

Aus der Klinik für Neurologie

Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Hermann Oertel
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Titel der Dissertation:

**Effekte des MAP Kinase Inhibitors CNI-1493 auf
Amyloid beta behandelte primäre mikrogläre und
neuronale Zellen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Roman Sankowski

aus Zelinograd/ Kasachstan

Marburg 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
23.11.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Richard Dodel

1. Korreferent: Prof. Dr. Alexander Brehm

1 INHALTSVERZEICHNIS

2	Zusammenfassung	7
3	Abstract.....	9
4	Abbildungsverzeichnis	10
5	Abkürzungen.....	12
6	Einleitung	16
6.1	Morbus Alzheimer	16
6.2	Pathogenese der AD	17
6.3	Hypothesen zur Entstehung der AD	18
6.3.1	Cholinerge Hypothese	19
6.3.2	Glutamaterge Hypothese.....	19
6.3.3	Die Amyloid-beta-Hypothese.....	21
6.3.4	Tau-Hypothese	23
6.4	Therapie der AD	25
6.5	Genetische Ursachen der familiären AD	26
6.5.1	Amyloid Precursor Protein.....	27
6.5.2	Präsenilin 1	27
6.5.3	Präsenilin 2.....	27
6.5.4	Implikationen der Erforschung familiärer AD-Formen	29
6.6	Genetische Ursachen der sporadischen AD.....	29
6.6.1	ApoE.....	30
6.7	Amyloid Precursor Protein Stoffwechsel.....	31
6.7.1	A β ist ein Spaltprodukt des APP	31
6.7.2	Physiologische Funktionen von APP und seinen Fragmenten.....	34
6.7.3	Konformationen von A β und ihre Wirkung auf die Toxizität	36
6.8	Mikroglia	37
6.9	Neuroinflammation.....	38
6.10	MAP Kinase-Inhibitor CNI-1493.....	40

6.11	P2Y2-Rezeptoren	43
7	Fragestellung	45
8	Material und Methoden	46
8.1	Zellkultur	46
8.1.1	Polyethylenimin (PEI)-Lösung	46
8.1.2	Primäre Zellen	46
8.1.3	Inkubation und Weiterverarbeitung der primären Mikroglia-Kultur	47
8.1.4	Inkubation der primären neuronalen Mischkultur	47
8.2	Amyloid beta Ansatz	48
8.3	CNI-1493 Behandlung primärer Zellen	48
8.4	Zelltoxizitätsassays	49
8.4.1	Mitochondrialer Zellvitalitätsassay (MTT)	49
8.4.2	LDH-Zytotoxizitätsassay	50
8.5	Proteomische Verfahren	52
8.5.1	Zytokin-ELISA	52
8.5.2	Proteinextraktion	53
8.5.3	Gelelektrophorese	54
8.5.4	Western Blot	55
8.6	ATP-Determination Assay	57
8.7	Statistische Auswertungen	58
8.8	Material	59
8.8.1	Versuchstiere	59
8.8.2	Wasser	59
8.8.3	Zellkultur	59
8.8.4	Polyethylenimin (PEI)-Lösung:	60
8.8.5	A β -Ansatz	60
8.8.6	Zytotoxizitätsassays	61
8.8.7	CNI-1493	61

8.8.8	Zytokin-ELISA.....	61
8.8.9	Western blot	62
8.8.10	RIPA Puffer (R adio I mmuno P recipitation A ssay Puffer)	64
8.8.11	ATP Determination Assay	65
8.8.12	Geräteliste	65
9	Ergebnisse	66
9.1	Untersuchung der Amyloid-beta-Toxizität an primären Zellkulturmodellen ...	66
9.1.1	A β 1-40 bewirkte einen konzentrationsabhängigen Zelluntergang von primärer Mikroglia	66
9.1.2	A β 1-42 führte wie A β 1-40 zu einem konzentrationsabhängigen Untergang primärer Mikroglia	68
9.1.3	A β 1-40 führte konzentrationsabhängig zum Zelluntergang in primären neuronalen Mischkulturen	71
9.1.4	A β 1-42 wirkte zytotoxisch auf primäre neuronale Mischkulturen	73
9.2	Bestimmung von Konzentrationseffekten von CNI-1493 auf das Überleben primärer Zellen	76
9.2.1	CNI-1493 hatte unter 2,5 μ M keine zytotoxischen Konzentrationseffekte bei primärer Mikroglia und neuronalen Mischkulturen	76
9.2.2	Behandlung von Mikroglia mit CNI-1493 reduzierte die toxische Wirkung von A β	79
9.2.3	Behandlung primärer neuronaler Mischkulturen mit CNI-1493 reduzierte die toxische A β -Wirkung	81
9.2.4	Zusammenfassung	81
9.3	Zytokinprofile primärer muriner Mikroglia unter der Behandlung mit CNI-1493 und Amyloid beta.....	83
9.3.1	CNI-1493 unterdrückte die A β -assoziierte erhöhte TNF α -Ausschüttung	83
9.3.2	CNI-1493 hemmte die A β -induzierte IL-6-Ausschüttung	85
9.3.3	CNI-1493 erhöhte die IL-1 β Ausschüttung von A β -behandelten Mikroglia...	87

