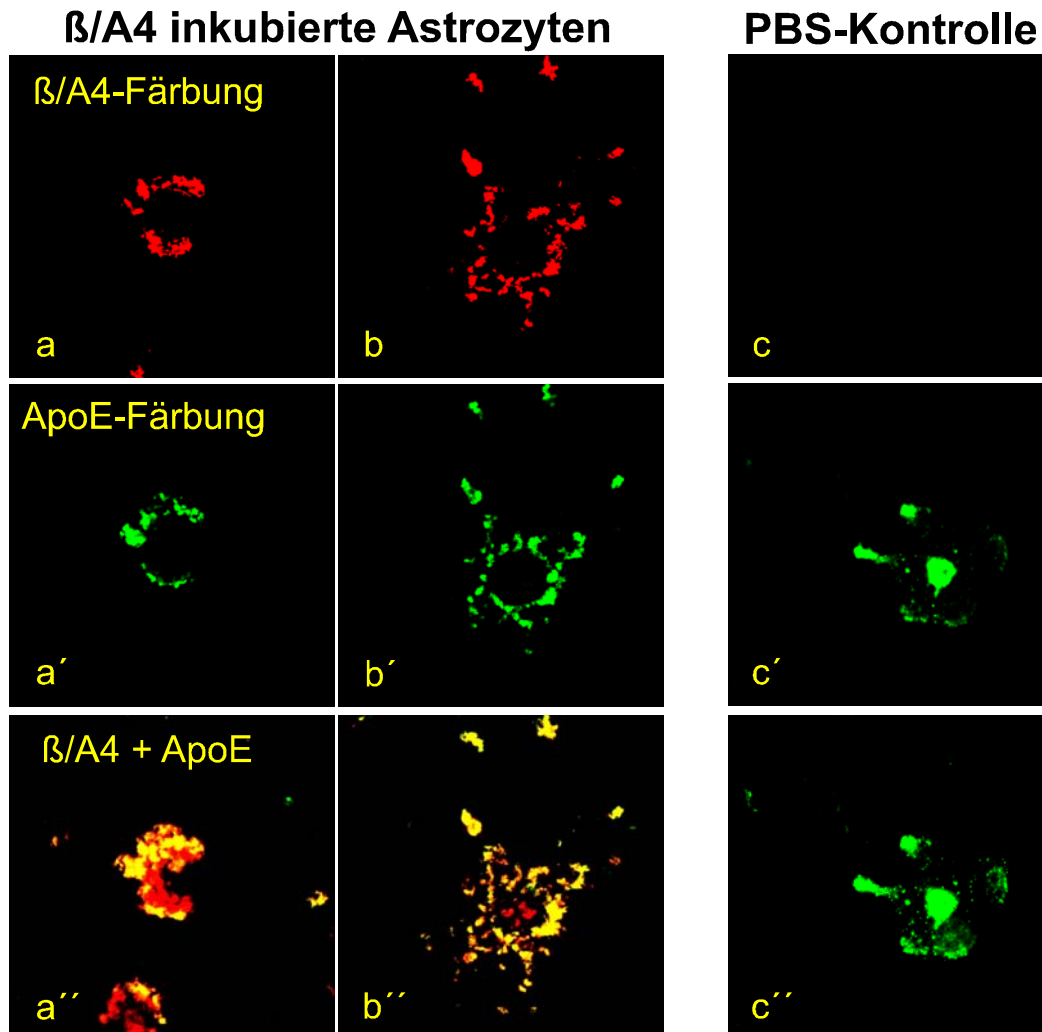


Abbildung 23: Immunzytochemische Färbung von β /A4(1-40) inkubierten Astrozyten und PBS-Kontrollen nach Inkubation über 72 h. Die Zellen a/a' und b/b' wurden mit 10 μ M β /A4(1-40) inkubiert, die Zelle c/c' stellt eine PBS-Kontrolle dar. a, b und c zeigen die Fluoreszenz der β /A4(1-40)-Färbung (rot), a', b' und c' zeigen die Fluoreszenz der ApoE-Färbung (grün). Die Aufnahmen zeigen Schnitte durch drei Astrozyten, wobei sich die gezeigten Fokussierungsebenen für die β /A4(1-40)- und ApoE-Färbung jeweils auf derselben Ebene befinden. a'', b'' und c'' zeigen die Übereinanderlagerung der Fluoreszenzen der β /A4(1-40)- und ApoE-Färbung (gelb). Die Aufnahmen zeigen 20 übereinander gelagerte Schnitte durch drei Astrozyten, wobei sich die gezeigten Fokussierungsebenen für die β /A4(1-40)- und ApoE-Färbung jeweils auf derselben Ebene befinden.

Die mit Amyloid inkubierten Zellen zeigten auch in dieser Darstellung die oben beschriebene Veränderung des Zellkörpers, wie sie in der Literatur für Astrozyten im aktivierten Zustand beschrieben wird. Die ApoE-Färbung zeigte, wie oben beschrieben, eine im Vergleich zur PBS-Kontrolle veränderte Lokalisierung von ApoE. Wurden die Markierungen für Amyloid (rot) und ApoE (grün) übereinander gelegt (gelb, Abbildung 23, a'' und b''), stimmte die Lage der ApoE-Markierung größtenteils mit der Lage der Amyloid-Markierung überein. Eine alleinige ApoE-Markierung in Vesikel-ähnlichen Strukturen in Amyloid-inkubierten Zellen war seltener zu beobachten, als in den Zellen der PBS-Kontrolle. Dagegen waren größere Areale mit alleiniger

Amyloid-Markierung (rot) zu finden.

Hieraus kann abgeleitet werden, dass die Astrozyten bei Inkubation mit $\beta/A4(1-40)$ ApoE produzieren, der Hauptanteil allerdings von den Amyloid-Konglomeraten gebunden wird und somit nur sehr geringe Konzentrationen von ApoE im Medium der Zellen frei verfügbar ist. Eine Aussage darüber, ob die ApoE-Sekretion durch die Inkubation herauf- oder herabreguliert wird lässt sich mit diesem Versuchsaufbau nicht beurteilen.

4.5.6 ApoE in Astrozyten-Lysat-Fractionen von $\beta/A4(1-40)$ -Inkubation und PBS-Kontrolle

Um herauszufinden, ob die nicht oder fast nicht mehr messbare Menge freien ApoEs im Medium von Inkubation der Astrozyten mit $10 \mu\text{M}$ $\beta/A4(1-40)$ in einer spezifischen Herabregulierung der ApoE-Produktion begründet liegt oder lediglich durch eine Bindung des ApoE an das Amyloid bedingt ist, wurden mit $\beta/A4(1-40)$ und PBS inkubierte Astrozyten fraktioniert und die Fraktionen auf ihren Gehalt an ApoE im Western Blot untersucht.

Analysierte man die zwei Medium-Fractionen Pellet und Überstand (siehe Abbildung 24), so konnte man im Pellet der PBS-Kontrolle kein ApoE nachweisen, während der Überstand große Mengen ApoE enthält. Im Gegensatz dazu wies das Medium-Pellet der $\beta/A4(1-40)$ inkubierten Astrozyten in hohem Maße ApoE auf, der Medium-Überstand enthielt jedoch kein ApoE. Das Medium-Pellet bestand zum größten Teil aus Amyloid-Konglomeraten. Die Ergebnisse der ApoE Bestimmung des Überstandes im Western Blot wurden vom ApoE-ELISA bestätigt.

Verglich man den ApoE-Gehalt der Zytosol-Fractionen, so konnte ApoE hier weder bei der PBS-Kontrolle noch bei den $\beta/A4(1-40)$ inkubierte Astrozyten nachgewiesen werden. Letzteres steht in Übereinstimmung mit der Literatur [81]. In den Debris-Fractionen fand sich ApoE sowohl bei der PBS-Kontrolle als auch bei den $\beta/A4(1-40)$ inkubierten Astrozyten, wobei die Menge an ApoE in der $\beta/A4(1-40)$ -Debris-Fraktion um ein Vielfaches höher war. Dies war zu erwarten, da in dieser Fraktion auch Amyloid enthalten ist, welches an den Zellmembranen anhaftet und in großer Menge ApoE bindet (siehe 4.5.5).

In der Vesikel-Fraktion der $\beta/A4(1-40)$ -inkubierten Astrozyten und der PBS-Kontrolle wurden nur geringe Mengen ApoEs gefunden, hierbei allerdings in der Amyloid-Vesikel-Fraktion etwas mehr als in der Kontrolle.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Astrozyten, die mit $\beta/A4(1-40)$ inkubiert worden waren, in der Lage waren ApoE zu produzieren, da das Zellmedium zu Beginn der Inkubation kein ApoE enthält, sich im Verlauf der 72 h Inkubationsdauer aber im PBS-Medium-Überstand und in den Konglomeraten des Amyloid-Medium-Pellets anreichert. Da die Vesikel-Fraktion der Astrozyten in der Inkubation mit $\beta/A4(1-40)$ mehr ApoE enthielt als die der PBS-Kontrolle, scheinen die Zellen der Amyloid-Inkubation auf den Mangel an ApoE im Medium mit einer Heraufregulierung der ApoE-Produktion zu antworten.

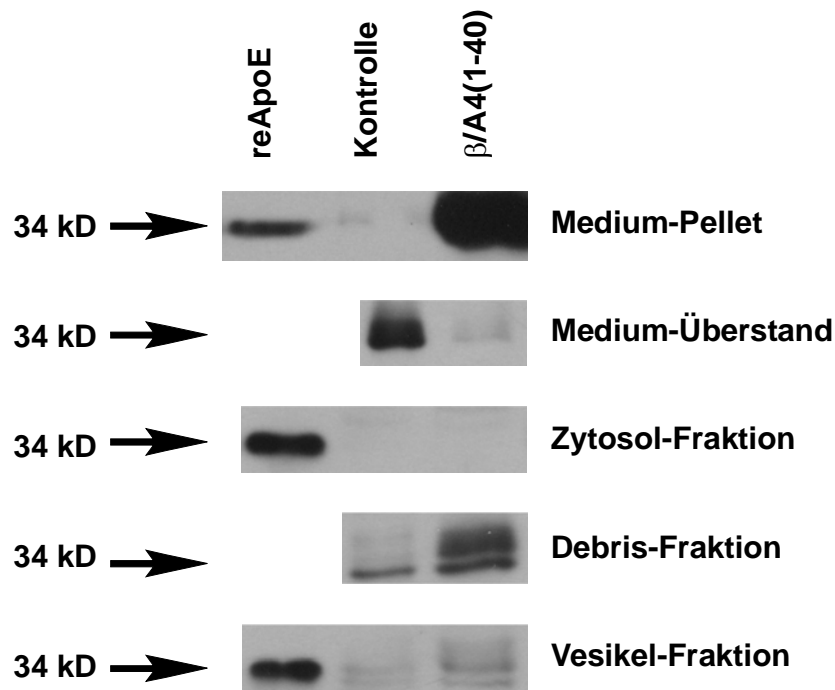


Abbildung 24: ApoE im Western Blot der Medium- und Zellfraktionen von PBS-Kontrolle und $\beta/A4(1-40)$ inkubierten Astrozyten. In der Pellet-Fraktion des Mediums konnte ApoE nur in den $\beta/A4(1-40)$ Inkubationen beobachtet werden. Im Überstand des Mediums dagegen fand man ApoE nur in der PBS-Kontrolle. In der Zytosol-Fraktion zeigte sich ApoE in keiner der Zellkulturen. In der Debris-Fraktion des Zellmaterials wurde ApoE sowohl in PBS-Kontrolle als auch in besonders großem Maße in $\beta/A4(1-40)$ inkubierten Astrozyten gefunden. In der Vesikel-Fraktion konnte ApoE in geringen Mengen sowohl in der PBS-Kontrolle als auch den $\beta/A4(1-40)$ inkubierten Astrozyten nachgewiesen werden, wobei letztere Fraktion geringfügig mehr ApoE als die Kontrolle enthielt. reApoE = 1,5 ng rekombinantes humanes ApoE3.

4.5.7 Wirkung des Amyloids $\beta/A4(1-40)$ auf die Regulation anderer Proteine der Astrozyten

Um herauszufinden, ob die Heraufregulierung des ApoEs in Astrozyten, die mit 10 μM $\beta/A4(1-40)$ inkubiert worden waren, spezifisch oder Folge eine generelle Veränderung der Proteinproduktion war, wurden die Lysat-Fraktionen des unter 4.5.6 geschilderten ApoE-Western Blots auf ihren Gehalt an NGF untersucht. Außerdem wurde die Menge des basischen Fibroblasten Wachstumsfaktors (basic fibroblast growth factor, bFGF) im Verhältnis zur PBS-Kontrolle einer weiteren Inkubation mit $\beta/A4(1-40)$ mittels Fluoreszenz-Intensitätsmessung nach immunzytochemischer Darstellung analysiert.

4.5.7.1 ApoE- und NGF-Gehalt von Astrozyten-Fraktionen

Für die NGF-Messungen wurden die Lysatfraktionen des unter 4.5.6 geschilderten Versuchs verwendet. Da sich im ApoE-ELISA die Detergenz-Spuren der Lysatfraktionen als störend erwiesen, musste für die Analyse auf die ApoE-Western Blot-Technik zurückgegriffen werden.

Der NGF-ELISA hingegen tolerierte Detergenz-Spuren. Da die NGF-Messungen von R. Hellweg routinemäßig als ELISA durchgeführt werden, wurden für die Untersuchung von ApoE und NGF verschiedene Methoden verwendet. Mangels Masse musste bei der NGF-Analyse auf die Fraktion Medium-Pellet verzichtet werden.

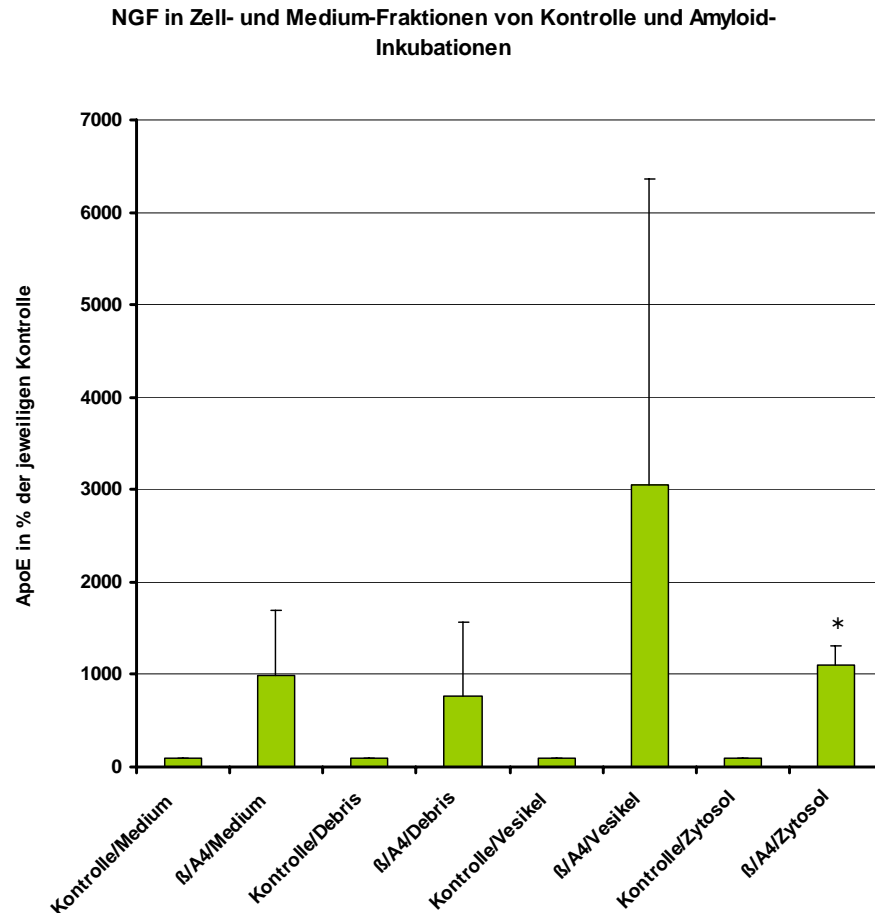


Abbildung 25: NGF-Konzentrationen (in % der PBS-Kontrolle der jeweiligen Fraktion) gemessen in Zell- und Medium-Fractionen von Zellen die über einen Zeitraum von 72 h mit der PBS-Kontrolle oder 10 µM β/A4(1-40) inkubiert worden waren. NGF-Konzentrationen, ausgedrückt in Prozent der PBS-Kontrollinkubationen zum Messzeitpunkt 72 h, sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Dabei wird die gemessene NGF-Konzentration einer jeden Fraktion der PBS-Kontrolle als 100 % definiert. Die Zahl der Experimente war n = 3. Die Berechnung der statistischen Signifikanzen erfolgte über einen zweiseitigen T-Test (Student) mittels STATVIEW. *P < 0,05 bezogen auf die NGF-Werte der PBS-Kontrolle.

In den untersuchten Fraktionen (Medium-Überstand-, Debris-, Zytosol- und Vesikel-) wurde NGF gefunden. Bezogen auf die jeweiligen NGF-Mengen der entsprechenden Fraktionen der PBS-Kontroll-Inkubation, waren die NGF-Werte der $\beta/A4(1-40)$ -Inkubations-Fractionen im Vergleich zur PBS-Kontrolle um den Faktor 8- bis 30-fach erhöht (siehe Abbildung 25). Im Detail entsprachen bei der NGF-Messung den als 100 % definierten Mengen der entsprechenden PBS-Kontroll-Fractionen, 984 % der Medium-Überstand-Fraktion, 764 % der Debris-Fraktion, 3054 % der Vesikel-Fraktion und 1111 % der Zytosol-Fraktion der $\beta/A4(1-40)$ -Inkubation. Die gemessenen NGF-Werte in pg/ml der drei unabhängigen Versuche sind im Anhang in 8.13 angegeben.