9.3.4	CNI-1493 und A β hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Ausschüttung von IL-10	89
9.3.5	Einfluss von CNI-1493 und A β auf die Expression des purinergen P2Y2-Rezeptors.....	91
10	Diskussion	93
10.1	Darlegung der Fragestellung	93
10.2	Amyloid beta bewirkte den Zelluntergang von primären Mikroglia und Neuronen.....	94
10.3	Vorbehandlung mit CNI-1493 reduzierte den Amyloid-beta-assoziierten Zelluntergang	97
10.4	Behandlung mit Amyloid beta erhöhte die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine.....	98
10.4.1	Vorbehandlung mit CNI-1493 unterdrückte den A β -bedingten Anstieg von TNF α	101
10.4.2	Vorbehandlung mit CNI-1493 unterdrückte den A β -assoziierten Anstieg von IL-6	103
10.4.3	Vorbehandlung mit CNI-1493 führte zu einem Anstieg von IL-1 β	105
10.4.4	A β hat keinen Einfluss auf die Ausschüttung von IL-10	108
10.5	Sequentielle Behandlung mit CNI-1493 und Amyloid beta führte zur Hochregulation des purinergen P2Y2-Rezeptors.....	109
10.6	Agonisten des P2Y2-Rezeptors steigern die Sekretion des neuroprotektiven sAPPalpha.....	110
10.7	Zusammenfassung	112
10.8	Ausblick für die Alzheimer-Forschung	113
11	Referenzen	116
13	Verzeichnis der akademischen Lehrer	146
14	Danksagung.....	147

2 ZUSAMMENFASSUNG

Der Morbus Alzheimer (AD) ist eine fortschreitende neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems, die vor allem ältere Bevölkerungsgruppen betrifft (mit einer Prävalenz von ca. 6% bei den über 65-Jährigen) und schließlich zu schwerer Behinderung führt. Lösliche und unlösliche Aggregate von Amyloid β ($A\beta$) und Tau-Protein spielen bei der Pathogenese der Erkrankung eine wesentliche Rolle. Sie verursachen zunächst eine Störung der Neuronenfunktion und führen im weiteren Verlauf zur Neurodegeneration. Dabei kommt es in den betroffenen Hirnabschnitten zu einer sekundären Aktivierung glialer Zellen – der sogenannten Neuroinflammation. Diese trägt im weiteren Verlauf zusätzlich zur Neurodegeneration bei.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Effekte von CNI-1493 auf $A\beta$ -behandelte primäre Neuronen und Mikroglia. CNI-1493 ist ein tetravalentes Guanylhydrazon, das die Phosphorylierung der p38-MAPKinase inhibiert. Dabei wirkt es entzündungshemmend, indem es unter anderem die Freisetzung von Zytokinen aus Monozyten und Makrophagen inhibiert. CNI-1493 wurde bereits in einem transgenen Alzheimer-Mausmodell getestet, wo es eine Verbesserung kognitiver Leistungen und Abnahme von $A\beta$ -Plaques in den behandelten Tieren bewirkte.

An primären neuronalen Mischkulturen, die mit $A\beta$ behandelt wurden, konnte nach Vorbehandlung mit CNI-1493 die Hochregulation des purinergen Nucleotidrezeptors der Klasse P2Y2 (P2Y2R) nachgewiesen werden. Dieser Rezeptor ist inflammationsregulierend. Mehrere Publikationen konnten zeigen, dass vor allem erhöhte IL-1 β Spiegel die Expression des P2Y2R induzieren. Seine Aktivierung kann mehrere positive Effekte auf die AD-Pathologie bedeuten.

Desweiteren wurde die mikrogliale Ausschüttung von Zytokinen nach Behandlung von primärer Mikroglia mit $A\beta$ mittels ELISA bestimmt. Eine Behandlung mit CNI-1493 (2,5 μ M) führte dabei zu einer Abnahme der $A\beta$ -bedingten proinflammatorischen Zytokine Interleukin 6 (IL-6) und Tumor Nekrose Faktor α (TNF α). Gleichzeitig war ein deutlicher Anstieg des ebenfalls proinflammatorischen Interleukin-1 β (IL-1 β) zu beobachten.

Die durch CNI-1493 bedingte Abnahme von TNF α und IL-6 bei gleichzeitiger Zunahme des IL-1 β ist ein bisher nicht beschriebener Effekt. Wir vermuten, dass die von uns zuvor im Mausmodell beschriebenen neuroprotektiven Effekte von CNI-1493

nicht nur auf der Suppression von TNF α und IL-6, sondern auch auf der Induktion der neuroprotektiven Wirkung von IL-1 β beruhen. Diese Ergebnisse stehen in einer Reihe mit Publikationen über eine protektive Wirkung von IL-1 β im Rahmen der Alzheimer-Pathologie.

3 ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder of the central nervous system. It is a disease of the old age (with a prevalence of approximately 6% among patients over 65 years) leading to severe physical and mental disability. Soluble and insoluble aggregates of Amyloid β (A β) and tau protein play an important role in the pathogenesis of AD. By disrupting neuronal function these proteinaceous agents cause pronounced neurodegeneration. Secondary to neurodegeneration, glial cells are activated in a process referred to as neuro-inflammation. Glial activation further aggravates neurodegeneration.

This thesis examines the effects of CNI-1493 on A β -treated primary neurons and microglia. CNI-1493 is a tetravalent guanyl hydrazone inhibiting the phosphorylation of p38 MAPK. Thus, the compound has an anti-inflammatory effect by attenuating cytokine secretion from monocytes and macrophages. CNI-1493 has already been tested in a transgenic mouse model. It was shown to improve cognitive performance and reduce A β plaque load in the brains of treated animals.

In A β -treated primary neuronal cultures, pretreatment with CNI-1493 caused an upregulation of the purinergic nucleotide receptors type P2Y2 (P2Y2R). This receptor is inflammation controlled. So far, several publications identified the cytokine IL-1 β as a potent inducing agent of this receptor. Activation of P2Y2R has different positive implications in the context of AD pathology.

Additionally, secretion of cytokines from A β -treated microglia was assessed using ELISA. Treatment with CNI-1493 (2.5 μ M) decreased A β -induced secretion of the proinflammatory cytokines Interleukin-6 (IL-6) and Tumor Necrosis Factor α (TNF α). At the same time, there was a pronounced increase of the likewise proinflammatory cytokine IL-1 β .

CNI-1493 induced reduction of TNF α and IL-6 alongside with increased IL-1 β levels is an effect that was not described so far. We assume the favorable effects of CNI-1493 previously found in the mouse model were not only due to suppression of TNF α and IL-6 but probably also because of the induction of IL-1 β . These results are in line with other studies showing neuroprotective effects of IL-1 β in the context of AD pathology.

4 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1 Prävalenz der AD innerhalb der Altersgruppen ab dem 65. Lebensjahr.
- Abb. 2 Schematische Gegenüberstellung eines gesunden (links) und eines von der AD betroffenen Gehirns (rechts).
- Abb. 3 Der APP-Stoffwechsel.
- Abb. 4 Pathologische Funktionen der ApoE-Isoformen E3 und E4 im Zusammenhang mit der AD.
- Abb. 5 Nicht-amyloidogene Kaskade der APP-Prozessierung.
- Abb. 6 Amyloidogene Kaskade der APP-Prozessierung.
- Abb. 7 Strukturformel von CNI-1493.
- Abb. 8 MAP-Kinase Signalwege.
- Abb. 9 Reaktionsmechanismus des MTT-Tests.
- Abb. 10 Reaktionsmechanismus des LDH-Tests.
- Abb. 11 Funktionsprinzip eines Sandwich-ELISA.
- Abb. 12 Immundetektion im Western Blot.
- Abb. 13 MTT- und LDH-Assay von primärer Mikroglia mit A β 1-40.
- Abb. 14 MTT- und LDH-Assay von primärer Mikroglia mit A β 1-42.
- Abb. 15 MTT- und LDH-Assay von primärer Mikroglia – Lösungsmittelkontrolle.
- Abb. 16 MTT- und LDH-Assay von primären Neuronen mit A β 1-40.
- Abb. 17 MTT- und LDH-Assay von primären Neuronen mit A β 1-42.
- Abb. 18 MTT- und LDH-Assay von primären Neuronen mit Lösungsmittelkontrolle.
- Abb. 19 MTT-Assay von primärer Mikroglia mit CNI-1493 und Lösungsmittelkontrolle.

- Abb. 20 MTT-Assay von primären neuronalen Zellen mit CNI-1493 und Lösungsmittelkontrolle.
- Abb. 21 MTT-Assay – Präinkubation von primärer Mikroglia mit CNI-1493 und anschließende Behandlung mit A β 1-40 und A β 1-42.
- Abb. 22 MTT-Assay – Präinkubation von primären Neuronen mit CNI-1493 mit anschließender Gabe von A β 1-40 und A β 1-42.
- Abb. 23 TNF α -ELISA – Präinkubation von primärer Mikroglia und CNI-1493 und anschließende Behandlung mit A β 1-40 und A β 1-42.
- Abb. 24 IL-6-ELISA – Präinkubation von primärer Mikroglia mit CNI-1493 mit anschließender Behandlung mit A β 1-40 und A β 1-42.
- Abb. 25 IL-1 β -ELISA – Präinkubation von primärer Mikroglia mit CNI-1493 mit anschließender Behandlung mit A β 1-40 und A β 1-42.
- Abb. 26 IL-10-ELISA – Präinkubation von primärer Mikroglia mit CNI-1493 und anschließende Behandlung mit A β 1-40 und A β 1-42.
- Abb. 27 Nicht-amyloidogene Kaskade des APP-Stoffwechsel.
- Abb. 28 Western Blot – Expression des P2Y2R bei CNI-1493 behandelten primären Neuronen.
- Abb. 29 Nicht-amyloidogene Kaskade des APP-Stoffwechsel.
- Abb. 30 Möglicher Mechanismus der CNI-1493 bedingten P2Y2R Hochregulation.