Betrachtet man Wirkung von $\beta/A4(1-40)$ auf die ApoE- und NGF-Entwicklung in Medien und Zellfraktionen, so stellt man Folgendes fest (Tabelle 6). Im Überstand des Mediums fanden sich in der Kontrolle große Mengen ApoE, nicht hingegen in dem Überstand des Mediums der $\beta/A4(1-40)$ -Inkubation. NGF war im Überstand der Kontrolle nur in geringen Mengen, in dem der $\beta/A4(1-40)$ -Inkubation dagegen in sehr großen Mengen (984 % des Kontrollwerts) vorhanden. Betrachtete man die Debris-Fraktion, so konnte ApoE in der Kontrolle in geringen Mengen, in der $\beta/A4(1-40)$ -Inkubation hingegen in sehr großen Mengen nachgewiesen werden. Dies galt in der Debris-Fraktion in gleicher Weise für das NGF (in der $\beta/A4(1-40)$ -Inkubation 764 % des Kontrollwerts). Im Zytosol konnte sowohl für Kontrolle als auch für $\beta/A4(1-40)$ -Inkubation kein ApoE gefunden werden, NGF war in der Kontrolle in geringen, in der $\beta/A4(1-40)$ -Inkubation dagegen in großen Mengen (1111 % des Kontrollwerts) vorhanden. Bezüglich der Vesikel-Fraktion konnte wenig ApoE in der Kontrolle, etwas mehr in der $\beta/A4(1-40)$ -Inkubation nachgewiesen werden. NGF war in der Vesikel-Fraktion der Kontrolle zwar auch vorhanden, in der $\beta/A4(1-40)$ -Inkubation wurde allerdings ein Vielfaches des Kontrollwerts gefunden (3054 %).

| Lysatfraktionen | ApoE | NGF |
|------------------|------|------|
| Medium-Pellet | ↑ | n.g. |
| Medium-Überstand | ↓ | ↑ |
| Debris | ↑ | ↑ |
| Zytosol | - | ↑ |
| Vesikel | ↑ | ↑ |

Tabelle 6: Wirkung von $\beta/A4(1-40)$ auf den Gehalt von ApoE und NGF in Medium und Zellfraktionen. Inkubierte Zellen und das entsprechende Inkubationsmedium wurden nach Inkubation mit PBS als Kontrolle oder $\beta/A4(1-40)$ fraktioniert und die Fraktionen auf ihren ApoE- sowie NGF-Gehalt hin untersucht. ↑: starke Zunahme im Verhältnis zur PBS-Kontrolle, ↓: starke Abnahme im Verhältnis zur PBS-Kontrolle, ↑: leichte Zunahme im Verhältnis zur PBS-Kontrolle. n.g.: nicht gemessen.

Obwohl die Ergebnisse des Medium-Überstands vordergründig auf eine unterschiedliche Regulierung von ApoE und NGF hindeuten, sind die Unterschiede wahrscheinlich darin begründet, dass das Amyloid das produzierte ApoE bindet und somit zwar in großen Mengen ApoE produziert werden kann, dies sich aber bis zur Absättigung der ApoE-Bindungsstellen des

Amyloids nicht im Medium bemerkbar machen würde. NGF wird nicht in diesem Maße an das Amyloid gebunden und kann damit ungehindert in das Medium diffundieren. Das unterschiedliche Ergebnis bezüglich der Zytosol-Fraktion liegt darin begründet, dass NGF im Zytosol vorkommt, ApoE hingegen nicht. Ob die Analyse dieser Fraktion einen Hinweis auf die Regulation der Proteine bringt ist deshalb fraglich. Da lange nicht bekannt war, ob ApoE zytosolisch vorkommt oder nicht, schien es zum Zeitpunkt der Experimente trotzdem geraten auch diese Fraktion zu untersuchen.

Zusammengenommen muss auch für NGF vermutet werden, dass seine Produktion durch die Anwesenheit von Amyloid stark heraufreguliert wird. NGF eignet sich deshalb nicht als Referenzmolekül für den Nachweis, ob Amyloid die ApoE-Produktion spezifisch oder die Protein-Produktion generell heraufreguliert.

4.5.7.2 bFGF-Gehalt von $\beta/A4(1-40)$ inkubierten Astrozyten

Da NGF sich nicht als Referenzmolekül für den Nachweis eignete, ob Amyloid die ApoE-Produktion spezifisch oder die Protein-Produktion generell heraufreguliert, wurde ein weiteres Molekül – der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor, bFGF) -, von dem bekannt ist, dass es in Astrozyten vorhanden ist, bezüglich der Wirkung von $\beta/A4(1-40)$ auf seine Produktion untersucht. Die Menge des bFGF der Inkubation mit $\beta/A4(1-40)$ (72 Arbeitseinheiten) war laut Fluoreszenz-Intensitätenmessung nicht signifikant von der PBS-Kontrolle (53 Arbeitseinheiten) verschieden.

bFGF Immunfluoreszenz in Astrozyten

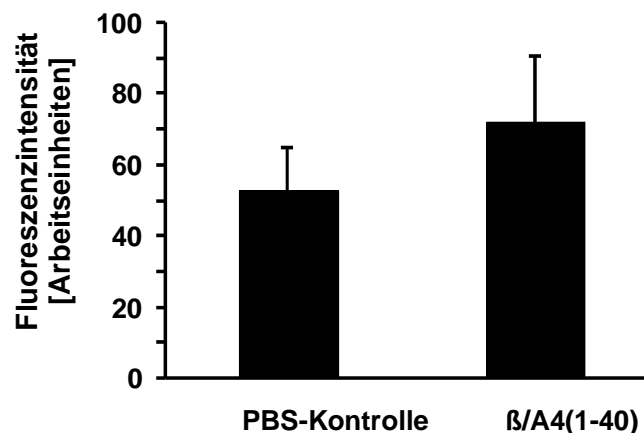


Abbildung 26: Fluoreszenzintensitäten bei immunzytochemischer Darstellung von bFGF bei PBS-Kontrolle und $\beta/A4(1-40)$ inkubierten Astrozyten. Um interexperimentelle Abweichungen zu vermeiden wurden alle Experimente ($n = 9$) in einem Arbeitsgang auf ihre Fluoreszenzintensität untersucht. Die Skala der Arbeitseinheiten geht von Null (gar keine Fluoreszenz) bis 100 (alles überstrahlende Fluoreszenz).

Da hier die Heraufregulierung des bFGF ausbleibt, kann dieses Ergebnis als Hinweis darauf gedeutet werden, dass die ApoE-Expression spezifisch von $\beta/A4(1-40)$ heraufreguliert wird. Es steht im Gegensatz zur einer Veröffentlichung in der allerdings ein anderes Amyloid-Fragment

($\beta/A4(1-42)$) und andere Kulturverhältnisse Verwendung fanden [82]. Um die Frage abschließend zu klären wären also weitere Untersuchungen notwendig.

4.5.8 Wirkung von $\beta/A4(1-40)$ auf den Golgi-Apparat

Da die Immunzytochemische Färbung für ApoE und Amyloid des in 4.5.5 geschilderten Versuchs auf eine Veränderung der intrazellulären ApoE-markierten Strukturen bei Inkubation mit Amyloid hindeuten, wurde untersucht, ob dies mit einer Veränderung des Golgi-Apparats einhergeht. Die Färbung des Golgi-Apparats von PBS-Kontrolle und $\beta/A4(1-40)$ inkubierten Astrozyten mit NBD C₆-Ceramide zeigte deutlich, dass Inkubationen mit $\beta/A4(1-40)$ über einen Zeitraum von 72 h die Strukturen des Golgi-Apparats nicht beeinflussen (siehe Abbildung 27).

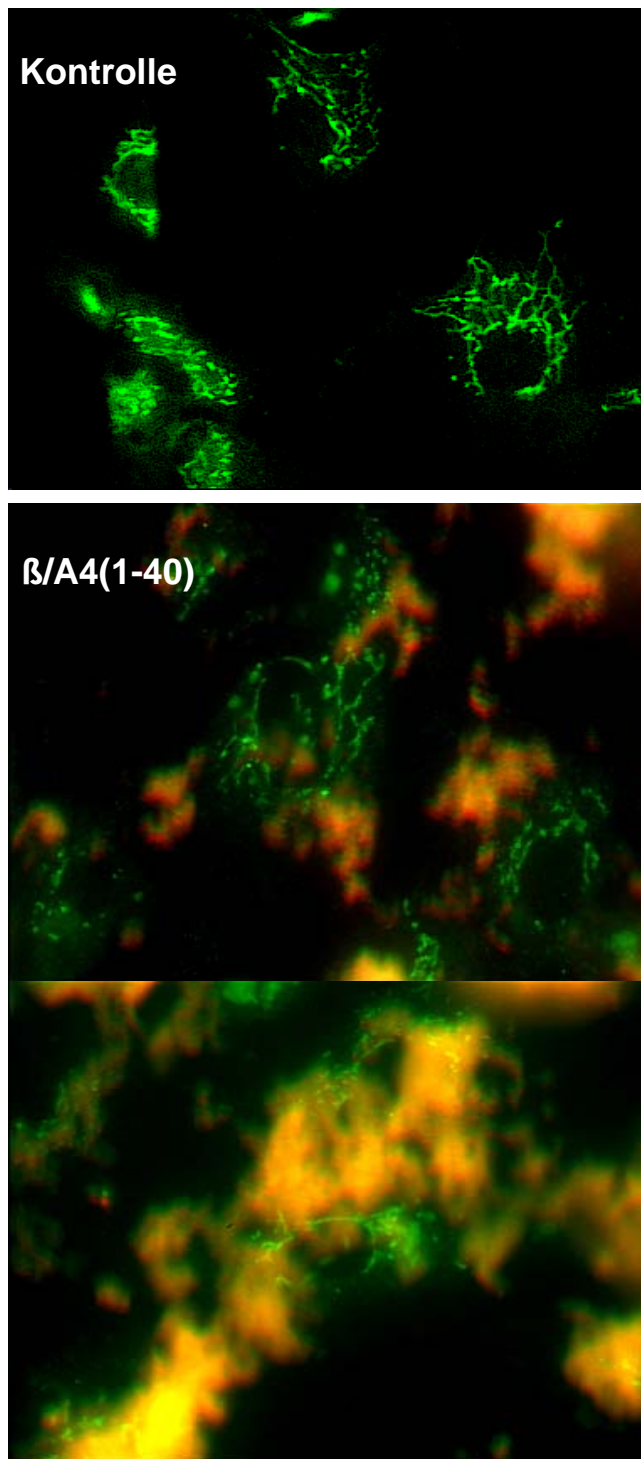


Abbildung 27: Wirkung von $\beta/A4(1-40)$ auf den Golgi-Apparat nach einem Zeitraum von 72 h. Wurden PBS-Kontrolle und $\beta/A4(1-40)$ inkubierten Astrozyten mit NBD C_6 -Ceramide gefärbt, zeigte sich, dass der Golgi-Apparat (grün) durch die Inkubation mit Amyloid (gelb bis gelbrot) nicht in seiner Struktur verändert wird. Die extrazellulären Amyloid-Konglomerate liegen in Schwaden auf den Zellen, sind mit diesen allerdings so innig verbunden, dass sie sich nicht abspülen lassen.

4.5.9 Wirkung der verschiedenen Amyloid-Fragmente auf die intrazelluläre Calcium-Homöostase

Wie cAMP ist intrazelluläres Ca^{2+} ein Second Messenger. GFAP-Immunfärbung (siehe Abbildung 19) und S100 β -Immunfärbung (siehe Abbildung 20) zeigten in Gegenwart von $\beta/\text{A4}(1-40)$, (1-42), (1-43), (10-20) und (25-35) aktivierte Astrozyten. Von S100 β ist bekannt, dass es zu einem Ansteigen der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) führt [83]. Es wurde gezeigt, dass IP_3 eine Ca^{2+} -Mobilisierung von vesikulären Speichern verursachen kann, die zu einem Ansteigen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt [84]. Wie oben gezeigt inhibierte Carbachol signifikant die ApoE-Sekretion in Astrozytenkulturen (siehe 4.2.6). Carbachol aktiviert alle muscarinischen Rezeptoren einschließlich derer, die die PLC stimulieren und derer, die die Adenylatcyclase inhibieren. Eine Aktivierung der PLC führt zur Spaltung von PIP_2 und in Folge dessen zur Produktion von DAG und IP_3 . IP_3 wiederum könnte mittels seines Einflusses auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die ApoE-Sekretion beeinflussen. Dass Amyloid einen Einfluss auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hat kann man der prominenten S100 β -Immunfärbung der Amyloid-inkubierten Astrozyten entnehmen. Wie in 4.5.3 gezeigt führt die Inkubation mit Amyloid-Fragmenten $\beta/\text{A4}(1-38)$, (1-40), (1-42) und (1-43) zu einer nicht mehr oder fast nicht mehr messbaren Konzentration von ApoE im Medium während $\beta/\text{A4}(1-28)$, (10-20), (12-28), (22-35) und (25-35) die Konzentration von ApoE im Medium stark eingeschränkten. Um zu überprüfen, ob und wie ausgeprägt diese Fragmente einen Einfluss auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ haben, wurde nach der Inkubation von 72 h eine $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messung mittels Fura-2 durchgeführt.

Von den zwölf getesteten synthetischen $\beta/\text{A4}$ -Fragmenten zeigten nur fünf statistisch signifikante Effekte auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [69]. Die Peptide $\beta/\text{A4}(1-40)$, (1-42), (1-43), (10-20) und (25-35) senkten die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um 26, 20, 17, 25 und 24 % respektive des PBS-Kontrollwerts. Keines der untersuchten Fragmente erhöhte in den Astrozyten die Calcium-Konzentration.

Im Gegensatz dazu verursachten dieselben Fragmente, die bei Astrozyten zu einem Absinken der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ geführt hatten, bei Neuronen derselben Präparation einen signifikant messbaren Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die Inkubation der Astrozyten mit dBcAMP senkte die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signifikant (persönliche Beobachtung von V. Meske). Unterschiede zeigten sich im zeitlichen Verlauf der Wirkung von dBcAMP und den Amyloid-Fragmenten. Sowohl die Veränderung der äußeren Form von Pfannkuchen-artig flach zu sternförmig aktiviert (dBcAMP nach 6 h, Amyloid-Fragmente nach 24 h) als auch die Senkung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erfolgte bei dBcAMP (innerhalb 24 h) früher als bei den Fragmenten (nicht vor 48 h).

[Ca²⁺]_i-Konzentration hippocampaler Astrozyten nach 72 h Amyloid-Inkubation

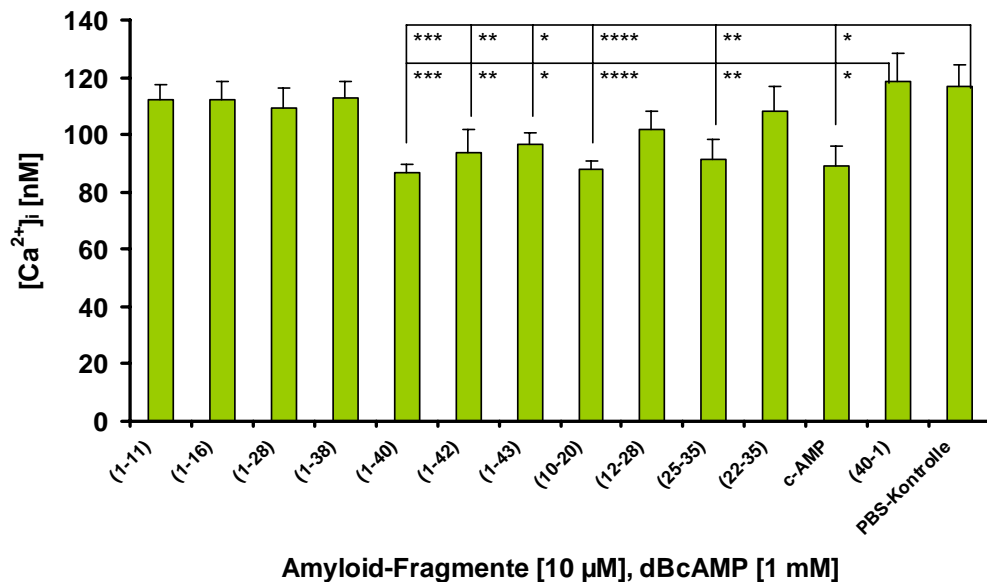


Abbildung 28: Intrazelluläre Calcium-Konzentrationen von Astrozyten nach 72 h Inkubation mit verschiedenen Amyloid-Fragmenten, dBcAMP und PBS-Puffer (Kontrolle). Inkubation mit den Fragmenten $\beta/A4(1-40)$, $(1-42)$, $(1-43)$, $(10-20)$ und $(25-35)$, sowie die Inkubation mit dBcAMP führten zu einem signifikanten Sinken der intrazellulären Calcium-Konzentration im Vergleich zu den Zellen, die mit der reversen Amyloid-Sequenz $\beta/A4(40-1)$ oder der PBS-Kontrolle allein inkubiert worden waren. * $P < 0,05$, ** $P < 0,02$, *** $P < 0,01$ und **** $P < 0,002$. Die Berechnung der statistischen Signifikanzen erfolgte über einen zweiseitigen T-Test (Student) mittels STATVIEW. $n = 2$ für dBcAMP, 350 Zellen wurden analysiert. $n = 5$ für die Fragmente $\beta/A4(1-40)$, $(1-43)$, $(10-20)$, $(12-28)$ und $(25-35)$, für jedes Fragment wurden 2000 Zellen analysiert. $n = 6$ für die Fragmente $\beta/A4(1-11)$, $(1-16)$, $(1-28)$, $(1-38)$, $(22-35)$ und $(40-1)$, für jedes Fragment wurden 2400 Zellen analysiert. $n = 12$ für $\beta/A4(1-42)$, es wurden 4800 Zellen analysiert. $n = 15$ für die PBS-Kontrolle, es wurden 6800 Zellen analysiert.