5 ABKÜRZUNGEN

A β	Amyloid β
Abs.	Absorption
AD	Alzheimer's Disease
AICD	Intracellular domain of APP
APH-1	Anterior Pharynx-defective 1
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CO ₂	Kohlendioxid
CSIF	Cytokine Synthesis Inhibitory Factor
DAG	Diacylglycerol
DAMP	Damage Associated Molecular Patterns
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK1/2	Extracellular-Signal-regulated Kinase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor

HFIP	Hexafluorisopropanol
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase)
gp130 Rezeptor	Glycoprotein 130 Rezeptor
IL-6	Interleukin 6
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-10	Interleukin 10
IL-1RI	Interleukin-1 Rezeptor Typ I
IL-1RII	Interleukin-1 Rezeptor Typ II
INT	2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium Chlorid
IP3	Inositol1,4,5-Trisphosphat
JAK-STAT	JAK = Janus-Kinase; STAT = Signal Transducers and Activators of Transcription
kDa	10 ³ Dalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor
LPR1	LDLR-related Protein 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
M-PER	Mammalian Protein Extraction Reagent
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n. v.	nicht vorhanden
NAD/NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat

NANC	non-adrenergic, non-cholinergic
NaOH	Natriumhydroxid
NF κ B	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NEAA	Nichtessentielle Aminosäurenlösung (Non-Essential Amino Acid Solution)
NSAID	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
P2X7R	P2X7-Rezeptor
P2Y2R	P2Y2-Rezeptor
P38 MAPK	p38 Mitogen-Activated Protein Kinase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PEI	Polyethylenimin
PEN-2	Präsenilin-Enhancer 2
PKC	Proteinkinase C
PRR	Pattern Recognition Receptor
PS1	Presenilin 1
PS2	Presenilin 2
RIPA Buffer	Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer
sAPP α	soluble Amyloid Precursor Protein α
sAPP β	soluble Amyloid Precursor Protein β
SDS	Natrium (Sodium-) Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TBS	Trisgepufferte Salzlösung (Tris Buffered Saline)

TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
ZNS	Zentrales Nervensystem

6 EINLEITUNG

6.1 MORBUS ALZHEIMER

Dementielle Erkrankungen treten gehäuft ab dem 65. Lebensjahr auf. Charakteristisch ist ein progredienter Verlust mentaler und physischer Funktionen, der innerhalb weniger Jahre über Pflegebedürftigkeit zum Tod führt.

Aktuelle Schätzungen gehen von etwa 24 Mio. Demenzkranken weltweit aus (Ferri et al., 2005). Das Vorliegen (Prävalenz) einer Demenz korreliert dabei mit dem Lebensalter. Liegt die Prävalenz in der Gesamtbevölkerung unter 1% (Ott et al., 1995), nimmt sie ab dem 65. Lebensjahr mit einer Verdopplungsrate von etwa 5 Jahren zu (Lobo et al., 2000).

Altersgruppe	Männer	Frauen
65-69	1,6	1,0
70-74	2,9	3,1
75-79	5,6	6,0
80-84	11,0	12,6
85-89	12,8	20,2
90 und älter	22,1	30,8

Abb. 1 Prävalenz der AD innerhalb der Altersgruppen ab dem 65. Lebensjahr. Quelle: Lobo et al. 2000.

Die International Classification of Diseases (ICD-10) definiert „Demenz“ als dauerhafte Störung höherer kortikaler Funktionen, wobei vor allem Gedächtnis, Denken und Orientierung betroffen sind. Demenzielle Symptome werden in unterschiedlicher Ausprägung von verschiedenen Grunderkrankungen ausgelöst. Die größte Einzelentität bildet dabei der Morbus Alzheimer (Alzheimer's Disease, AD), an dem etwa 60 bis 70% aller Demenz-Patienten leiden (Ott et al., 1995). Erstmals wurde die AD 1907 von Alois Alzheimer und Oskar Fischer unabhängig voneinander

beschrieben (Alzheimer, 1907, Fischer, 1907). Bis heute wurden unterschiedliche Pathogenitätsmechanismen beschrieben.

6.2 PATHOGENESE DER AD

Neuropathologisches Korrelat der AD sind extrazelluläre Amyloid-beta-(A β)-„Plaques“ (Glennner and Wong, 1984) und intrazelluläre Tau-„Tangles“ (Kidd, 1963, Kosik et al., 1984). Zusätzlich liegt bei ca. 88% der AD-Patienten eine zerebrale Amyloid Angiopathie (CAA; auch kongophile Angiopathie genannt) vor (Wong et al., 1985, Esiri and Wilcock, 1986, Itoh et al., 1993, Revesz et al., 2002, Bell and Zlokovic, 2009). Diese wird durch perivaskuläre A β -Ablagerungen verursacht und geht mit einer erhöhten Fragilität von Gefäßen einher, die sich klinisch als atypische zerebrale Massenblutungen (z. B. okzipital) manifestieren können (Itoh et al., 1993). Somit handelt es sich bei der AD um eine zerebrale Amyloidose. Die extrazellulären und perivaskulären Ablagerungen bestehen dabei aus A β , einem Spaltprodukt des Amyloid Precursor Protein (APP). „Tangles“ werden aus dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau gebildet. Auf beide wird an späterer Stelle eingegangen.

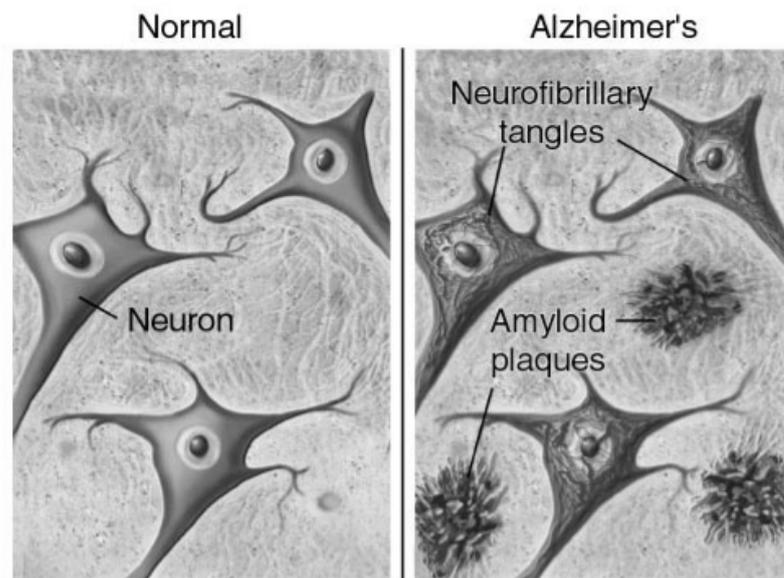


Abb. 2 Schematische Gegenüberstellung eines gesunden (links) und eines von der AD betroffenen Gehirns (rechts). Extrazelluläre Amyloid-Plaques und intrazelluläre Tau-Tangles werden regelhaft bei der Obduktion beobachtet.

Quelle: http://www.ahaf.org/assets/images/plaques_and_tangles_border.jpg am 7.12.2011

Die neuropathologischen Veränderungen aus „Plaques and Tangles“ gehen dem klinischen Bild der Demenz um Jahre voraus. Interessanterweise weisen die neurofibrillären Tangles ein zeitliches Ausbreitungsmuster auf. Dieses hat der Frankfurter Neuroanatom Heiko Braak in ein transentorhinales, ein limbisches und ein isokortikales Stadium eingeteilt (Braak and Braak, 1991). Das erste Stadium ist durch pathologische Veränderungen im Bereich des Temporallappens charakterisiert. Anschließend folgt das limbische Stadium, bei dem degenerative Veränderungen im Hippokampus festgestellt werden können. Da im Hippokampus die Konsolidierung von Gedächtnisinhalten erfolgt (Squire, 1992), treten mnestiche Störungen als Frühsymptom der AD auf (Selkoe, 2002a). Im letzten Stadium sind schließlich zunehmend kortikale Areale betroffen, die für die Verschaltung höherer kognitiver Funktionen zuständig sind. Im Gegensatz zur Tangle-Pathologie liegen A β -Plaques diffus im gesamten Gehirn vor. Unter anderem war es dieser Dualismus aus „Plaques and Tangles“, der dazu führte, dass unterschiedliche Hypothesen zur Ursache der AD formuliert wurden. Die einflussreichsten werden im folgenden Abschnitt erläutert.

6.3 HYPOTHESEN ZUR ENTSTEHUNG DER AD

Seit den 1980er Jahren wurden mehrere Hypothesen zur Entstehung der AD formuliert. Diese prägten maßgeblich die Erforschung und unser Verständnis der Erkrankung.

Die Bedeutung der Bildung belastbarer Hypothesen liegt dabei neben dem wissenschaftlichen Interesse vor allem in der Perspektive, wirksame Medikamente zu entwickeln.

Momentan stehen vier Theorien im Vordergrund:

- Cholinerge Hypothese (Bartus et al., 1982, Francis et al., 1999),
- Glutamaterge Hypothese (Maragos et al., 1987),
- Amyloid-Hypothese (Hardy and Allsop, 1991),
- Tau-Hypothese (Goedert et al., 1991)

6.3.1 Cholinerge Hypothese

Die cholinerge Hypothese stellt von den oben genannten die älteste dar. Sie geht von der Annahme aus, dass die Symptome der AD auf dem Boden einer unzureichenden Funktion des cholinergen Systems entstehen.

Ab Ende der 1960er Jahre wurden unter Einsatz neuester Methoden Gehirne von Alzheimer-Patienten systematisch auf molekularbiologische Pathologien hin untersucht. Ähnlich wie zuvor beim Morbus Parkinson erhoffte man sich ein umschriebenes Mangelsyndrom, das mit einem einzigen Medikament im Stile des 1968 eingeführten Levodopa behandelt werden könnte.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde ein selektiver Verlust cholinerg Neurone in Hippokampus und Kortex beschrieben (Davies and Maloney, 1976, Perry et al., 1977). Ebenfalls zu dieser Zeit unterstrichen Studien eine tragende Rolle des cholinergen Systems im Rahmen mnestischer Funktionen und Kognition (Drachman and Leavitt, 1974). Diese Zusammenhänge führten zur Formulierung der sogenannten „cholinergen Hypothese“ (Bartus et al., 1982).