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse:

Im Rahmen dieser Arbeit wurde an Primärzellkulturen von hippocampalen Astrozyten aus der Ratte die Wirkung verschiedener Substanzen auf die Regulation und Verfügbarkeit von Apolipoprotein E im Gehirn untersucht. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

4.6.1 Einfluss des Adenylatcyclase/PKA-Pfads sowie des PLC/PKC-Pfads auf die ApoE-Sekretion

Besonderes Interesse galt Substanzen, von denen bekannt ist, dass sie wichtige Second Messenger-Pfade beeinflussen. Es wurde untersucht in wieweit Substanzen, die auf die Adenylatcyclase einerseits über β -Adrenorezeptor-Stimulation andererseits über

α 2-Adrenorezeptor-Inhibierung einen Einfluss auf die ApoE-Sekretion ausüben. Desweiteren wurden Substanzen die den Phosphoinositol-Hydrolyse-Weg beeinflussen bezüglich der ApoE-Sekretion und -mRNA-Expression untersucht. Hierzu wurde auch geprüft, ob die Reaktionen auf die Substanzen spezifisch für ApoE sind. Es wurde Folgendes beobachtet:

- Der intrazelluläre cAMP-Spiegel ist ein wichtiger Regulator der ApoE-Sekretion in Astrozyten. dBcAMP stimuliert die ApoE-Sekretion in Astrozyten zeit- und dosisabhängig. Retinolsäure allein kann die ApoE-Sekretion nicht beeinflussen, potenziert dagegen den von dBcAMP hervorgerufenen Effekt. Der dBcAMP-vermittelten Erhöhung der ApoE-Sekretion geht eine Erhöhung der ApoE-mRNA-Expression zeitlich vorweg. RA hat keinen Einfluss auf die ApoE-Sekretion, die ApoE-mRNA-Expression erhöht sich dagegen zum Zeitpunkt 6 h. Obwohl RA den dBcAMP-vermittelten Anstieg der ApoE-Sekretion potenziert, verändert sich bei kombinierter Inkubation die ApoE-mRNA-Expression nicht signifikant.
- Der β -Adrenorezeptor Agonist Isoproterenol erhöht und der α 2-Adrenorezeptor Agonist Clonidine verringert die ApoE-Sekretion. Dies ist wahrscheinlich auf die jeweilige Erhöhung oder Verringerung der cAMP-Produktion zurückzuführen.
- Die mit PMA induzierte PKC-Aktivierung verringert die ApoE-Sekretion konzentrations- und zeitabhängig. Außerdem verhindert die Zugabe von PMA den dBcAMP-vermittelten Anstieg der ApoE-Sekretion. Diesem Vorgang geht zeitlich eine Verringerung der ApoE-mRNA-Expression vorweg.
- In niedrigen Konzentrationen (1 μ M Arterenol und 2,5 μ M Serotonin) erhöhen Arterenol und Serotonin kurzfristig (nach 5 h) die ApoE-Sekretion. Bei höheren Arterenol-Konzentrationen (10 und 100 μ M) unterscheiden sich die ApoE-Konzentrationen zu keinem Zeitpunkt signifikant von der PBS-Kontrolle. Arterenol ist ein catecholamines Neurohormon, welches stärker an α 1-adrenerge Rezeptoren als an β -adrenerge bindet. In der eingesetzten Konzentration (10 μ M) gilt es als spezifischer α 1-Adrenorezeptor Agonist, der die PLC-vermittelte Hydrolyse von Phosphoinositiden in Astrozyten aktiviert. Dagegen aktiviert Serotonin alle Serotonin-Rezeptor-Subtypen einschließlich der an PLC gebundenen als auch der 5-HT6 und 5-HT7 Subtypen, die die intrazelluläre cAMP-Akkumulation in Astrozyten stimulieren.
- Carbachol aktiviert alle muskarinischen Rezeptor-Subtypen einschließlich der PLC stimulierenden und der Adenylatcyclase inhibierenden. Deshalb ist die Carbachol-induzierte Hemmung der ApoE-Sekretion in Übereinstimmung mit den Effekten, die bei Inkubation mit PMA und dBcAMP auftreten.
- Quantitative Untersuchungen der Kulturen auf NGF-Sekretion legen nahe, dass die Wirkungen der Substanzen auf die ApoE-Sekretion spezifisch und nicht die Konsequenz einer generellen tropischen Aktion sind. Im Gegensatz zu ApoE erhöht eine Aktivierung der PKC durch PMA die NGF-Sekretion. dBcAMP und Isoproterenol

haben gegensätzliche Effekte auf die Regulation von NGF- und ApoE-Sekretion.

| Substanz | Charakter/Wirkungsweise | „Second Messenger“ Pfad | Wirkung auf ApoE-Produktion |
|--|---|-------------------------|-----------------------------|
| Dibutyryl-cAMP (dBcAMP) | Zellpermeables cAMP-Analogon, aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA). | cAMP/PKA | [ApoE] steigt |
| Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) | Diacylglycerol (DAG)-Analogon, aktiviert die Proteinkinase C (PKC) irreversibel | PLC/PKC | [ApoE] sinkt |
| all-trans-Retinolsäure (RA) | Ligand für Retinolsäure-Rezeptoren (RAR) und Retinoid X Rezeptoren (RXR). Die gebundenen RAR und RXR fungieren als Transkriptionsfaktoren | | [ApoE] bleibt unverändert |
| L-Arterenol | Catecholamines Neurohormon, bindet stärker an α 1-adrenerge Rezeptoren, als an β -adrenerge. | PLC/PKC | [ApoE] steigt |
| Clonidine | α 2-Adrenorezeptor-Agonist, Imidazoline Rezeptor (I1-R)-Agonist | cAMP/PKA | [ApoE] sinkt |
| Carbachol | Muscarinischer-Acetylcholin-Rezeptor-Agonist | PLC/PKC | [ApoE] sinkt |
| Isoproterenol | β -Adrenorezeptor-Agonist, erhöht zytosolisches cAMP | cAMP/PKA | [ApoE] steigt |
| Serotonin | Adrenerger Neurotransmitter und Hormon | PLC/PKC | [ApoE] steigt |

Tabelle 7: Zusammenfassung der verwendeten Rezeptor-Agonisten, Neurotransmitter, nuklearen Transkriptionsverstärker und Analoga, ihrer gebräuchlichen Synonyme, Wirkungsweisen allgemein und spezifisch bezüglich ihres Einfluss auf die Veränderung des ApoE im Kulturmedium der inkubierten Astrozyten.

| 1. Substanz | 2. Substanz | ApoE-Konzentration im Medium | ApoE-mRNA-Expression |
|-----------------------|--------------------|---|----------------------|
| dBcAMP (1 mM) | | steigt | steigt |
| | PMA (480 nM) | sinkt | sinkt |
| dBcAMP (1 mM) | PMA (480 nM) | sinkt | sinkt |
| dBcAMP (1 mM) | | steigt | steigt |
| | RA (1 µM) | bleibt unverändert | steigt |
| dBcAMP (1 mM) | RA (1 µM) | steigt (dBcAMP-Effekt wird potenziert) | bleibt unverändert |
| Isoproterenol (50 nM) | | steigt | |
| | Serotonin (2,5 µM) | bleibt unverändert | |
| Isoproterenol (50 nM) | Serotonin (2,5 µM) | steigt | |
| Isoproterenol (50 nM) | | steigt | |
| | Arterenol (10 µM) | bleibt unverändert | |
| Isoproterenol (50 nM) | Arterenol (10 µM) | steigt (Isoproterenol-Effekt wird potenziert) | |

Tabelle 8: Übersicht über die Wirkung der Inkubationen mit einem oder zwei der verwendeten Rezeptor-Agonisten, Neurotransmitter und Analoga bezüglich ihres Effekts auf die Veränderung des ApoE im Kulturmedium der inkubierten Astrozyten sowie der ApoE-mRNA-Expression.

4.6.2 ApoEs Regulation, Sekretion und Verfügbarkeit in Amyloid-Inkubationen von Astrozyten

Des Weiteren wurde die Wirkung von Amyloid-Fragmenten, wie sie aus der Alzheimer Pathologie bekannt sind, auf Regulation, Sekretion und Verfügbarkeit von Apolipoprotein E in Astrozyten-Primärkulturen untersucht. Es wurde untersucht, ob die Fähigkeit der Amyloide Fibrillen zu bilden einen Einfluss auf die ApoE-Produktion hatte. Schließlich wurde geprüft, ob die Reaktionen auf die Amyloide spezifisch für ApoE sind. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen können wie folgt zusammengefasst werden:

- Die Amyloide $\beta/A4(1-28)$, $(1-38)$, $(1-40)$, $(1-42)$, $(1-43)$, $(12-28)$, $(22-35)$, $(25-35)$ und auch die reverse Amyloid-Sequenz $\beta/A4(40-1)$ lagen in fibrillärer Form vor. Die Fragmente $\beta/A4(1-11)$, $(1-16)$, und $(10-20)$ lagen dagegen in nicht-fibrillärer Form vor.

- Nicht-aktivierte Astrozyten haben eine Pfannkuchen-ähnliche Zellmorphologie. Inkubation mit $\beta/A4(1-40)$ führte zu einer sternförmig aktivierten Form, wie sie auch für die Inkubation mit dBcAMP bekannt ist. Die Formveränderung bei dBcAMP findet deutlich früher statt (ab 6 h) als die bei Amyloid (ab 48 h). Die bei Amyloid-Inkubation veränderte Zellform geht nicht einher mit einer sichtbaren Veränderung des Golgi-Apparats in den Astrozyten, wie Fluoreszenz-Aufnahmen des Golgi-Apparats zeigen.
- Alle zur Inkubation verwendeten Amyloide erwiesen sich im Lebend-tot-Versuch bei Astrozyten als nicht-toxisch.
- Die Wirkung der verschiedenen Amyloid-Sequenzen auf die Verfügbarkeit von ApoE im Medium ist von ihrer Aminosäure-Sequenz und dem Anteil an hydrophoben Aminosäuren abhängig. Die $\beta/A4(1-16)$ verändert die Menge des gemessenen ApoE im Medium im Vergleich zum PBS-Kontroll-Ansatz nicht. $\beta/A4(1-11)$ erhöht Vergleich zum PBS-Kontrollansatz die Menge des ApoE im Medium geringfügig, die Sequenzen (1-28), (1-38), (1-40), (1-42), (1-43), (10-20), (12-28), (22-35), (25-35) und die reverse Sequenz $\beta/A4(40-1)$ verringern die Menge des ApoE im Medium erheblich (knapp über der oder unter der Nachweisgrenze).
- Die geringe Verfügbarkeit von ApoE im Medium nach Inkubation mit Amyloiden ist bedingt durch die Bindung des sezernierten ApoEs an die Amyloid-Konglomerate, wie die zellfreie Inkubation von Amyloid-Konglomeraten mit konditioniertem Medium und die immunzytochemische Detektion von Amyloid-inkubierten Astrozyten zeigte.
- Der ApoE-Western Blot der Medium- und Lysatfraktionen zeigt, dass sowohl die Zellen der PBS-Kontrolle als auch die der Inkubation mit $\beta/A4(1-40)$ in der Lage sind ApoE zu produzieren und zu sezernieren. Bei der Kontrolle diffundiert das ApoE ins Medium, bei der Amyloid-Inkubation bindet das ApoE an die Amyloid-Konglomerate. In beiden Inkubationen findet man kein ApoE im Zytosol, sehr wohl dagegen in der Debris-Fraktion. Die Vesikel-Fraktion der $\beta/A4(1-40)$ -Inkubationen weist im Vergleich zur PBS-Kontrolle eine leicht erhöhte ApoE-Menge auf. Dies deutet auf eine Erhöhung der ApoE-Produktion bei Inkubation mit $\beta/A4(1-40)$ hin.
- Die erhöhte ApoE-Produktion der Vesikel-Fraktion bei Inkubation der Astrozyten mit $\beta/A4(1-40)$ scheint im Vergleich zur PBS-Kontrolle spezifisch zu sein, da in den Amyloid-inkubierten Zellen die bFGF-Produktion nicht erhöht war. Die zum Vergleich mit gemessene NGF-Produktion steigt bei Inkubation mit $\beta/A4(1-40)$ im Vergleich zur PBS-Kontrolle an. NGF eignet sich aus diesem Grund nicht als Referenzmolekül für die Spezifität der Wirkung von Amyloid auf die ApoE-Produktion von Astrozyten.
- Die in den Zellen der $\beta/A4(1-40)$ -Inkubation stärkere Intensität der immunzytochemischen Färbung für S100 β gegenüber der Kontrolle lässt vermuten, dass es hier zu einer Verringerung der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration

(Second Messenger) kommt. Von den zwölf getesteten synthetischen $\beta/A4$ -Fragmenten zeigten nur fünf statistisch signifikante Effekte auf die $[Ca^{2+}]_i$. Die Peptide $\beta/A4(1-40)$, $(1-42)$, $(1-43)$, $(10-20)$ und $(25-35)$ senkten die $[Ca^{2+}]_i$ um 26, 20, 17, 25 und 24 % des PBS-Kontrollwerts respektive. Keines der untersuchten Fragmente erhöhte in den Astrozyten die Calcium-Konzentration.

- Die häufig in der Literatur als Kontrollsubstanz für Versuche mit Amyloiden genannte reverse Amyloid-Sequenz $\beta/A4(40-1)$ zeigte in einigen Versuchen einen erheblich von der PBS-Kontrolle verschiedenen Effekt. Deshalb muss der alleinige Einsatz der reversen Amyloid-Sequenz als Kontrollsubstanz in Frage gestellt werden.

5 Diskussion

5.1 ApoEs Regulierung über den Adenylatcyclase/PKA-Pfad

Untersuchungen an *post-mortem* Gehirn-Homogenaten haben gezeigt, dass sowohl die Bindung des β -Adrenozeptor an das G-Protein als auch die G-Protein Stimulation der Adenylatcyclase-Aktivität in AD aus dem Gleichgewicht geraten [85-89]. Wenn diese Dysfunktionen in glialen Zellen auftreten, ist es möglich, dass dies Konsequenzen auf die ApoE-Sekretion in AD hat. Normalerweise antworten Astrozyten nach Schädigungen mit einer Erhöhung der ApoE-Produktion. Astrozyten, die senile Plaques in AD Gehirnen umgeben, zeigen dagegen keine ApoE-Immunreaktivität [90].

Zunächst wurde gezeigt, dass die ApoE-Sekretion in den hier verwendeten Ratten-Primärkulturen von Astrozyten von dBcAMP moduliert werden kann. cAMP steuert eine Anzahl von astrozytären Eigenschaften, wie Calcium-Ströme [91], Protein-Phosphorylierung [92], Glutamat-Metabolismus [93] und Zelldifferenzierung [94]. cAMP kann die Synthese von ApoE in Astrozytoma Zellen stimulieren sowie Retinolsäure in denselben Zellen die cAMP-vermittelte Wirkung potenzieren [55]. Wie in derselben Untersuchung gezeigt, werden diese Effekte vom Transkriptionsfaktor AP-2 reguliert.

Wie wir zeigen konnten, erhöht cAMP die ApoE-Sekretion auch in Ratten-Primärkulturen von Astrozyten [95]. Die gemessene ApoE-Produktion während der Inkubation mit dBcAMP zeigte, dass diese Wirkung dosis- und zeitabhängig war und nach einem schnellen Ansteigen der ApoE-mRNA-Expression eine Stunde nach Beginn der Inkubation erfolgte. Wie schon an den Astrozytoma Zellen dargestellt [55], konnte RA in Ratten-Primärkulturen von hippocampalen Astrozyten allein die ApoE-Sekretion nicht beeinflussen, aber die cAMP-vermittelte Wirkung potenzieren. Dagegen konnten wir keine Potenzierung auf der Ebene der ApoE-mRNA-Expression feststellen [95]. Letzteres legt die Vermutung nahe, dass die Potenzierung der ApoE-Sekretion über einen Mechanismus erfolgt, welcher der ApoE-mRNA-Ebene nachgeschaltet ist.

Dass cAMP ein wichtiger Regulator der ApoE-Sekretion in Astrozyten ist, kann durch die hier erhobenen Daten der Inkubationen mit dem β -Adrenozeptor Agonisten Isoproterenol und dem α_2 -Adrenozeptor Agonisten Clonidine belegt werden. Isoproterenol steigerte und Clonidine senkte die ApoE-Sekretion, wahrscheinlich aufgrund der entsprechenden Erhöhung und Reduktion der cAMP-Produktion [96, 97]. Die Wirkung des Isoproterenol wurde nur zu frühen Zeitpunkten beobachtet. Es besteht die Möglichkeit, dass längere Inkubationen oder die Verwendung höherer Dosen dieses Agonisten zu einer Rezeptor-Desensibilisierung führen [98].