Unter Berücksichtigung dieser Hypothese erfolgte die Zulassung von ZNS-gängigen Cholinesterase-Inhibitoren, wie Donepezil und Rivastigmin für die symptomatische Behandlung der AD. Die Wirksamkeit der Mittel lässt sich zwar nachweisen, ist jedoch insgesamt schwach ausgeprägt (Birks, 2006, Birks and Harvey, 2006). Der wohl bedeutendste Effekt dieser Wirkstoffklasse ist die Verlangsamung der Progression klinischer Symptome (Tariot et al., 2000).

In den Folgejahren wurden Studien veröffentlicht, die auch Veränderungen anderer Transmittersysteme wie die des glutamatergen Systems beschrieben (Kowall and Beal, 1991), wodurch die cholinerge Hypothese zunehmend in den Hintergrund trat.

6.3.2 Glutamaterge Hypothese

Diese Hypothese macht eine gestörte Funktion des glutamatergen Systems für die Entstehung der AD verantwortlich. Glutamat ist der häufigste Neurotransmitter des menschlichen Nervensystems (Monaghan et al., 1989). Es aktiviert ein breites Spektrum ionotroper und metabotroper Rezeptoren (Palmada and Centelles, 1998), wobei im Zusammenhang mit der AD sogenannte NMDA-Rezeptoren eine wichtige

Rolle einzunehmen scheinen. Diese stellen eine Untergruppe ionotroper Glutamat-Rezeptoren dar, an den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) agonistisch wirkt (Monaghan et al., 1989). Interessanterweise hat dieser Rezeptor je nach Glutamat-Konzentration teils positive teils ungünstige Effekte im Rahmen der AD-Pathologie.

Bei mäßiger Aktivierung steuern NMDA-Rezeptoren die synaptische Plastizität von Neuronen, d.h. die neuronalen Anpassungen aufgrund von Lernvorgängen (Lynch and Baudry, 1984, Morris et al., 1986). Werden die Rezeptoren hingegen mit großen Mengen Glutamats aktiviert, wird die synaptische Plastizität eingeschränkt. Zusätzlich kommt es zum Untergang von Neuronen durch Exzitotoxizität (Danysz and Parsons, 2003). Die Beteiligung von NMDA-Rezeptoren an der synaptischen Plastizität und Zelluntergang führte zur Erforschung des Rezeptors im Zusammenhang mit der AD.

Bei post-mortem Analysen von Alzheimer-Hirnen wurden erniedrigte Glutamat-Konzentrationen gegenüber Kontrollhirnen beschrieben (Sasaki et al., 1986). Im Hippocampus wurde dabei eine erniedrigte Dichte des NMDA-Rezeptors festgestellt (Greenamyre et al., 1987). Da muskarinerge und GABAerge Rezeptoren im Vergleich dazu weniger stark reduziert waren, werteten die Autoren den Befund als Folge einer Beeinträchtigung des glutamatergen Stoffwechsels. Glutamat hat jedoch auch eine destruktive Seite, weil es in hohen Mengen toxisch wirkt.

Dieser Vorgang wird als Exzitotoxizität bezeichnet. Diese wurde als sekundärer Mechanismus der Zellschädigung beschrieben (Park et al., 2004). Durch eine primäre Noxe geschädigte Neurone büßen ihre physiologische Funktion ein. Sie sezernieren inflammatorische Mediatoren, reaktive Sauerstoffspezies und leeren ihre Glutamatspeicher. Dabei gehen sie selbst zugrunde und schädigen umliegende Zellen. Bemerkenswerterweise sind jedoch nicht alle Zellpopulationen in gleichem Maße für diese Schädigung anfällig.

Die durch die AD betroffenen hippocampalen Pyramidenzellen weisen bei diversen ZNS-Pathologien eine erhöhte Anfälligkeit für Noxen auf. So gehören sie bei zerebraler Hypoxie zu den ersten Zellen, die untergehen (Lietzau et al., 2009). Beim Kernikterus sind fast ausschließlich hippocampale Neurone betroffen (Vaz et al., 2011). Experimentell lässt sich mit dem Glutamat-Rezeptor Agonist Kainat eine

lokale exzitotoxische Schädigung hippocampaler Pyramidenzellen herbei führen (Shinozaki and Konishi, 1970, Nadler et al., 1978).

Der NMDA-Rezeptor scheint sowohl bei der essentiellen als auch bei der schädigenden Wirkung von Glutamat eine entscheidende Rolle zu spielen. Diese Erkenntnisse über die Wirkung von Glutamat an NMDA-Rezeptoren wurden von Maragos und Kollegen zu einer Hypothese zusammen gefasst, die eine Dysfunktion des glutamatergen Systems für die Entstehung der der AD-Symptomatik postuliert (Maragos et al., 1987). Diese besagt, dass eine Überfunktion des glutamatergen Systems zunächst durch erhöhte Glutamatspiegel Neurone schädigt. Diese werden anschließend empfindlich für toxische Reize und gehen allmählich zugrunde. Die Neurodegeneration läuft im Frühstadium der AD schneller ab und verlangsamt sich in späteren Erkrankungsstadien. Der NMDA-Rezeptor ist sowohl an der anfänglichen Schädigung als auch am späteren Zelltod beteiligt. Deswegen ist von einer Inhibition ein positiver Effekt zu erwarten (Maragos et al., 1987).