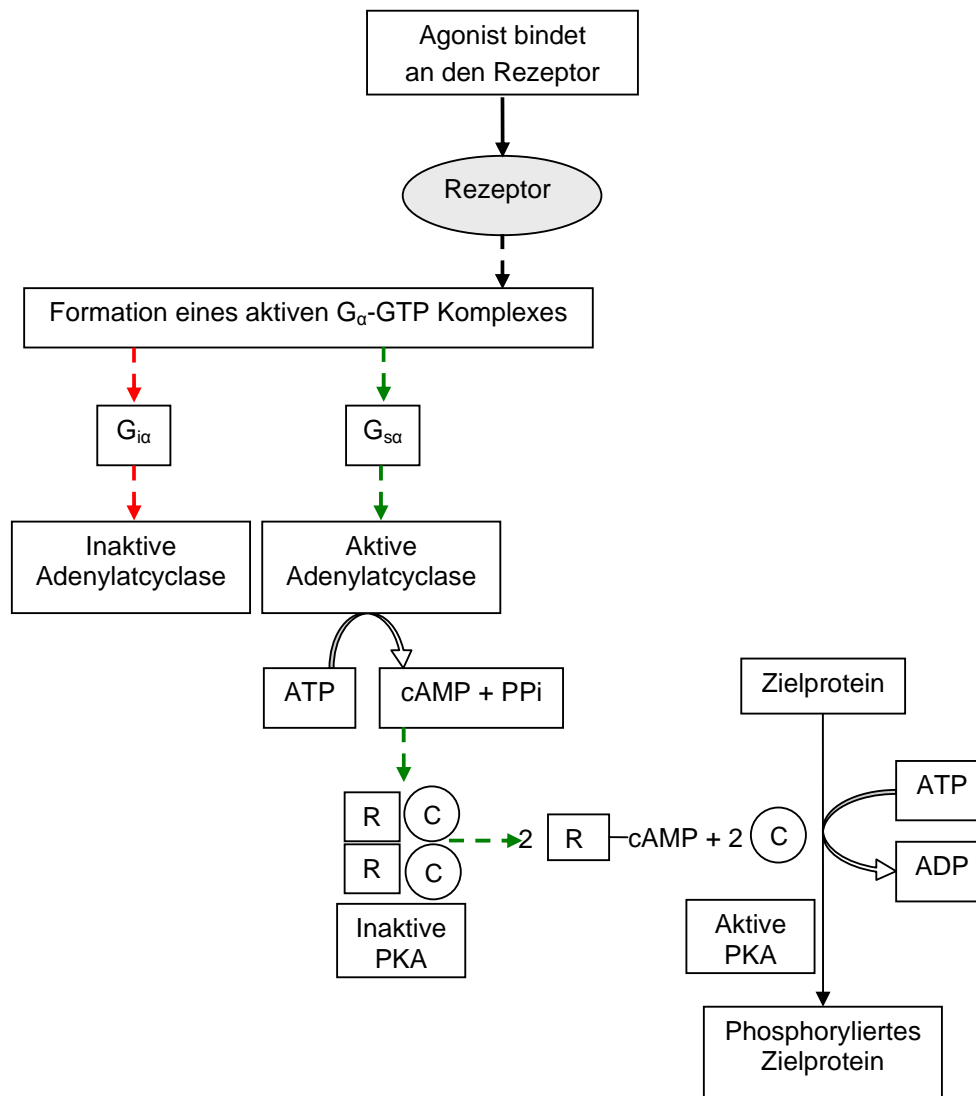


Abbildung 29: Der Adenylatcyclase/Protein kinase A-Pfad. Der Agonist bindet an den Rezeptor, was zu einer Aktivierung der G_α-Einheit des G-Proteins führt. Ist der Rezeptor spezifisch für stimulatorische G-Proteine (G_s), entsteht ein aktivierter G_{sα}-cAMP Komplex. Dieser Komplex bindet und aktiviert die Adenylatcyclase, die in der Innenschicht der Plasmamembran angesiedelt ist. Die aktivierte Adenylatcyclase katalysiert die Produktion von cAMP. Die cAMP-abhängige Protein kinase A (PKA) liegt im Zytosol normalerweise als Tetramer zweier regulatorischer und zweier inaktiver katalytischer Untereinheiten vor. Bindet cAMP an den regulatorischen Untereinheiten, so werden die katalytischen Untereinheiten vom Tetramer losgelöst und aktiviert. Die aktive PKA katalysiert den Transfer eines Phosphats von ATP auf ein Zielprotein. Abhängig davon welches Zielprotein phosphoryliert wird, steigt oder sinkt die Aktivität des Zielproteins. Carbachol und Clonidine führen zu einem G_{iα}-Komplex und inhibieren damit die Adenylatcyclase.

5.2 ApoEs Regulierung über den PLC/PKC-Pfad

Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass die PKC-Stimulierung verschiedene Wirkungen auf die ApoE-Sekretion haben kann. Dory berichtet [74], dass die PKC-Aktivierung mit Phorbol ester in Maus-Makrophagen eine schnelle, starke und stabile Inhibierung der ApoE-Synthese und Sekretion zur Folge hatte. Während der Differenzierung von humanen Monozyten-Makrophagen schildern Basheeruddin et al. [75] dagegen, dass eine Phorbol ester-vermittelte PKC-Aktivierung die ApoE-mRNA-Expression erhöhte. In den, in dieser Arbeit verwendeten primären Astrozyten-Zellkulturen senkten in signifikantem Ausmaß nur hohe PMA Konzentrationen die ApoE-Sekretion, niedrige PMA-Konzentrationen hatten keinen Einfluss auf die ApoE-Sekretion.

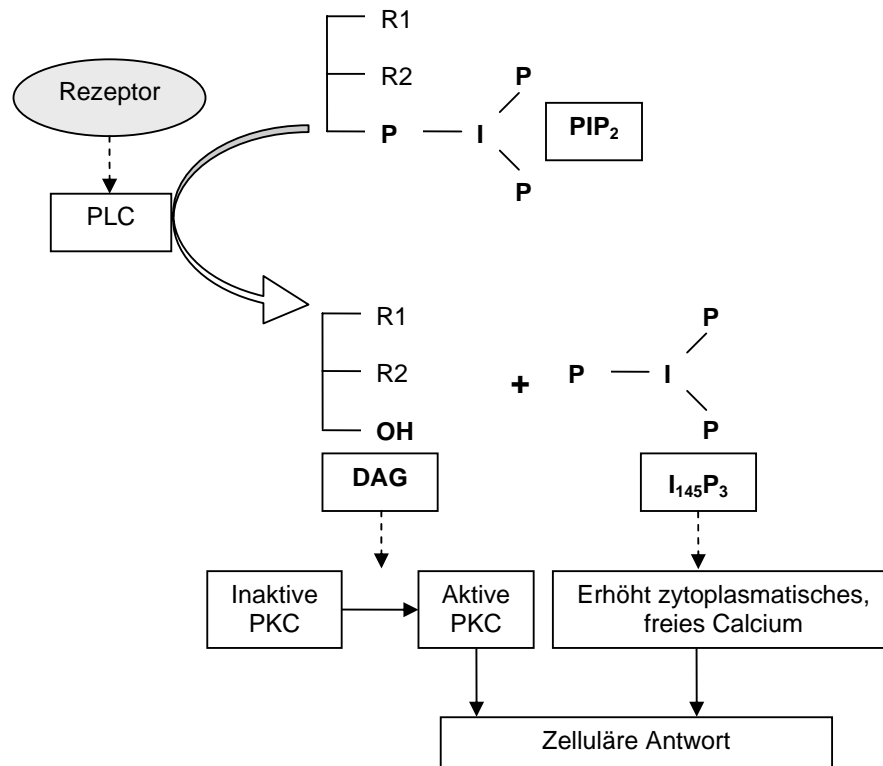


Abbildung 30: Ausschnitt aus dem Phosphatidylinositol (PI)-Zyklus und der Proteinkinase C (PKC)-Aktivierung. Als Antwort auf ein externes Signal (Agonistenbindung an den Rezeptor) hydrolysiert die Phospholipase C (PLC) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂), um drei verschiedene Second Messenger zu bilden: Inositol 1,4,5-trisphosphat (I₁₄₅P₃ oder IP₃), Diacylglycerol (DAG) und Arachnoic Acid¹² (Englisch oblige, hier nicht dargestellt). IP₃ bindet

¹² Arachidonat = all-cis- $\Delta^5, \Delta^8, \Delta^{11}, \Delta^{14}$ -Eicosatetraenat

an einen spezifischen Ca^{2+} Kanal im Endoplasmatischen /Sarcoplasmatischen Retikulum und führt zu einer Freisetzung von Ca^{2+} in das Zytoplasma. DAG aktiviert die spezifische PKC.

Sowohl hohe als auch niedrige PMA-Konzentrationen kehrten den dBcAMP-vermittelten Anstieg der ApoE-Sekretion um. Der Mechanismus, der dieser PKC-vermittelten Umkehrung der cAMP-stimulierten ApoE-Sekretion zugrunde liegt bleibt unklar. Wir zeigten [95], dass hohe PMA-Konzentrationen alleine die ApoE-mRNA-Expression inhibieren und in Kombination mit cAMP die frühe cAMP-vermittelte Steigerung der ApoE-mRNA-Expression umkehrt. Dies führt zu einer Verringerung der ApoE-Sekretion zu einem späteren Zeitpunkt. Die PKC-Aktivierung durch Phorbolester führte in hepatischen Zellen zur Induktion des nuklearen „Trans-Repressor BK virus enhancer factor-1“ (Englisch oblige), der die ApoE-Gen-Transkription negativ regulieren kann [99]. Gleichwohl haben Studien an Astrozyten gezeigt, dass die PKC die cAMP-Anhäufung verstärkt [100-102]. Des Weiteren können Phorbolester die transkriptionale Aktivierung der AP-2 vermittelten ApoE-Gen-Expression hochregulieren [103]. Beide der zwei zuletzt geschilderten Mechanismen würden eher einen Anstieg als eine Verringerung der ApoE-Sekretion erwarten lassen. Sowohl der PKC-Spiegel als auch ihre Aktivität sind in AD-Gehirnen verringert [104-106]. Unsere Daten legen nahe, dass ein PKC-Defizit in glialen Zellen von AD-Gehirnen zu einem Ansteigen der ApoE-Produktion und -Sekretion beitragen könnte.

Wie hier gezeigt, führten Arterenol und Serotonin zu einer leichten Erhöhung der ApoE-Sekretion. Im Gegensatz dazu senkte Carbachol die ApoE-Sekretion. Arterenol ist ein spezifischer $\alpha 1$ -Adrenorezeptor Agonist, der die PLC-vermittelte Phosphoinositol-Hydrolyse in Astrozyten aktiviert [76, 107]. Dagegen aktiviert Serotonin alle Serotonin-Rezeptor-Subtypen einschließlich der an PLC gebundenen als auch der 5-HT₆ und 5-HT₇ Subtypen, die die intrazelluläre cAMP-Akkumulation in Astrozyten stimulieren [78]. Die Stimulation der ApoE-Sekretion durch Serotonin könnte auf die Aktivierung der letzten beiden dieser Subtypen zurückzuführen sein. Carbachol aktiviert alle muskarinischen Rezeptor-Subtypen einschließlich solcher die die PLC stimulieren und solcher die die Adenylatcyclase inhibieren (zur Übersicht siehe [77]). Aus diesem Grund stimmt die Carbachol-vermittelte Inhibierung der ApoE-Sekretion mit den Wirkungen von PMA und cAMP in der Astrozyten-Zellkultur überein.

Die vorgelegten Untersuchungen zeigen, dass die $\alpha 1$ -Adrenorezeptor-Stimulation den β -Adrenorezeptor-vermittelten Anstieg der ApoE-Sekretion verstärkt. Hierzu ist bekannt, dass sowohl die $\alpha 1$ -Adrenorezeptor als auch die Serotonin-Rezeptor Aktivierung den β -Adrenorezeptor-vermittelten Anstieg der cAMP-Produktion potenzieren [63, 76, 108]. Der Verstärkung der ApoE-Sekretion nach gleichzeitiger Aktivierung der β -Adrenorezeptoren und $\alpha 1$ -Adrenorezeptoren könnte eine synergistische Steigerung der cAMP-Produktion zugrunde liegen.

5.3 Spezifität der ApoE-Regulierung über den Adenylatcyclase/PKA-Pfad und den PLC/PKC-Pfad

Um herauszufinden, ob die geschilderten Effekte auf die ApoE-Sekretion spezifisch waren, wurde im identischen Ansatz die Wirkung der Substanzen auf die NGF-Sekretion untersucht. NGF wird im zentralen Nervensystem von einigen Neuronen gebildet. Während der Entwicklung und bei bestimmten Krankheiten wird NGF, lokal beschränkt, auch von Astrozyten produziert [109, 110]. Obwohl berichtet wurde, dass die PKC-Aktivierung die NGF-Produktion in Astrozyten ansteigen lässt [111, 112], ist der Mechanismus dieser Regulation noch nicht bekannt. Die hier beschriebenen Untersuchungen bestätigen, dass eine PKC-Aktivierung bei primären Astrozyten-Zellkulturen einen erheblichen Anstieg der NGF-Produktion zur Folge hat. Dies steht im starken Kontrast zu der Wirkung auf die ApoE-Sekretion. Des Weiteren zeigte sich, dass dBcAMP und Isoproterenol entgegengesetzte Auswirkungen auf die NGF- und ApoE-Sekretion hatten. Die Rolle des cAMP und der Proteinkinase A (PKA) auf die NGF-Regulation in astroglialen Zellen bleibt unklar, da in der Vergangenheit von unterschiedlichen Untersuchungsergebnissen bezüglich verschiedener Zellkultur-Systeme berichtet wurden. Forskolin und cAMP-Analoga haben einerseits die NGF-Synthese stimuliert. Andererseits wurde beobachtet, dass sie die Aktivität verschiedener Induktoren der NGF-Synthese umkehren können [113, 114]. Im Gegensatz dazu wird berichtet, dass bei Behandlung von Iris-Primärkulturen von Ratten mit verschiedenen adrenergen Substanzen sowohl die NGF-Synthese als auch die –Sekretion sinken [115]. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die beobachteten Wirkungen auf die ApoE-Sekretion spezifisch und nicht die Konsequenz einer allgemeinen trophischen Aktion sind. Um Klarheit in die gegensätzliche Regulation von ApoE- und NGF-Sekretion durch PKC und PKA zu bringen wären weitere Untersuchungen erforderlich.

5.4 Einfluss der fibrillären Amyloide auf die Regulation von ApoE

Während der degenerativen Ereignisse bei der Alzheimerschen Krankheit entsteht in der Regel eine reaktive Gliosis, die eine Serie von morphologischen und biochemischen Veränderungen in Astrozyten auslöst. Eine dieser Veränderungen ist die überreiche Produktion von ApoE [56]. Astrozyten, die senile Plaques in AD Gehirnen umgeben, zeigen dagegen keine ApoE-Immunreaktivität, das benachbarte Amyloid sehr wohl [90, 116, 117]. Es galt zu klären, ob diese Beobachtung auf einem Eingriff des Amyloids in die Regulation des ApoE zurückzuführen ist.

Wie unter 4.5.3 geschildert, stieg nach dreitägiger Inkubation mit den Amyloid-Konglomerate β /A4(1-40), (1-42) und (1-43) im Vergleich zur PBS-Kontrolle die im Kulturmedium messbare ApoE-Menge nur knapp über oder blieb unter der Nachweisgrenze. Hierfür könnten zwei Mechanismen allein oder in Kombination verantwortlich sein. Einerseits könnte das sekretierte

ApoE vom Amyloid gebunden werden und damit dem Medium entzogen werden, wie dies in der Literatur beschrieben wurde [6, 47, 90, 118-121]. Andererseits könnte das Amyloid in die ApoE-Regulierung eingreifen.

Um zwischen diesen zwei Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde von den Astrozyten konditioniertes Medium von den Zellen entfernt, unter zellfreien Bedingungen mit gealterten Amyloid-Konglomeraten inkubiert und die Menge des frei verfügbaren ApoEs im Medium gemessen (siehe 4.5.4). Wie gezeigt, war das Amyloid in der Lage das vorhandene ApoE im Medium zu binden. Betrachtete man die ApoE-Immunoreaktivität der mit Amyloid inkubierten Astrozyten (siehe 4.5.5) so stellte man fest, dass ApoE in großer Menge an das Amyloid gebunden war. Die Astrozyten hingegen wiesen im Vergleich zu denen der PBS-Kontrolle eine verringerte ApoE-Immunoreaktivität auf. Dies legte nahe, dass das verfügbare ApoE im Kulturmedium der mit Amyloid inkubierten Astrozyten aufgrund einer Bindung des ApoE an das Amyloid und einer Herunterregulierung der ApoE-Produktion verringert war. Letzteres hätte eine Erklärung für die Beobachtung von Poduri, Uchihara und Shao geboten, dass Astrozyten, die senile Plaques in AD Gehirnen umgeben, keine ApoE-Immunoreaktivität zeigen, das benachbarte Amyloid dagegen sehr wohl [90, 116, 117]. Um diese Arbeitshypothese weiter zu untermauern wurden Zellen mit $\beta/A4(1-40)$ und PBS zur Kontrolle inkubiert und danach einschließlich des von ihnen konditionierten Mediums in verschiedene Fraktionen aufgetrennt. Die Analyse der Fraktionen mittels ApoE-Western Blot bestätigte nicht die bei der ApoE-Immunfärbung der Zellen aufgestellte Arbeitshypothese von einer ApoE-Herabregulierung bei Amyloid-inkubierten Zellen. Der Western Blot zeigte im Medium-Pellet der Amyloid-inkubierten Astrozyten und in deren Debris-Fraktion eine große Menge ApoE, welches dort aller Wahrscheinlichkeit nach an die Amyloid-Konglomerate des Amyloids gebunden war. Für die Aussage, ob ApoE-Produktion in den Amyloid-inkubierten Astrozyten runter oder hochreguliert ist allerdings die Vesikel-Fraktion entscheidend, da sich hier das neu synthetisierte ApoE auf dem Weg zur Zellmembran befinden sollte. Die Vesikel-Fraktion der Amyloid-inkubierten Astrozyten wies mehr ApoE auf, als die der PBS-Kontrolle (siehe 4.5.7.1). Diese Entdeckung stimmt mit den mittlerweile veröffentlichten Beobachtungen von LaDu et al. überein [80]. Die verringerte ApoE-Immunoreaktivität der $\beta/A4(1-40)$ -inkubierten Astrozyten bei der immunzytochemischen Färbung der Zellen mit ApoE-Antikörpern könnte darauf zurückzuführen sein, dass ApoE durch die Bindung an das Amyloid in einem solchen Übermaß vorhanden sind, dass zuwenig ApoE-Antikörper vorhanden sind, um die feineren Strukturen zu färben.

Um herauszufinden über welchen Mechanismus Amyloid die ApoE-Regulation beeinflusst, untersuchten LaDu et al. [79] den Effekt des ApoE-Rezeptor Antagonisten *receptor associated protein* (englisch oblege, RAP). Hierbei machten sie sich zunutze, dass man zwischen den Effekten auf den LDL-Rezeptor und LRP mittels der verschiedenen Bindungsaffinitäten von RAP für diese zwei Rezeptoren ($K_{d_{LRP}} = 3,3 \text{ nM}$ [122], $K_{d_{LDLR}} = 250 \text{ nM}$ [123]) unterscheiden kann [124, 125]. RAP blockierte mit 70 nM die $\beta/A4$ -induzierte Aktivierung, nicht aber den ApoE-Anstieg. Mit 1 μM blockierte RAP sowohl die $\beta/A4$ -induzierte Aktivierung als auch den ApoE-Anstieg. Die Autoren schließen daraus, dass LRP die $\beta/A4$ -induzierte Aktivierung der Astrozyten

vermittelt, während der LDL-Rezeptor den β /A4-induzierten ApoE-Anstieg vermittelt. Letzteres würde eine spezifische Heraufregulierung der ApoE-Produktion andeuten.