Die beschriebenen Befunde führten zur klinischen Zulassung des NMDA-Rezeptor Antagonisten Memantin zur Behandlung der AD. Die Wirkung von Memantin liegt in der selektiven Inhibition der pathologischen NMDA-Rezeptor-Aktivierung, während der Rezeptor für physiologische Aktivierung durch Glutamat zur Verfügung steht (Chen et al., 1992). Aufgrund allenfalls geringer klinischer Verbesserung im fortgeschrittenen Stadium der AD ist das Mittel allerdings momentan umstritten (Schneider et al., 2011).

6.3.3 Die Amyloid-beta-Hypothese

Amyloid-beta (A β)-Ablagerungen wurden 1907 von Alois Alzheimer als „miliare Herdchen“ und im gleichen Jahr von seinem Prager Zeitgenossen Oskar Fischer als „Plaques“ im Zusammenhang mit „seniler Demenz“ beschrieben (Alzheimer, 1907, Fischer, 1907). 1984 beschreiben Glenner und Wong die Isolation des 4 kDa großen „Amyloid Fibril Protein β “ aus Hirnen von Alzheimer Patienten (Glenner and Wong, 1984).

Pathologisch wurde A β also von Anfang an mit AD in Verbindung gebracht. 1991 formulierten John Hardy und David Allsop die Amyloid-beta-Hypothese, in der sie sich auf folgende pathologische Kaskade festlegten: „*Amyloid-beta-deposition* \rightarrow *tau phosphorylation and tangle formation* \rightarrow *neuronal death*“ (Hardy and Allsop,

1991). Anlass für die Hypothesenbildung waren im Laufe der 1980er beschriebene Störungen des APP-Stoffwechsels und die Tatsache, dass Mutationen des APP-Stoffwechsels als Ursache für familiär vererbte AD-Formen beschrieben wurden (Price and Sisodia, 1998). Zusätzlich stützten sich die beiden Autoren auf das Phänomen, dass Down-Syndrom-Patienten eine Demenz entwickeln können, die mit AD-typischen neuropathologischen Veränderungen einher geht (Wisniewski et al., 1985). Dieser Zusammenhang besteht, weil das das Gen für APP, der Vorstufe von A β , auf dem beim Down-Syndrom dreifach vorhandenen Chromosom 21 liegt.

Die Abwendung von Transmittersystemen hin zum Stoffwechsel von A β stellt einen Paradigmenwechsel dar. Dieser hat die AD-Forschung bis heute nachhaltig beeinflusst.

Die Amyloid-Hypothese machte die AD-Pathologie zu einer Pathologie des APP und seines Metabolismus. Damit ergaben sich neue methodische Möglichkeiten aus dem Bereich der Proteinbiochemie – es konnten beispielsweise gezielt transgene Mäuse entwickelt werden, die A β überexprimierten. An diesen werden bis heute Therapieansätze erprobt (Roskam et al., 2010). Der APP-Metabolismus trat

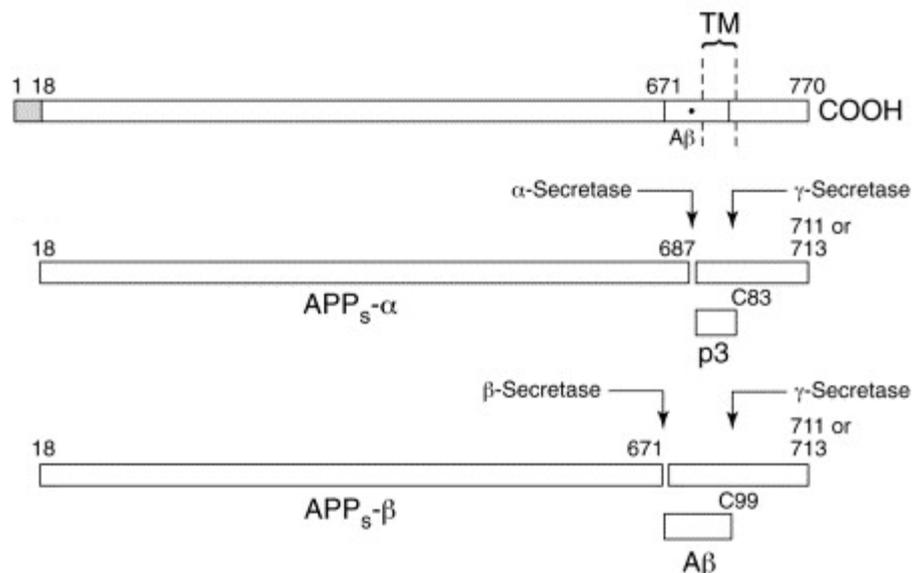


Abb. 3 Der APP-Stoffwechsel. Als Transmembranprotein besitzt APP einen extrazellulären N- und einen intrazellulären C-Terminus. Die α - und β -Sekretase proteolysieren den N-Terminus membranbahn, während die Schnittstelle der γ -Sekretase innerhalb der Membran (TM= transmembran) liegt. Die Einzelnen Proteolyseprodukte werden im Abschnitt 6.7.2 erläutert. Quelle: modifiziert nach Selkoe, 1998

ebenso als neue therapeutische Zielstruktur in den Vordergrund (Dovey et al., 2001, Anderson et al., 2005, Henley et al., 2009). So schafften es die γ -Sekretase-Inhibitoren bis in klinische Studien (Siemers et al., 2006). Da der Fokus auf ein Peptid gelenkt wurde, konnte desweiteren eine Immunisierung angestrebt werden (Schenk et al., 1999, Roskam et al., 2010). Es gibt noch zahlreiche weitere Forschungsansätze, die aktuell verfolgt werden.