5.5 Ist der Einfluss der fibrillären Amyloide auf die ApoE-Regulierung spezifisch?

Um zu klären, ob es sich bei der erhöhten ApoE-Produktion der Amyloid-inkubierten Zellen ausschließlich um einen spezifischen oder zusätzlich einen generellen stimulatorischen Effekt des Amyloids handelt, wurden Amyloid-inkubierte Zellen auf ihren Gehalt an NGF hin untersucht, da während der Entwicklung und bei bestimmten Krankheiten NGF, lokal beschränkt, auch von Astrozyten produziert wird [109, 110]. Außerdem war im Rahmen des ersten Teils der hier vorliegenden Arbeit festgestellt worden, dass Astrozyten aus Ratten-Primärkulturen unter Einfluss verschiedener Rezeptor-Agonisten, Analoga und Hormone ApoE und NGF in unterschiedlicher Weise regulierten. Es war zu beobachten, dass auch NGF durch die Zugabe von β /A4(1-40) herauf reguliert wurde (siehe 4.5.7.1). Die Unterschiede zu ApoE sind dadurch zu erklären, dass NGF im Gegensatz zu ApoE im Zytosol der Zellen vorkommt und außerhalb der Zellen nicht im selben Maße wie ApoE von Amyloid gebunden wird. Da sich aus diesem Grunde die Untersuchung von NGF nicht für den Nachweis einer spezifischen Wirkung von Amyloid auf die ApoE-Regulation eignet, wurden daraufhin Amyloid-inkubierte Zellen auf ihren Gehalt an bFGF analysiert (siehe 4.5.7.2). Es zeigte sich, dass die bFGF-Produktion unter dem Einfluss von β /A4(1-40) von den Astrozyten weder runter noch hochreguliert wurde. Somit scheint Amyloid spezifisch in die ApoE-Regulation einzuwirken. In Bezug auf die erhöhte NGF-Produktion der β /A4(1-40)-inkubierten Zellen bleibt zu bemerken, dass humane Neuroblastomazellen (SY 5Y) im Laufe ihrer Differenzierung unter Einfluss von NGF zunächst den ApoE-mRNA-Spiegel senkten (nach vier Tagen) und dann erhöhten (nach weiteren drei Tagen) [126]. Produzieren Astrozyten bei Kontakt mit β /A4-Amyloid größere Mengen an NGF könnte dieses die umliegenden Neurone dazu veranlassen selbst mehr ApoE zu bilden. Während APP-transgene Mäuse, die ApoE produzierten in großem Ausmaß Amyloid-Plaques bildeten, waren Mäuse denen ApoE fehlte trotz transgenem APP davor fast vollständig geschützt [127]. Inwieweit diese Erkenntnisse tatsächlich mit der AD-Pathologie zusammenhängen müsste Gegenstand weiterer Forschung sein.

5.6 Wirkung der verschiedenen Amyloid-Fragmente auf die Verfügbarkeit von ApoE im Medium

Betrachtet man die Wirkung der getesteten verschiedenen Amyloid-Fragmente auf die Verfügbarkeit von ApoE im Medium, weist die $\beta/A4(1-11)$ -Inkubation eine im Vergleich zum PBS-Kontrollansatz größere ApoE-Menge auf. Die $\beta/A4(1-16)$ -Inkubation unterscheidet sich in der Menge des gemessenen ApoE im Medium im Vergleich zum PBS-Kontroll-Ansatz nicht. Die Fragmente $\beta/A4(1-28)$, $(1-38)$, $(1-40)$, $(1-42)$, $(1-43)$, $(10-20)$, $(12-28)$, $(22-35)$, $(25-35)$ und die reverse Sequenz $\beta/A4(40-1)$ weisen weit geringere ApoE-Mengen auf oder bleiben unter der Nachweisgrenze (Details siehe 4.5.3). Die zur Inkubation verwendeten Amyloide erwiesen sich im Lebend-tot-Versuch im Gegenteil zur Inkubation mit Neuronen [72, 128] bei Astrozyten nicht als toxisch (siehe 4.1.2) [80]. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Neurotoxizität in engem Zusammenhang mit der Aggregation der Amyloid-Fragmente steht [129]. Hierbei bleibt zu bemerken, dass die Epitope, die für die Fibrillenbildung notwendig sind, nach wie vor nicht genau charakterisiert werden können. Sowohl Fragmente, die dem relativ hydrophilen N-Terminus des Amyloids [130-134], als auch Fragmente, die dem relativ hydrophoben C-Terminus des Amyloids [135, 136] entsprechen, können eine β -Faltblatt Konfiguration einnehmen und/oder Fibrillen bilden. Ein vermuteter „ β -Turn“¹³ (Englisch oblige) in der 26-29 AS-Region [131, 137], bzw. in der 25-29 AS-Region [129] und hydrophobe Interaktionen in der 29-42 AS-Region [135, 137-140] sollen laut Literatur dem Peptid Stabilität vermitteln. Für die Aggregation ist als Sekundärstruktur die Ausbildung des β -Faltblatts Bedingung [129]. Die Zusammenstellung der Messergebnisse bezüglich der frei verfügbaren ApoE-Menge im Medium und der intrazellulären Calcium-Konzentration in Amyloid-Inkubationen sowie der Fibrillenbildung und der Anteil an hydrophoben Aminosäuren zeigt, dass gerade die Amyloid-Fragmente, die mehrere der oben genannten Strukturelemente aufweisen besonders potent die Menge des frei verfügbaren ApoEs im Medium reduzieren (siehe Tabelle 9, grau unterlegt). Betrachtet man die übrigen Fragmente, die die freie ApoE-Menge in starkem oder weniger starkem Maße verringern, so fällt auf, dass vor allem die Fragmente mit „ β -Turn“ in der 25-29 AS-Region nachhaltiger wirken als solche ohne (z.B. $\beta/A4(1-16)$, $(10-20)$). Eigenartiger Weise trifft letzteres auch auf die regelmäßig in der Literatur als „Kontrolle“ verwendete reverse Sequenz $\beta/A4(40-1)$ zu.

¹³ β -Kehre

| Amyloid-Fragment | ApoE-Menge (% der PBS-Kontrolle) | Zytosolische Calcium-Konz. (% der PBS-Kontrolle) | Fibrillen | Hydrophobe Aminosäuren |
|------------------|----------------------------------|--|-----------|------------------------|
| (1-11) | 118 | 96 | - | - |
| (1-16) | 94 | 96 | - | - |
| (1-28) | 77 | 93 | + | - |
| (1-38) | 6 | 97 | + | + |
| (1-40) | 3 | 74 | + | + |
| (1-42) | 2 | 80 | + | + |
| (1-43) | 1 | 83 | + | + |
| (10-20) | 84 | 75 | - | - |
| (12-28) | 42 | 87 | + | - |
| (22-35) | 65 | 78 | + | + |
| (25-35) | 58 | 92 | + | + |
| (40-1) | 45 | 102 | + | + |
| PBS-Kontrolle | 100 | 100 | | |

Tabelle 9: Zusammenfassung der Messergebnisse der ApoE-Menge im konditionierten Medium, der intrazellulären Calcium-Konzentrationen, der Fibrillenbildung, des Anteils an hydrophoben Aminosäuren und der ApoE-Konzentration nach Inkubation des konditionierten Mediums mit Amyloid ohne Zellen. Die Amyloid-Fragmente, die maximale Wirkung zeigten sind grau unterlegt.

Gerade die hier grau unterlegten Fragmente sind die, die laut Literatur den Großteil der Amyloid-Ablagerungen im AD-Gehirn ausmachen. Trotz der oben belegten Fähigkeit des β /A4(1-40) die ApoE-Produktion in Astrozyten zu steigern (siehe Abbildung 24), könnte im fortgeschrittenen Stadium von AD die ApoE-bindende und neurotoxische Wirkung der Fragmente überwiegen. Sollte dem ApoE tatsächlich eine Schutzfunktion bezüglich der Toxizität von Amyloiden bei Neuronen zukommen [141], so wäre diese durch das Übermaß an Amyloid in Frage gestellt. Sollte ApoE eine Funktion als extrazelluläre „Chaperone“¹⁴ (Englisch oblige) innehaben [142], die zur Fibrillenbildung und damit zur Neurotoxizität der Amyloid-Fragmente bei AD beiträgt, würde die erhöhte Produktion von ApoE als Reaktion auf den Kontakt mit Amyloid dazu führen, dass der überwiegende Teil des Amyloids in die fibrilläre und damit für Neuronen schädliche Form überführt würde.

¹⁴ Im ursprünglichen Sinn cytoplasmatische Proteine, die an gerade entstehende, noch ungefaltete Polypeptide binden und die korrekte Faltung sowie den Transport der Polypeptide veranlassen. Sie binden nicht kovalent und sind nicht Teil des Endproduktes.

5.7 Einfluss der fibrillären Amyloide auf die Zellform und die intrazelluläre Calcium-Homöostase

Immunzytochemische GFAP- und S100 β -Färbungen der mit Amyloid inkubierten Astrozyten zeigen eine Veränderung der pfannkuchenähnlichen Form bei der PBS-Kontrolle zu einer sternförmig aktivierten Form, wie sie auch für die Inkubation mit dBcAMP bekannt ist (siehe 4.5.2). S100 β ist ein Calcium-bindendes Protein, welches in Astrozyten, die neuritische Plaques umgeben, in stark erhöhtem Maße immunzytologisch nachgewiesen werden kann [143, 144]. In Gliomakulturen sowie in primären Ratten-Astrozytenkulturen wird durch Zugabe von β /A4(1-40) S100 β hochreguliert [145]. Dies weist daraufhin, dass Amyloid in die intrazelluläre Calcium-Homöostase eingreift. Die hier durchgeführten Fura-Fluoreszenz-Messungen zeigten, dass die Fragmente β /A4(1-40), (1-42), (1-43), (10-20) und (25-35) den intrazellulären Calcium-Spiegel der Astrozyten signifikant im Vergleich zur PBS-Kontrolle senkten (74, 80, 83, 75 und 78 % der PBS-Kontrolle respektive) [69]. Dabei senkte dBcAMP (76 % der PBS-Kontrolle) den intrazellulären Calcium-Spiegel deutlich früher (innerhalb der ersten 24 h) als die Inkubation mit den Amyloid-Fragmenten, bei der die Verringerung der Ca²⁺-Konzentration erst nach 48 h messbar war. Die Veränderungen der Zellform gingen den Veränderungen des Calcium-Spiegels zeitlich voraus (dBcAMP nach 6 h; β /A4(1-40) nach 24 h). Die β /A4-Fragmente, die in den Astrozyten die intrazelluläre Calcium-Konzentration sinken ließen, verursachten in Neuronen derselben Präparationen einen signifikanten Anstieg der Calcium-Konzentration. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, dass die Verletzung von Neuronen in Neuronen-Astrozyten-Mischkulturen durch übermäßig viel Glutamat eine neuronale Degeneration zur Folge hatte [146]. Der Schaden an den Neuronen (gemessen an veränderter Morphologie und Aktivität der Cholinacetyltransferase) führte schließlich zu deren Tod und ging einher mit einem Anstieg der gemessenen ApoE-Menge im Medium. Beide Vorgänge waren Calcium-abhängig und konnten durch den NMDA-Rezeptor Antagonisten MK-801 blockiert werden. Immunohistochemische Untersuchungen zeigten, dass ApoE in der Hauptsache von den Astrozyten gebildet worden war [146]. Da β /A4(1-40), welches bei Astrozyten einen Abfall sowie bei Neuronen einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration zur Folge hatte, in den hier verwendeten Kulturen zu einem Anstieg der Astrozyten-ApoE-Produktion führte, liegt der Verdacht nahe, dass auch dieser Vorgang Calcium-abhängig sein könnte. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu prüfen, ob alle β /A4-Fragmente, die zu einer Verringerung des im Medium verfügbaren ApoEs führen einen stimulierenden Effekt auf die ApoE-Produktion haben und, ob dies mit dem Einfluss auf die Calcium-Konzentration übereinstimmt. Ein weiterer beachtenswerter Aspekt ist die Beobachtung, dass bFGF, welches in den hier geschilderten Inkubationen mit β /A4(1-40) herauf reguliert wurde (siehe 4.5.7.2) bei Neuronen in der Lage war signifikant den Verlust der Calcium-Homöostase durch Amyloid abzuschwächen [147].

Aus der Zusammenfassung (siehe Tabelle 9) geht hervor, dass vornehmlich die Fibrillen-

bildenden und damit wahrscheinlich in aggregierter Form vorliegenden Amyloid-Fragmente einen negativen Einfluss auf die freie Verfügbarkeit des ApoE im Medium haben. Dies sind nicht exakt dieselben Fragmente, die auch eine maximale Wirkung auf den intrazellulären Calcium-Spiegel haben (z.B. $\beta/A4(1-38)$). Umgekehrt beeinflussen Fragmente den intrazellulären Calcium-Spiegel erheblich, haben aber eine minder wichtige Wirkung auf die frei verfügbare ApoE-Menge im Medium (z.B. $\beta/A4(10-20)$). Daraus ist abzuleiten, dass die für die ApoE-Bindung notwendigen Strukturen nicht in ihrer Gesamtheit deckungsgleich mit denen sind, die für die Beeinflussung des intrazellulären Calcium-Spiegels eine Rolle spielen.

Hierbei sollte erwähnt werden, dass die verwendete Messtechnik für die Veränderung des intrazellulären Calcium-Spiegels ursprünglich für Veränderungen des Calcium-Spiegels im Sekundenbereich konzipiert wurde. In unseren Versuchen wurde nicht die Veränderung des Calcium-Spiegels vor und Sekunden nach Zugabe des Amyloids beobachtet, sondern der Status Quo nach dreitägiger Inkubation mit Amyloid im Vergleich zu einer Kontrolle, also nicht mit den identischen Zellen. Trotz der hohen gemessenen Zellzahl in mehreren unabhängigen Versuchen kann die vergleichsweise minimale Veränderung des Calcium-Spiegels innerhalb einer Zelle mittels diesen Verfahrens möglicherweise nicht genau genug aufgelöst werden. Hinzu kommt, dass die Zellen für die Messung zunächst 40 min mit und 30 min ohne Fura-Indikator inkubiert wurden, bevor die Messungen stattfanden. Da der Fura-Farbstoff auf längere Sicht als Puffer für Calcium-Ionen wirkt, kann auch diese Eigenschaft erheblich zu einer Verschiebung der gemessenen Calcium-Konzentration in den Zellen führen. Es wäre in der Tat interessant einen Überblick darüber zu erhalten, inwieweit sich die intrazelluläre Calcium-Konzentration bei Kontakt mit fibrillären Amyloiden verändert und inwiefern sich die Calcium-Konzentration bei längerer Inkubation entwickelt. In dieser Hinsicht war der Versuch einer Calcium-Messung mit der bekannten und verfügbaren Fura-Messmethode sicher interessant. Ob die Aussagekraft dieses gewählten Versuchsansatzes hoch genug ist, muss im Nachhinein allerdings bezweifelt werden.

5.8 Eignung der reversen Sequenz $\beta/A4(40-1)$ als Kontrollsubstanz

Nach Betrachtung der sehr unterschiedlichen Wirkungsweisen der reversen Sequenz $\beta/A4(40-1)$ im Vergleich zur PBS-Kontrolle in den verschiedenen hier vorgestellten Versuchen, ist festzuhalten, dass sich eine solch janusköpfige Substanz nicht als Kontrolle für Experimente mit Amyloid-Fragmenten eignet.

6 Literaturverzeichnis

1. Weisgraber, K.H., *Apolipoprotein E: structure-function relationships*. Adv. Protein Chem., 1994. **45**: p. 249-302.
2. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis*. Science, 1986. **232**(4746): p. 34-47.
3. Howell, B.W. and J. Herz, *The LDL receptor gene family: signaling functions during development*. Curr Opin Neurobiol, 2001. **11**(1): p. 74-81.
4. Mahley, R.W., *Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology*. Science, 1988. **240**(4852): p. 622-630.
5. Ignatius, M.J., et al., *Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(4): p. 1125-9.
6. Strittmatter, W.J., et al., *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. **90**(5): p. 1977-81.
7. Nicoll, J.A., G.W. Roberts, and D.I. Graham, *Amyloid beta-protein, APOE genotype and head injury*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **777**: p. 271-5.
8. Slioter, A.J., et al., *Apolipoprotein E epsilon4 and the risk of dementia with stroke. A population-based investigation [see comments]*. Jama, 1997. **277**(10): p. 818-21.
9. Wisniewski, T. and B. Frangione, *Molecular biology of brain aging and neurodegenerative disorders*. Acta Neurobiol Exp, 1996. **56**(1): p. 267-79.
10. Mirra, S.S., et al., *The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease*. Neurology, 1991. **41**(4): p. 479-486.
11. Evans, D.A., et al., *Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported [see comments]*. Jama, 1989. **262**(18): p. 2551-6.
12. Pitas, R.E., et al., *Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins*. Biochim.Biophys.Acta, 1987. **917**(1): p. 148-161.
13. Pitas, R.E., et al., *Role of apolipoprotein E in modulating neurite outgrowth: potential effect of intracellular apolipoprotein E*. Biochem.Soc.Trans., 1998. **26**(2): p. 257-262.
14. Boyles, J.K., et al., *A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve*. J.Clin.Invest., 1989. **83**(3): p. 1015-1031.
15. Wolf, B.B., et al., *Characterization and immunohistochemical localization of alpha 2-macroglobulin receptor (low-density lipoprotein receptor-related protein) in human brain*. Am J Pathol, 1992. **141**(1): p. 37-42.
16. Schmechel, D.E., et al., *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. **90**(20): p. 9649-53.
17. Corder, E.H., et al., *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families [see comments]*. Science, 1993. **261**(5123): p. 921-3.
18. Willnow, T.E., *The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism*. J Mol Med, 1999. **77**(3): p. 306-15.
19. Willnow, T.E., A. Nykjaer, and J. Herz, *Lipoprotein receptors: new roles for ancient*

- proteins. *Nat Cell Biol*, 1999. **1**(6): p. E157-62.
20. Kang, D.E., et al., *Genetic association of the low-density lipoprotein receptor- related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease*. *Neurology*, 1997. **49**(1): p. 56-61.
 21. Beffert, U., C. Arguin, and J. Poirier, *The polymorphism in exon 3 of the low density lipoprotein receptor- related protein gene is weakly associated with Alzheimer's disease*. *Neurosci Lett*, 1999. **259**(1): p. 29-32.
 22. Blacker, D., et al., *Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease*. *Nat Genet*, 1998. **19**(4): p. 357-60.
 23. Bressler, S.L., et al., *cDNA cloning and chromosome mapping of the human Fe65 gene: interaction of the conserved cytoplasmic domains of the human beta-amyloid precursor protein and its homologues with the mouse Fe65 protein*. *Hum Mol Genet*, 1996. **5**(10): p. 1589-98.
 24. Fiore, F., et al., *The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(52): p. 30853-6.
 25. Trommsdorff, M., et al., *Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(50): p. 33556-60.
 26. Hu, Q., et al., *The human FE65 gene: genomic structure and an intronic biallelic polymorphism associated with sporadic dementia of the Alzheimer type*. *Hum Genet*, 1998. **103**(3): p. 295-303.
 27. Guenette, S.Y., et al., *hFE65L influences amyloid precursor protein maturation and secretion*. *J Neurochem*, 1999. **73**(3): p. 985-93.
 28. Sabo, S.L., et al., *Regulation of beta-amyloid secretion by FE65, an amyloid protein precursor-binding protein*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(12): p. 7952-7.
 29. Scott, W.K., et al., *Fine mapping of the chromosome 12 late-onset Alzheimer disease locus: potential genetic and phenotypic heterogeneity*. *Am J Hum Genet*, 2000. **66**(3): p. 922-32.
 30. Herz, J. and U. Beffert, *Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease*. *Nat Rev Neurosci*, 2000. **1**(1): p. 51-8.
 31. Namba, Y., et al., *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. **541**(1): p. 163-6.
 32. Wisniewski, T. and B. Frangione, *Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid*. *Neurosci Lett*, 1992. **135**(2): p. 235-8.
 33. Saunders, A.M., et al., *Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease [see comments]*. *Neurology*, 1993. **43**(8): p. 1467-72.
 34. Rall, S.C., Jr., K.H. Weisgraber, and R.W. Mahley, *Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence*. *J.Biol.Chem.*, 1982. **257**(8): p. 4171-4178.
 35. Wetterau, J.R., et al., *Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(13): p. 6240-8.
 36. Aggerbeck, L.P., et al., *Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. II. Properties of the amino- and carboxyl-terminal domains*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(13): p. 6249-58.
 37. Innerarity, T.L., et al., *The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Binding of apolipoprotein E fragments*. *J.Biol.Chem.*, 1983. **258**(20): p. 12341-12347.
 38. Weisgraber, K.H., *Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins:*

- role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J Lipid Res*, 1990. **31**(8): p. 1503-11.
39. Wilson, C., et al., *Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E*. *Science*, 1991. **252**(5014): p. 1817-1822.
 40. Dong, L.M., et al., *Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms*. *J.Biol.Chem.*, 1994. **269**(35): p. 22358-22365.
 41. Olaisen, B., P. Teisberg, and T. Gedde-Dahl, Jr., *The locus for apolipoprotein E (apoE) is linked to the complement component C3 (C3) locus on chromosome 19 in man*. *Hum Genet*, 1982. **62**(3): p. 233-6.
 42. Das, H.K., et al., *Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene*. *J Biol Chem*, 1985. **260**(10): p. 6240-7.
 43. Zannis, V.I., et al., *Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes*. *J.Lipid Res.*, 1982. **23**(6): p. 911-914.
 44. Gregg, R.E., et al., *Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans*. *J.Clin.Invest.*, 1986. **78**(3): p. 815-821.
 45. Steinmetz, A., et al., *Differential distribution of apolipoprotein E isoforms in human plasma lipoproteins*. *Arteriosclerosis*, 1989. **9**(3): p. 405-11.
 46. Davignon, J., R.E. Gregg, and C.F. Sing, *Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis*. *Arteriosclerosis*, 1988. **8**(1): p. 1-21.
 47. LaDu, M.J., et al., *Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid*. *J.Biol.Chem.*, 1994. **269**(38): p. 23403-23406.
 48. Lin, R.C., *Effects of hormones on apolipoprotein secretion in cultured rat hepatocytes*. *Metabolism*, 1988. **37**(8): p. 745-51.
 49. Lucas, M., et al., *Lipoprotein lipase reduces secretion of apolipoprotein E from macrophages*. *J.Biol.Chem.*, 1997. **272**(20): p. 13000-13005.
 50. Dory, L., *Regulation of apolipoprotein E secretion by high density lipoprotein 3 in mouse macrophages*. *J Lipid Res*, 1991. **32**(5): p. 783-92.
 51. Reue, K.L., et al., *Cloning and regulation of messenger RNA for mouse apolipoprotein E*. *J Biol Chem*, 1984. **259**(4): p. 2100-7.
 52. Baskin, F., et al., *Altered apolipoprotein E secretion in cytokine treated human astrocyte cultures*. *J.Neurol.Sci.*, 1997. **148**(1): p. 15-18.
 53. Oropeza, R.L., H. Wekerle, and Z. Werb, *Expression of apolipoprotein E by mouse brain astrocytes and its modulation by interferon-gamma*. *Brain Res*, 1987. **410**(1): p. 45-51.
 54. Stone, D.J., et al., *Astrocytes and microglia respond to estrogen with increased apoE mRNA in vivo and in vitro*. *Exp.Neurol.*, 1997. **143**(2): p. 313-318.
 55. Garcia, M.A., et al., *Transcription factor AP-2 regulates human apolipoprotein E gene expression in astrocytoma cells*. *J.Neurosci.*, 1996. **16**(23): p. 7550-7556.
 56. Poirier, J., et al., *Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning*. *Brain Res.Mol.Brain Res.*, 1991. **11**(2): p. 97-106.
 57. Lambert, J.C., et al., *A new polymorphism in the APOE promoter associated with risk of developing Alzheimer's disease*. *Hum Mol Genet*, 1998. **7**(3): p. 533-40.
 58. Bullido, M.J., et al., *A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia*. *Nat.Genet.*, 1998. **18**(1): p. 69-71.
 59. Artiga, M.J., et al., *Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene*. *FEBS Lett.*, 1998. **421**(2): p. 105-108.

60. Artiga, M.J., *et al.*, *Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene*. *Hum Mol Genet*, 1998. **7**(12): p. 1887-92.
61. Shao, Y., K. Enkvist, and K. McCarthy, *Astroglial adrenergic receptors*, in *Astrocytes - Pharmacology and Function*, S. Murphy, Editor. 1993, Academic: San Diego, CA. p. 25-45.
62. Kimelberg, H.K., *Receptors on astrocytes--what possible functions?* *Neurochem Int*, 1995. **26**(1): p. 27-40.
63. Hansson, E., P. Simonsson, and C. Alling, *Interactions between cyclic AMP and inositol phosphate transduction systems in astrocytes in primary culture*. *Neuropharmacology*, 1990. **29**(6): p. 591-8.
64. Freshney, R.I., *Culture of animal cells - A manual of basic technique*. 1987, New York: Alan Liss.
65. Pagano, R.E. and O.C. Martin, *A series of fluorescent N-acylsphingosines: synthesis, physical properties, and studies in cultured cells*. *Biochemistry*, 1988. **27**(12): p. 4439-4445.
66. Pitt, J.C., *et al.*, *Haptenylation of antibodies during affinity purification: a novel and convenient procedure to obtain labeled antibodies for quantification and double labeling*. *Histochem Cell Biol*, 1998. **110**(3): p. 311-22.
67. Hellweg, R., C. Hock, and H.-D. Hartung, *An improved rapid and highly sensitive enzyme immunoassay for nerve growth factor*. *Technique-J Methods Cell Mol Biol*, 1989. **1**(1): p. 43-8.
68. Hellweg, R., *et al.*, *NGF level in the rat sciatic nerve is decreased after long-term consumption of ethanol*. *Neuroreport*, 1996. **7**(3): p. 777-80.
69. Meske, V., *et al.*, *The effects of beta/A4-amyloid and its fragments on calcium homeostasis, glial fibrillary acidic protein and S100beta staining, morphology and survival of cultured hippocampal astrocytes*. *Neuroscience*, 1998. **85**(4): p. 1151-1160.
70. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Extraction, purification and analysis of messenger RNA from eukariotic cells*, in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY.
71. Kafatos, F.C., C.W. Jones, and A. Efstratiadis, *Determination of nucleic acid sequence homologies und relative concentrations by a dot hybridization procedure*. *Nucleic Acids Res.*, 1979. **7**: p. 1541-1552.
72. Pike, C.J., *et al.*, *Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state*. *J.Neurosci.*, 1993. **13**(4): p. 1676-1687.
73. Mihalenko, G., R. Arias, and C.A. Boast, *Extension of a congo red spectrophotometric assay to characterize A-beta-aggregation*. *Soc Neurosci Abst*, 1995. **21**(1): p. 476.
74. Dory, L., *Post-transcriptional regulation of apolipoprotein E expression in mouse macrophages by phorbol ester*. *Biochem J*, 1993. **292**(Pt 1): p. 105-11.
75. Basheeruddin, K., C. Rechteris, and T. Mazzone, *Transcriptional and post-transcriptional control of apolipoprotein E gene expression in differentiating human monocytes [published erratum appears in J Biol Chem 1992 Aug 15;267(23):16746]*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(2): p. 1219-24.
76. Pearce, B., *et al.*, *Activation of muscarinic and of alpha 1-adrenergic receptors on astrocytes results in the accumulation of inositol phosphates*. *J Neurochem*, 1985. **45**(5): p. 1534-40.
77. Nathanson, N.M., *A multiplicity of muscarinic mechanisms: enough signaling pathways to take your breath away*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(12): p. 6245-7.
78. Hirst, W.D., *et al.*, *Identification of 5-hydroxytryptamine receptors positively coupled to*

- adenylyl cyclase in rat cultured astrocytes*. Br J Pharmacol, 1997. **120**(3): p. 509-15.
79. LaDu, M.J., et al., *Apolipoprotein E receptors mediate the effects of beta-amyloid on astrocyte cultures*. J Biol Chem, 2000. **275**(43): p. 33974-80.
 80. LaDu, M.J., et al., *Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors modulate A beta-induced glial neuroinflammatory responses*. Neurochem Int, 2001. **39**(5-6): p. 427-34.
 81. DeMattos, R.B., F.E. Thorngate, and D.L. Williams, *A test of the cytosolic apolipoprotein E hypothesis fails to detect the escape of apolipoprotein E from the endocytic pathway into the cytosol and shows that direct expression of apolipoprotein E in the cytosol is cytotoxic*. J Neurosci, 1999. **19**(7): p. 2464-73.
 82. Araujo, D.M. and C.W. Cotman, *Beta-amyloid stimulates glial cells in vitro to produce growth factors that accumulate in senile plaques in Alzheimer's disease*. Brain Res., 1992. **569**(1): p. 141-145.
 83. Barger, S.W. and L.J. Van Eldik, *S100 beta stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(14): p. 9689-94.
 84. Berridge, M.J., *Inositol trisphosphate and calcium signalling*. Nature, 1993. **361**(6410): p. 315-25.
 85. Ohm, T.G., J. Bohl, and B. Lemmer, *Reduced basal and stimulated (isoprenaline, Gpp(NH)p, forskolin) adenylyl cyclase activity in Alzheimer's disease correlated with histopathological changes*. Brain Res, 1991. **540**(1-2): p. 229-36.
 86. Ohm, T.G., et al., *Decrease in adenylyl cyclase activity antecedes neurofibrillary tangle formation*. Neurobiol Aging, 1997. **18**(3): p. 275-9.
 87. Cowburn, R.F., et al., *Adenylyl cyclase activity in postmortem human brain: evidence of altered G protein mediation in Alzheimer's disease*. J Neurochem, 1992. **58**(4): p. 1409-19.
 88. Cowburn, R.F., et al., *Disrupted beta 1-adrenoceptor-G protein coupling in the temporal cortex of patients with Alzheimer's disease*. Neurosci Lett, 1993. **155**(2): p. 163-6.
 89. Schnecko, A., et al., *Adenylyl cyclase activity in Alzheimer's disease brain: stimulatory and inhibitory signal transduction pathways are differently affected*. Brain Res, 1994. **644**(2): p. 291-6.
 90. Shao, Y., M. Gearing, and S.S. Mirra, *Astrocyte-apolipoprotein E associations in senile plaques in Alzheimer disease and vascular lesions: a regional immunohistochemical study*. J.Neuropathol.Exp.Neurol., 1997. **56**(4): p. 376-381.
 91. Barres, B.A., L.L. Chun, and D.P. Corey, *Calcium current in cortical astrocytes: induction by cAMP and neurotransmitters and permissive effect of serum factors*. J Neurosci, 1989. **9**(9): p. 3169-75.
 92. Bernardo, A., et al., *Human immunodeficiency virus protein gp120 interferes with beta-adrenergic receptor-mediated protein phosphorylation in cultured rat cortical astrocytes*. Cell Mol Neurobiol, 1994. **14**(2): p. 159-73.
 93. Zielke, H.R., et al., *Effect of 8-bromo-cAMP and dexamethasone on glutamate metabolism in rat astrocytes*. Neurochem Res, 1990. **15**(11): p. 1115-22.
 94. Bridoux, A.M., et al., *Protein synthesis in astrocytes: 'spontaneous' and cyclic AMP-induced differentiation*. Dev Neurosci, 1986. **8**(1): p. 31-43.
 95. Cedazo-Minguez, A. and Hamker, U., et al., *Regulation of apolipoprotein E secretion in rat primary hippocampal astrocyte cultures*. Neuroscience, 2001. **105**(3): p. 651-61.
 96. Van Calker, D. and B. Hamprecht, *Effects of neurotransmitters in glial cells*, in *Advances in cellular neurobiology*, S. Dederoff and L. Hertz, Editors. 1980, Academic: New York. p. 223-241.

97. Evans, T., K.D. McCarthy, and T.K. Harden, *Regulation of cyclic AMP accumulation by peptide hormone receptors in immunocytochemically defined astroglial cells*. J Neurochem, 1984. **43**(1): p. 131-8.
98. Chuang, T.T., *et al.*, *G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications*. Trends Pharmacol Sci, 1996. **17**(11): p. 416-21.
99. Berg, D.T., D.S. Calnek, and B.W. Grinnell, *Trans-repressor BEF-1 phosphorylation. A potential control mechanism for human ApoE gene regulation*. J Biol Chem, 1996. **271**(9): p. 4589-92.
100. Castagna, M., *et al.*, *Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters*. J Biol Chem, 1982. **257**(13): p. 7847-51.
101. Gebicke-Haerter, P.J., *et al.*, *The phorbol ester TPA potentiates cholera toxin- and isoproterenol-stimulated cyclic AMP-synthesis in primary astrocyte cultures*. Neurochem Int, 1994. **24**(1): p. 1-12.
102. Patrizio, M., N. Slepko, and G. Levi, *Opposite regulation of adenylyl cyclase by protein kinase C in astrocyte and microglia cultures*. J Neurochem, 1997. **69**(3): p. 1267-77.
103. Imagawa, M., R. Chiu, and M. Karin, *Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP*. Cell, 1987. **51**(2): p. 251-60.
104. Masliah, E., *et al.*, *Differential involvement of protein kinase C isozymes in Alzheimer's disease*. J Neurosci, 1990. **10**(7): p. 2113-24.
105. Wang, H.Y., M.R. Pisano, and E. Friedman, *Attenuated protein kinase C activity and translocation in Alzheimer's disease brain*. Neurobiol Aging, 1994. **15**(3): p. 293-8.
106. Matsushima, H., *et al.*, *Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent protein kinase C changes in the brain of patients with Alzheimer's disease*. J Neurochem, 1996. **67**(1): p. 317-23.
107. Hansson, E., P. Simonsson, and C. Alling, *5-Hydroxytryptamine stimulates the formation of inositol phosphate in astrocytes from different regions of the brain*. Neuropharmacology, 1987. **26**(9): p. 1377-82.
108. Drouva, S.V., *et al.*, *Alpha 1-adrenergic receptor coupling with phospholipase-C is negatively regulated by protein kinase-C in primary cultures of hypothalamic neurons and glial cells*. Endocrinology, 1991. **129**(3): p. 1605-13.
109. Bakhit, C., *et al.*, *Increase in glia-derived nerve growth factor following destruction of hippocampal neurons*. Brain Res, 1991. **560**(1-2): p. 76-83.
110. Goss, J.R., *et al.*, *Astrocytes are the major source of nerve growth factor upregulation following traumatic brain injury in the rat*. Exp Neurol, 1998. **149**(2): p. 301-9.
111. D'Mello, S.R. and G. Heinrich, *Induction of nerve growth factor gene expression by 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate*. J Neurochem, 1990. **55**(2): p. 718-21.
112. Neveu, I., *et al.*, *Activation of nerve growth factor synthesis in primary glial cells by phorbol 12-myristate 13-acetate: role of protein kinase C*. Brain Res, 1992. **570**(1-2): p. 316-22.
113. Galve-Roperh, I., *et al.*, *Regulation of nerve growth factor secretion and mRNA expression by bacterial lipopolysaccharide in primary cultures of rat astrocytes*. J Neurosci Res, 1997. **49**(5): p. 569-75.
114. Jehan, F., *et al.*, *Interactions between second messenger pathways influence NGF synthesis in mouse primary astrocytes*. Brain Res, 1995. **672**(1-2): p. 128-36.
115. Hellweg, R., *et al.*, *Nerve growth factor synthesis in cultured rat iris: modulation by endogenous transmitter substances*. Exp Cell Res, 1988. **179**(1): p. 18-30.

116. Poduri, A., *et al.*, *Apolipoprotein E4 and beta amyloid in senile plaques and cerebral blood vessels of aged rhesus monkeys*. *Am.J.Pathol.*, 1994. **144**(6): p. 1183-1187.
117. Uchihara, T., *et al.*, *ApoE immunoreactivity and microglial cells in Alzheimer's disease brain*. *Neurosci.Lett.*, 1995. **195**(1): p. 5-8.
118. LaDu, M.J., *et al.*, *Association of human, rat, and rabbit apolipoprotein E with beta-amyloid*. *J.Neurosci.Res.*, 1997. **49**(1): p. 9-18.
119. Golabek, A.A., *et al.*, *The interaction between apolipoprotein E and Alzheimer's amyloid beta-peptide is dependent on beta-peptide conformation*. *J.Biol.Chem.*, 1996. **271**(18): p. 10602-10606.
120. Wisniewski, T., *et al.*, *Apolipoprotein E: binding to soluble Alzheimer's beta-amyloid*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 1993. **192**(2): p. 359-365.
121. Naslund, J., *et al.*, *Characterization of stable complexes involving apolipoprotein E and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease brain*. *Neuron*, 1995. **15**(1): p. 219-28.
122. Iadonato, S.P., *et al.*, *Interaction of a 39 kDa protein with the low-density-lipoprotein-receptor-related protein (LRP) on rat hepatoma cells*. *Biochem J*, 1993. **296**(Pt 3): p. 867-75.
123. Medh, J.D., *et al.*, *The 39-kDa receptor-associated protein modulates lipoprotein catabolism by binding to LDL receptors*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(2): p. 536-40.
124. Krieger, M. and J. Herz, *Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)*. *Annu Rev Biochem*, 1994. **63**: p. 601-37.
125. Bu, G., *Receptor-associated protein: a specialized chaperone and antagonist for members of the LDL receptor gene family*. *Curr Opin Lipidol*, 1998. **9**(2): p. 149-55.
126. Soulie, C., *et al.*, *Synthesis of apolipoprotein E (ApoE) mRNA by human neuronal-type SK N SH-SY 5Y cells and its regulation by nerve growth factor and ApoE*. *Neurosci Lett*, 1999. **265**(2): p. 147-50.
127. Bales, K.R., *et al.*, *Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition [letter] [see comments]*. *Nat Genet*, 1997. **17**(3): p. 263-4.
128. Harrigan, M.R., *et al.*, *Beta amyloid is neurotoxic in hippocampal slice cultures*. *Neurobiol Aging*, 1995. **16**(5): p. 779-89.
129. Pike, C.J., *et al.*, *Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity*. *J.Neurochem.*, 1995. **64**(1): p. 253-265.
130. Castano, E.M., *et al.*, *In vitro formation of amyloid fibrils from two synthetic peptides of different lengths homologous to Alzheimer's disease beta-protein*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 1986. **141**(2): p. 782-789.
131. Gorevic, P.D., *et al.*, *Ten to fourteen residue peptides of Alzheimer's disease protein are sufficient for amyloid fibril formation and its characteristic x-ray diffraction pattern*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987. **147**(2): p. 854-62.
132. Kirschner, D.A., *et al.*, *Synthetic peptide homologous to beta protein from Alzheimer disease forms amyloid-like fibrils in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(19): p. 6953-7.
133. Fraser, P.E., *et al.*, *pH-dependent structural transitions of Alzheimer amyloid peptides*. *Biophys J*, 1991. **60**(5): p. 1190-201.
134. Fraser, P.E., *et al.*, *Morphology and antibody recognition of synthetic beta-amyloid peptides*. *J Neurosci Res*, 1991. **28**(4): p. 474-85.
135. Halverson, K., *et al.*, *Molecular determinants of amyloid deposition in Alzheimer's*

- disease: conformational studies of synthetic beta-protein fragments. *Biochemistry*, 1990. **29**(11): p. 2639-44.
136. Spencer, R.G., et al., *An unusual peptide conformation may precipitate amyloid formation in Alzheimer's disease: application of solid-state NMR to the determination of protein secondary structure*. *Biochemistry*, 1991. **30**(43): p. 10382-7.
137. Hilbich, C., et al., *Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease*. *J Mol Biol*, 1991. **218**(1): p. 149-63.
138. Barrow, C.J. and M.G. Zagorski, *Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition*. *Science*, 1991. **253**(5016): p. 179-82.
139. Barrow, C.J., et al., *Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra*. *J Mol Biol*, 1992. **225**(4): p. 1075-93.
140. Burdick, D., et al., *Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(1): p. 546-54.
141. Puttfarcken, P.S., et al., *Effect of apolipoprotein E on neurite outgrowth and beta-amyloid-induced toxicity in developing rat primary hippocampal cultures*. *J Neurochem*, 1997. **68**(2): p. 760-9.
142. Castano, E.M., et al., *Fibrillogenesis in Alzheimer's disease of amyloid beta peptides and apolipoprotein E*. *Biochem J*, 1995. **306**(Pt 2): p. 599-604.
143. Griffin, W.S., et al., *Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(19): p. 7611-5.
144. Jorgensen, O.S., B.W. Brooksbank, and R. Balazs, *Neuronal plasticity and astrocytic reaction in Down syndrome and Alzheimer disease*. *J Neurol Sci*, 1990. **98**(1): p. 63-79.
145. Pena, L.A., C.W. Brecher, and D.R. Marshak, *beta-Amyloid regulates gene expression of glial trophic substance S100 beta in C6 glioma and primary astrocyte cultures*. *Brain Res.Mol.Brain Res.*, 1995. **34**(1): p. 118-126.
146. Messmer-Joudrier, S., et al., *Injury-induced synthesis and release of apolipoprotein E and clusterin from rat neural cells*. *Eur J Neurosci*, 1996. **8**(12): p. 2652-61.
147. Mattson, M.P., K.J. Tomaselli, and R.E. Rydel, *Calcium-destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated beta-amyloid peptide are attenuated by basic FGF*. *Brain Res.*, 1993. **621**(1): p. 35-49.

7 Danksagung

Prof. Dr. Thomas Georg Ohm möchte ich für die Überlassung dieses Dissertationsthemas und die fachliche Diskussion danken.

Bei Prof. Dr. Harald Saumweber für möchte ich mich für die Betreuung der Arbeit von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät bedanken.

Der DFG danke ich, da sie diese Arbeit durch die Förderung im Rahmen eines SFB ermöglichte

Bei der Arbeit an der Dissertationsschrift habe ich von verschiedenen Menschen Unterstützung erhalten, für die ich mich an dieser Stelle bedanken möchte:

Frank Albert für die professionelle Herstellung und Kultivierung der Astrozytenkulturen

Priv. Doz. Dr. Otto Baumann für die fachliche Diskussion, das Korrekturlesen, die Gastfreundschaft und seine Engelsgeduld!!!

PhD Angel Cedazo-Minguez, für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die fachliche Diskussion

PhD Richard Cowburn für die freundliche Aufnahme während eines vierwöchigen Forschungsbesuchs in seinem Labor

Priv. Doz. Dr. Rainer Hellweg für die NGF-Messungen und die fachliche Diskussion

Dr. Gabriele Menzel, Hauptbibliothek der Charité, für die Unterstützung bei der Literaturbeschaffung

Dr. Volker Meske für die fachliche Diskussion

Dr. Eva Simbürger für die fachliche Diskussion, die Unterstützung bei der Literaturbeschaffung, die Hilfe bei der Erstellung einiger Grafiken, ihre Gastfreundschaft und ihre freundliche Ermunterung

Besonderer Dank gilt

meinem Mann Christian für die immerwährende, hartnäckige Unterstützung

und meiner Mutter für mehrmalige Besuche zum Kinderhüten, ohne die ich die Arbeit nicht hätte beenden können.

8 Anhang

8.1 Wirkung verschiedener dBcAMP Konzentrationen auf ApoE

| | ApoE als Mittelwerte \pm Standardabweichungen in % der Kontrolle | | |
|-------------------------------------|--|------------------|-----------------|
| | 5 h | 24 h | 48 h |
| Kontrolle | 100 \pm 5 | 100 \pm 6 | 100 \pm 2 |
| 100 μM dBcAMP | 99 \pm 6 | 121 \pm 12 * | 124 \pm 8 * |
| 500 μM dBcAMP | 99 \pm 7 | 137 \pm 10 *** | 144 \pm 2 *** |
| 1 mM dBcAMP | 125 \pm 8 * | 149 \pm 14 *** | 182 \pm 3 *** |

Tabelle 10: Im Medium gemessene ApoE-Konzentrationen von Astrozyten, die mit verschiedenen Konzentrationen (100 μ M, 500 μ M und 1 mM) von dBcAMP inkubiert worden waren zu den Zeitpunkten 5, 24 und 48 h. ApoE-Konzentrationen, ausgedrückt in Prozent des PBS-Kontrollwerts zu den jeweiligen Messzeitpunkten, sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Zahl der Experimente war n = 5. Signifikanzen wurden über ANOVA, gefolgt von Fisher post-hoc-Test ermittelt: * $P < 0,05$ und *** $P < 0,001$ bezogen auf den PBS-Kontrollwert.

8.2 Wirkung von dBcAMP und RA auf die ApoE-Konzentration

| | ApoE als Mittelwerte \pm Standardabweichungen in % der Kontrolle | | |
|-------------------------------|--|------------------|------------------|
| | 5 h | 24 h | 48 h |
| Kontrolle | 100 \pm 16 | 100 \pm 7 | 100 \pm 2 |
| RA 1 μM | 102 \pm 17 | 112 \pm 9 * | 104 \pm 7 * |
| dBcAMP 1 mM | 131 \pm 7 | 152 \pm 6 *** | 177 \pm 5 *** |
| RA/dBcAMP | 155 \pm 24 *** | 287 \pm 15 ### | 298 \pm 11 +++ |

Tabelle 11: Im Medium gemessene ApoE-Konzentrationen von Astrozyten, die mit dBcAMP und RA allein als auch gleichzeitig inkubiert worden waren zu den Messzeitpunkten 5, 24 und 48 h. ApoE-Konzentrationen, ausgedrückt in Prozent des PBS-Kontrollwerts zu den jeweiligen Messzeitpunkten, sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Zahl der Experimente war n = 5. Signifikanzen wurden über ANOVA, gefolgt von Fisher post-hoc-Test ermittelt: *** $P < 0,001$ bezogen auf die Kontrolle, ### $P < 0,001$ bezogen auf dBcAMP, 1 mM, 24 h, +++ $P < 0,001$ bezogen auf dBcAMP, 1 mM, 48 h.

8.3 Wirkung von Isoproterenol und Clonidine auf die ApoE-Konzentration

| | ApoE als Mittelwerte \pm Standardabweichungen in % der Kontrolle | | |
|------------------------------|--|---------------------|------------------|
| | 5 h | 24 h | 48 h |
| Kontrolle | 100,0 \pm 5,1 | 100,0 \pm 6,9 | 100,0 \pm 5,5 |
| Isoproterenol 50 nM | 122,5 \pm 10,1 * | 139,8 \pm 10,9 ** | 94,7 \pm 5,7 |
| 500 nM | 108,6 \pm 12,8 | 109,0 \pm 11,1 | 94,8 \pm 8,1 |
| 1 μM | 108,2 \pm 9,2 | 117,7 \pm 2,9 | 111,8 \pm 9,5 |
| Kontrolle | 100,0 \pm 8,0 | 100,0 \pm 5,1 | 100,0 \pm 6,5 |
| Clonidine 25 nM | 75,2 \pm 6,8 * | 81,0 \pm 9,6 | 82,2 \pm 5,9 * |
| 250 nM | 76,9 \pm 12,2 | 76,7 \pm 5,0 ** | 85,8 \pm 6,0 |
| 2,5 μM | 87,7 \pm 6,5 | 81,3 \pm 5,3 * | 89,8 \pm 6,1 |

Tabelle 12: Im Medium gemessene ApoE-Konzentrationen von Astrozyten, die mit verschiedenen Konzentrationen von Isoproterenol und Clonidine inkubiert worden waren zu den Messzeitpunkten 5, 24 und 48 h. ApoE-Konzentrationen, ausgedrückt in Prozent des PBS-Kontrollwerts zu den jeweiligen Messzeitpunkten, sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von n = 3 bis 6 Experimenten. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe ANOVA gefolgt von Fisher post-hoc-Test ermittelt. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ bezogen auf den jeweiligen PBS-Kontrollwert.

8.4 Wirkung von PMA auf die ApoE-Konzentration

| | ApoE als Mittelwerte \pm Standardabweichungen in % der Kontrolle | | |
|-------------------|--|------------------|-------------------|
| | 5 h | 24 h | 48 h |
| Kontrolle | 100,0 \pm 10,2 | 100,0 \pm 6,7 | 100,0 \pm 4,3 |
| PMA 16 nM | 111,9 \pm 8,5 | 93,0 \pm 4,4 | 95,6 \pm 4,3 |
| PMA 160 nM | 90,4 \pm 9,6 | 85,8 \pm 4,0 | 85,2 \pm 4,1 |
| PMA 480 nM | 83,8 \pm 6,9 | 71,8 \pm 4,1 * | 59,4 \pm 3,8 ** |

Tabelle 13: ApoE-Konzentrationen von Astrozyten die für 5, 24 und 48 h mit verschiedenen Konzentrationen von PMA inkubiert worden waren. ApoE-Konzentrationen, ausgedrückt in Prozent des PBS-Kontrollwerts zu den jeweiligen Messzeitpunkten, sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Zahl der Experimente war $n = 4$. Signifikanzen wurden über ANOVA, gefolgt von Fisher post-hoc-Test ermittelt: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ bezogen auf den jeweiligen PBS-Kontrollwert.

8.5 Wirkung von PMA auf den dBcAMP vermittelten Anstieg der ApoE-Konzentration

| | ApoE als Mittelwerte \pm Standardabweichungen in % der Kontrolle | | |
|--------------------------|--|---------------------|---------------------|
| | 5 h | 24 h | 48 h |
| Kontrolle | 100,0 \pm 10,2 | 100,0 \pm 6,7 | 100,0 \pm 4,3 |
| dBcAMP 1 mM | 131,1 \pm 7,3 | 151,8 \pm 5,8 *** | 176,9 \pm 5,4 *** |
| PMA 16 nM | 111,9 \pm 8,5 | 93,0 \pm 4,4 | 95,6 \pm 4,3 |
| dBcAMP+16 nM PMA | 99,3 \pm 6,5 # | 93,8 \pm 19,4 # | 90,1 \pm 4,2 ## |
| PMA 480 nM | 83,8 \pm 6,9 | 71,8 \pm 4,1 * | 59,4 \pm 3,8 ** |
| dBcAMP+480 nM PMA | 91,6 \pm 5,5 ## | 86,8 \pm 4,4 ### | 66,7 \pm 8,2 ### |

Tabelle 14: ApoE-Konzentrationen von Astrozyten die für 5, 24 und 48 h mit verschiedenen Konzentrationen von PMA und cAMP allein oder gleichzeitig inkubiert worden waren. ApoE-Konzentrationen, ausgedrückt in Prozent des PBS-Kontrollwerts zu den jeweiligen Messzeitpunkten, sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n = 3$ Experimenten. Die Signifikanzen wurden über einen zweiseitigen t-Test (Student) ermittelt: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ verglichen mit der ApoE-Konzentration der Kontrolle. # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ verglichen mit der ApoE-Konzentration des dBcAMP.

8.6 Wirkung von RA und PMA auf den dBcAMP vermittelten Anstieg der ApoE-mRNA-Expression

| | ApoE-mRNA als Mittelwerte \pm Standardabweichungen | | | |
|--------------------|--|--------------------|-------------------|-------------------|
| | 1 h | 6 h | 24 h | 48 h |
| Kontrolle | 100,0 \pm 11,4 | 100,0 \pm 9,4 | 100,0 \pm 13,0 | 100,0 \pm 3,5 |
| dBcAMP | 203,2 \pm 31,3 *** | 109,3 \pm 24,1 | 64,9 \pm 16,7 | 66,6 \pm 6,0 |
| RA | 75,3 \pm 31,0 | 139,9 \pm 20,6 * | 139,3 \pm 17,5 | 87,3 \pm 37,6 |
| dBcAMP /RA | 140,1 \pm 7,6 | 129,1 \pm 37,0 | 103,9 \pm 27,0 | 80,1 \pm 10,7 |
| PMA | 22,2 \pm 3,1 ** | 65,5 \pm 6,2 | 46,9 \pm 14,1 * | 104,7 \pm 6,3 |
| dBcAMP /PMA | 74,1 \pm 11,5 | 42,0 \pm 21,8 * | 44,5 \pm 5,3 * | 45,8 \pm 10,9 * |

Tabelle 15: Auswirkungen von dBcAMP, RA und PMA auf die ApoE-mRNA-Expression in primären Ratten Astrozytenkulturen. Die ApoE-mRNA Mengen wurden nach Inkubation der Zellen mit 1 mM dBcAMP, 1 μ M RA oder 480 nM PMA allein sowie 1mM dBcAMP/1 μ M RA oder 1 mM dBcAMP/480 nM PMA in Kombination zu den Zeitpunkten 1, 6, 24 und 48 h gemessen. Die einzelnen Werte wurden normalisiert, indem die Messwerte für ApoE-mRNA durch die Messwerte von Aktin-mRNA derselben Zellpopulation dividiert wurden. Die hier geschilderten Daten sind die Differenzen (ApoE/Aktin) in % der PBS-Kontrolle zu den jeweiligen Messzeitpunkten. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von n = 3 Experimenten. Jede Substanz und Kombination wurde im Dreifachansatz gemessen. Signifikanzen wurden mit ANOVA gefolgt von Fisher post-hoc Test errechnet. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

8.7 Wirkung von Arterenol, Carbachol und Serotonin auf die ApoE-Konzentration

| | | ApoE als Mittelwerte \pm Standardabweichungen in % der Kontrolle) | | |
|------------------|------------------------------|---|------------------|------------------|
| | | 5 h | 24 h | 48 h |
| Kontrolle | | 100,0 \pm 4,8 | 100,0 \pm 6,9 | 100,0 \pm 2,7 |
| Arterenol | 1 μM | 137,0 \pm 13,3 * | 100,5 \pm 8,1 | 89,9 \pm 1,5 |
| | 10 μM | 134,6 \pm 18,7 | 91,5 \pm 8,4 | 82,5 \pm 2,8 |
| | 100 μM | 119,1 \pm 10,9 | 103,9 \pm 15,5 | 90,6 \pm 2,4 |
| Kontrolle | | 100,0 \pm 8,0 | 100,0 \pm 6,4 | 100,0 \pm 5,5 |
| Carbachol | 10 μM | 118,9 \pm 11,2 | 93,1 \pm 6,4 | 82,1 \pm 5,6 * |
| | 100 μM | 101,2 \pm 13,8 | 101,0 \pm 6,2 | 85,8 \pm 6,0 * |
| | 1 mM | 110,0 \pm 5,6 | 91,2 \pm 7,9 | 89,9 \pm 5,1 |
| Kontrolle | | 100,0 \pm 8,2 | 100,0 \pm 10,0 | 100,0 \pm 11,8 |
| Serotonin | 2,5 μM | 130,1 \pm 9,2 * | 101,8 \pm 10,4 | 87,3 \pm 5,6 |
| | 25 μM | 113,0 \pm 18,4 | 104,0 \pm 10,4 | 97,8 \pm 2,0 |
| | 250 μM | 86,5 \pm 19,0 | 85,0 \pm 5,5 | 94,0 \pm 3,0 |

Tabelle 16: ApoE-Konzentrationen von Astrozyten die für 5, 24 und 48 h mit verschiedenen Konzentrationen von Arterenol, Carbachol und Serotonin inkubiert worden waren. ApoE-Konzentrationen, ausgedrückt in Prozent des PBS-Kontrollwerts zu den jeweiligen Messzeitpunkten, sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von n = 3 bis 6 Experimenten. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe ANOVA gefolgt von Fisher post-hoc-Test ermittelt. * $P < 0,05$ bezogen auf die jeweilige Kontrolle.

8.8 Wirkung von Isoproterenol und Arterenol auf die ApoE-Konzentration

| | | ApoE als Mittelwerte \pm Standardabweichungen in % der Kontrolle | | |
|---------------------------------|------------------------------------|--|---------------------|-----------------|
| | | 5 h | 24 h | 48 h |
| Kontrolle | | 100,0 \pm 5,1 | 100,0 \pm 6,9 | 100,0 \pm 5,5 |
| Isoproterenol | 50 nM | 122,5 \pm 10,1 * | 139,8 \pm 10,9 ** | 94,7 \pm 5,7 |
| | 500 nM | 108,6 \pm 12,8 | 109,0 \pm 11,1 | 94,8 \pm 8,1 |
| | 1 μM | 108,2 \pm 9,2 | 117,7 \pm 2,9 | 111,8 \pm 9,5 |
| Kontrolle | | 100,0 \pm 5,8 | 100,0 \pm 5,1 | 100,0 \pm 6,1 |
| Arterenol | 1 μM | 137,0 \pm 13,3 * | 100,5 \pm 8,1 | 89,9 \pm 1,5 |
| | 10 μM | 134,6 \pm 18,7 | 91,5 \pm 8,4 | 82,5 \pm 2,8 |
| | 100 μM | 119,1 \pm 10,9 | 103,9 \pm 15,5 | 90,6 \pm 2,4 |
| Kontrolle | | 100,0 6,6 | 100,0 4,7 | - |
| Isoproterenol | 50 nM | 128,6 7,8 * | 130,0 6,6 * | - |
| Arterenol | 10 μM | 125,6 12,6 | 102,3 8,1 | - |
| Isoproterenol/ Arterenol | 50 nM/ 10 μM | 175,6 18,6 ** | 141,7 10,4 | - |

Tabelle 17: ApoE-Konzentrationen von Astrozyten die für 5, 24 und 48 h mit 50, 500 nM und 1 μ M Isoproterenol oder 1, 10 nM und 100 μ M Arterenol inkubiert wurden. Desweiteren wurden Astrozyten über einen Zeitraum von 24 h mit 50 nM Isoproterenol, 10 μ M Arterenol oder einer Kombination von beiden inkubiert. Die Daten wurden als Prozente des jeweiligen Kontrollwerts angegeben und sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von n = 3 bis 6 Experimenten. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe ANOVA gefolgt von Fisher post-hoc-Test ermittelt. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert. *** $P < 0,01$ bezogen auf die ApoE-Konzentration des Isoproterenol. Jede Substanz und jede Dosis wurden im Dreifachansatz getestet.

8.9 Wirkung von Isoproterenol und Serotonin auf die ApoE-Konzentration

| | | ApoE als Mittelwerte \pm Standardabweichungen in % der Kontrolle | | |
|-----------------------------|-----------------------|--|---------------------|------------------|
| | | 5 h | 24 h | 48 h |
| Kontrolle | | 100,0 \pm 5,1 | 100,0 \pm 6,9 | 100,0 \pm 5,5 |
| Isoproterenol | 50 nM | 122,5 \pm 10,1 * | 139,8 \pm 10,9 ** | 94,7 \pm 5,7 |
| | 500 nM | 108,6 \pm 12,8 | 109,0 \pm 11,1 | 94,8 \pm 8,1 |
| | 1 μ M | 108,2 \pm 9,2 | 117,7 \pm 2,9 | 111,8 \pm 9,5 |
| Kontrolle | | 100,0 \pm 8,2 | 100,0 \pm 10,0 | 100,0 \pm 11,8 |
| Serotonin | 2,5 μ M | 130,1 \pm 9,2 * | 101,8 \pm 10,4 | 87,3 \pm 5,6 |
| | 25 μ M | 113,0 \pm 18,4 | 104,0 \pm 10,4 | 97,8 \pm 2,0 |
| | 250 μ M | 86,5 \pm 19,0 | 85,0 \pm 5,5 | 94,0 \pm 3,0 |
| Kontrolle | | 100,0 6,6 | 100,0 4,7 | - |
| Isoproterenol | 50 nM | 128,6 7,8 * | 130,0 6,6 * | - |
| Serotonin | 2,5 μ M | 123,6 12,8 | 106,3 5,1 | - |
| Isoproterenol/ Serotonin | 50 nM/ 2,5 μ M | 132,6 2,4 * | 116,7 8,8 | - |

Tabelle 18: ApoE-Konzentrationen von Astrozyten die für 5, 24 und 48 h mit 50, 500 nM und 1 μ M Isoproterenol oder 2,5, 25 und 250 μ M Serotonin inkubiert wurden. Desweiteren wurden Astrozyten über einen Zeitraum von 24 h mit 50 nM Isoproterenol, 2,5 μ M Serotonin oder einer Kombination von beiden inkubiert. Die Daten wurden als Prozente des jeweiligen Kontrollwerts angegeben und sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von n = 3 bis 6 Experimenten. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe ANOVA gefolgt von Fisher post-hoc-Test ermittelt. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert. ### $P < 0,01$ bezogen auf die ApoE-Konzentration des Isoproterenol. Jede Substanz und jede Dosis wurden im Dreifachansatz getestet.

8.10 Vergleich der ApoE- und NGF-Konzentrationen bei Inkubation mit dBcAMP, RA und PMA

| Zeitpunkt 48 h | Mittelwerte \pm Standardabweichungen in % der jeweiligen Kontrolle | |
|-----------------------|--|----------------------|
| | ApoE | NGF |
| Kontrolle | 100,0 \pm 2,3 | 100,0 \pm 15,6 |
| dBcAMP 1 mM | 176,9 \pm 5,4 *** | 56,1 \pm 11,6 *** |
| RA 1 μ M | 103,8 \pm 7,1 | 52,9 \pm 3,7 *** |
| dBcAMP/RA | 297,5 \pm 10,9 ### | 91,6 \pm 17,0 |
| Isoproterenol 50 nM | 94,7 \pm 5,7 | 68,3 \pm 13,4 * |
| Clonidine 25 nM | 82,2 \pm 5,9 * | 110,0 \pm 10,7 |
| PMA 480 nM | 59,4 \pm 3,8 ** | 185,8 \pm 49,5 *** |
| dBcAMP/PMA | 66,7 \pm 8,2 ** | 213,6 \pm 81,9 ** |
| Arterenol 10 μ M | 82,5 \pm 2,8 | 56,6 \pm 12,8 ** |
| Carbachol 10 μ M | 82,5 \pm 5,6 ** | 95,1 \pm 25,4 |
| Serotonin 2,5 μ M | 87,3 \pm 5,6 | 85,4 \pm 7,8 |

Tabelle 19: ApoE- und NGF-Konzentrationen von Astrozyten die für 48 h mit dBcAMP (1 mM), RA (1 μ M) und deren Kombinationen dBcAMP (1 mM)/RA (1 μ M), Isoproterenol (50 nM), Clonidine (25 nM), und PMA (480 nM) und der Kombination dBcAMP (1 mM)/PMA (480 nM) Arterenol (10 μ M), Carbachol (10 μ M) und Serotonin (2,5 μ M) inkubiert worden waren. ApoE- und NGF-Konzentrationen, ausgedrückt in Prozent des PBS-Kontrollwerts zum Messzeitpunkt, sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von n = 3 Experimenten. Die Signifikanz wurden über einen zweiseitigen t-Test (Student) ermittelt: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ verglichen mit der NGF- bzw. ApoE-Konzentration der Kontrolle. # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ verglichen mit der ApoE-Konzentration des dBcAMP. Jede Substanz wurde im Dreifachansatz getestet.

8.11 Wirkung der verschiedenen Amyloid-Fragmente auf die ApoE-Konzentration im Medium

| Zeit | 1-11 | 1-16 | 1-28 | 1-38 | 1-40 | 1-42 | 1-43 | 10-20 | 12-28 | 22-35 | 25-35 | 40-1 | Kontrolle |
|------|--------------|-------------|-------------|------------|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| 24 h | 121 \pm 33 | 99 \pm 24 | 59 \pm 31 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | 1 \pm 2 | 55 \pm 28 | 38 \pm 36 | 31 \pm 26 | 23 \pm 32 | 22 \pm 26 | 100 \pm 27 |
| 48 h | 121 \pm 21 | 99 \pm 20 | 60 \pm 31 | 1 \pm 2 | 1 \pm 1 | 0 \pm 0 | 1 \pm 1 | 70 \pm 31 | 44 \pm 43 | 55 \pm 36 | 40 \pm 41 | 45 \pm 31 | 100 \pm 18 |
| 72 h | 118 \pm 15 | 94 \pm 14 | 77 \pm 29 | 6 \pm 11 | 3 \pm 6 | 2 \pm 4 | 1 \pm 1 | 84 \pm 40 | 42 \pm 40 | 65 \pm 37 | 58 \pm 50 | 45 \pm 31 | 100 \pm 15 |

Tabelle 20: Gemessene ApoE-Konzentrationen (als % des PBS-Kontrollwerts) im Medium von Astrozyten-Primärkulturen, die über 72 h mit verschiedenen Amyloid-Fragmenten (10 μ M) inkubiert worden waren (Mittelwerte \pm Standardabweichung). ApoE-Konzentrationen, ausgedrückt in Prozent des PBS-Kontrollwerts zu den jeweiligen Messzeitpunkten (24, 48 und 72 h), sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Dabei wird die gemessene ApoE-Konzentration der PBS-Kontrolle zum jeweiligen Messzeitpunkt als 100 % definiert. Die Zahl der Experimente war n = 9 für β /A4(1-11), (1-28) und (1-38): n = 12 für β /A4(1-16), (1-40), (1-42), (10-20) und

(40-1); n = 15 für β /A4(1-43), (12-28) und (22-35); n = 18 für β /A4(25-35) sowie n = 24 für die PBS-Kontrolle.

| Signifikanz gegenüber | Zeitpunkt | 1-11 | 1-16 | 1-28 | 1-38 | 1-40 | 1-42 | 1-43 | 10-20 | 12-28 | 22-35 | 25-35 | 40-1 |
|-----------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|------|
| Kontrolle | 24 h | - | - | ** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| | 48 h | * | - | *** | *** | *** | *** | *** | ** | *** | *** | *** | *** |
| | 72 h | ** | - | * | *** | *** | *** | *** | - | *** | *** | *** | *** |
| β /A4(40-1) | 24 h | ### | ### | # | - | # | # | # | # | - | - | - | - |
| | 48 h | ### | ### | - | ## | ### | ### | ### | - | - | - | - | - |
| | 72 h | ### | ### | - | ## | ### | ### | ### | # | - | - | - | - |

Tabelle 21: Statistischen Signifikanzen der ApoE-Konzentration im Kulturmedium bezüglich der PBS-Kontrolle und der reversen Sequenz in bei Inkubation der Astrozyten-Primärkulturen mit jeweils 10 μ M der verschiedenen Amyloid-Fragmente. Die Zahl der Experimente war n = 9 für β /A4(1-11), (1-28) und (1-38); n = 12 für β /A4(1-16), (1-40), (1-42), (10-20) und (40-1); n = 15 für β /A4(1-43), (12-28) und (22-35); n = 18 für β /A4(25-35) sowie n = 24 für die PBS-Kontrolle. Die Berechnung der statistischen Signifikanzen erfolgte über einen zweiseitigen T-Test (Student) mittels STATVIEW. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ bezogen auf die Werte der PBS-Kontrolle. # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ und ### $P < 0,001$ bezogen auf die reverse Sequenz β /A4(40-1).

8.12 Wirkung der verschiedenen Amyloid-Fragmente auf die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration zum Zeitpunkt 72 h

| Amyloid-Fragmente | Ca ²⁺ als Mittelwerte ± Standardabweichungen in nM | | |
|----------------------|---|------|------|
| (1-11) | 112,3 ± 5,2 | | |
| (1-16) | 112,3 ± 6,2 | | |
| (1-28) | 109,1 ± 7,0 | | |
| (1-38) | 112,9 ± 5,5 | | |
| (1-40) | 86,9 ± 2,6 | *** | ### |
| (1-42) | 93,7 ± 8,0 | ** | ## |
| (1-43) | 96,5 ± 4,2 | * | # |
| (10-20) | 87,9 ± 3,2 | **** | #### |
| (12-28) | 102,0 ± 6,1 | | |
| (22-35) | 108,0 ± 8,7 | | |
| (25-35) | 91,4 ± 7,2 | ** | ## |
| (40-1) | 118,6 ± 9,9 | | |
| dBcAMP | 89,3 ± 6,7 | * | # |
| PBS-Kontrolle | 116,8 ± 7,7 | | |

Tabelle 22: Intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen in Astrozyten-Primärkulturen, die über 72 h mit verschiedenen Amyloid-Fragmenten (10 µM) inkubiert worden waren. Ca²⁺-Konzentrationen in [nM] sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Die Berechnung der statistischen Signifikanzen erfolgte über einen zweiseitigen T-Test (Student) mittels STATVIEW. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 und ****P < 0,002 bezogen auf die Werte der PBS-Kontrolle. #P < 0,05, ##P < 0,01, ###P < 0,001 und ####P < 0,002 bezogen auf die reverse Sequenz β/A4(40-1).

8.13 NGF-Werte von PBS-Kontrolle und Inkubation mit $\beta/A4(1-40)$

| NGF in pg/ml | Kontrolle | | $\beta/A4(1-40)$ | |
|-------------------------|------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|
| | Einzelwerte | Mittelwert \pm St.Abw. | Einzelwerte | Mittelwert \pm St.Abw. |
| Medium-Überstand | 24 11 23 | 19 \pm 7 | 283 21 356 | 220 \pm 176 |
| Debris | 45 109 222 | 125 \pm 89 | 213 166 3703 | 1360 \pm 2029 |
| Zytosol | 43 n.n. 54 | 48 \pm 8 | 305 140 2905 | 1116 \pm 1551 |
| Vesikel | 6 n.n. 12 | 9 \pm 4 | 75 13 119 | 69 \pm 53 |

Tabelle 23: NGF-Werte in pg/ml in Medium-Überstand, Debris-, Zytosol- und Vesikel-Fractionen von Astrozyten-Primärkulturen, die über einen Messzeitraum von 72 h mit PBS zur Kontrolle und $\beta/A4(1-40)$ inkubiert worden waren. Anzahl der Experimente n = 3. n.n. steht für nicht nachweisbar.

9 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht.

Schwabach, 09.03.2004

Ulrike Hamker

10 Lebenslauf

Name: Ulrike Hamker, geb. Heydrich

Geboren: 02.06.1965 in München

28.06.1985 Allgemeine Hochschulreife

1986-1987 Studium Maschinenbau, Technische Universität München, Bayern

1988-1993 Studium Lehramt an Gymnasien für Biologie und Chemie 1988-1990, dann Biologie Diplom, beides Universität Ulm

1993-1994 Diplomarbeit: Untersuchung frühembryonaler Entwicklungsvorgänge an *Xenopus laevis* nach Mikroinjektion von Antikörpern sowie Antisense-DNA gegen das gap junction Protein Connexin43
am Institut für Anatomie der Universität Regensburg

04.10.1994 Diplom Biologie

1994-1995 Applied Science Laboratories (ASL) Deutschland, Wörthsee, Bayern, Vertrieb Medizinischer Infrarottechnologie zur Diagnostik der Alzheimerschen Krankheit

1994-1999 Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt Universität zu Berlin
Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Anatomie, Charité, AG Zell- und Neurobiologie Humboldt Universität zu Berlin

Schwabach, 02.03.2004

Ulrike Hamker