Heute ist die Amyloid-Hypothese nach wie vor umstritten. Zum einen konnte im Laufe der Jahre keine *in vivo*-Assoziation zwischen A β und neuronalem Zelluntergang gezeigt werden (Schmitz et al., 2004). Zum anderen zeigten A β -zentrierte Therapieansätze, wie die Immunisierung mit humanem A β 1-42, am Mausmodell Erfolge (Schenk et al., 1999, Morgan et al., 2000). Gleichzeitig war diese aktive Immunisierung bei Menschen mit erhöhtem Auftreten von Enzephalitiden assoziiert (Nicoll et al., 2003, Solomon, 2004, Gilman et al., 2005). Auch die passive Immunisierung mit monoklonalen A β -Antikörpern führte im Tiermodell zu unerwünschten Wirkungen, wie eine vermehrte zerebrale Blutungsneigung (Pfeifer et al., 2002, Thakker et al., 2009). Andere, weit in der klinischen Erprobung befindliche Wirkstoffe konnten ihre anfangs vielversprechende Ergebnisse nicht bestätigen.

Die Wirkstoffklasse der γ -Sekretase-Inhibitoren zeigten in klinischen Studien keine Verbesserung der Kognition (Imbimbo and Giardina, 2011). Myriad Genetics hat 2008 nach Beendigung der Phase III klinischen Studien die Entwicklung ihres unspezifischen Sekretase-Modulator Tarenflurbil abgebrochen, nachdem das Mittel keinen positiven Effekt auf die klinischen Symptome gezeigt hatte. Auch die von Eli Lilly durchgeführte IDENTITY-Studie wurde 2010 abgebrochen, nachdem sich der γ -Sekretase-Inhibitor Semagacestat (LY450139) sogar negativ auf kognitive Leistungen der Therapiegruppe auswirkte (Imbimbo and Giardina, 2011).

Es ist unumstritten, dass A β pathognomonisch für den Morbus Alzheimer ist. Ob A β jedoch die Pathologie hervorruft oder lediglich ein Epiphänomen darstellt, bleibt ungeklärt. Unklar ist damit momentan auch, ob A β -zentrierte Therapieansätze kausale Ansätze darstellen oder rein symptomatische.

6.3.4 *Tau-Hypothese*

Die Tau-Hypothese macht die intrazellulären Aggregate des hyperphosphorylierten Tau-Proteins für die Entstehung der AD-Symptome verantwortlich.

Wie im letzten Abschnitt beschrieben, ist es bislang *in vivo* nicht gelungen, den neuronalen Untergang mit A β -Ablagerungen in Verbindung zu bringen (Schmitz et al., 2004). Auch die neuropathologischen Braak-Stadien der AD machen das Fortschreiten der Erkrankung nicht an Amyloid-Ablagerungen („Plaques“) fest, sondern an dem Vorkommen von intraneuronalen „Tangles“ (Braak and Braak, 1991). Bei diesen handelt es sich um Aggregate von pathologisch hyperphosphoryliertem Tau-Protein (Grundke-Iqbal et al., 1986, Wood et al., 1986, Hanger et al., 1991).

Durch übermäßige Phosphorylierung büßt das intrazellulär vorkommende Tau-Protein seine hydrophilen Eigenschaften ein (Selkoe et al., 1982) und fällt intrazellulär aus, was zum Verlust der physiologischen Funktion dieses Proteins führt. Diese besteht in der Stabilisierung von Mikrotubuli, die in Neuronen den axonalen Transport von Proteinen und Vesikeln gewährleisten (Cleveland et al., 1977, Drewes et al., 1998). Die Behinderung dieses Transports ist ein erheblicher Eingriff in die zelluläre Integrität des Neurons und führt zur sogenannten axonalen Degeneration (Mandelkow et al., 2003). Dass Pathologien des Tau-Proteins neurodegenerative Potenz haben, zeigen frontotemporale Demenzen, die mit Mutationen im Tau-Gen einhergehen (Heutink, 2000).

Die zentrale Frage besteht darin, ob die Tau-Pathologie der Amyloid-Pathologie vorausgeht oder ein Epiphänomen der bestehenden A β -Überproduktion darstellt (Mudher and Lovestone, 2002). Ein Hinweis auf letztere Möglichkeit ist, dass bei Demenzformen, die mit Tau-Mutationen einhergehen, die A β -Konzentration im Hirngewebe nicht über der Altersnorm liegt (Foster et al., 1997). Das Nebeneinander beider Pathologien findet sich im Begriff „Plaques and Tangles“ lediglich bei der AD, wobei auch bei der Begriffsbildung die „Plaques“ vorangehen.

Nachdem in den letzten Jahren zahlreiche A β -zentrierte Studien negative Ergebnisse zeigten (Imbimbo and Giardina, 2011), ist Tau zunehmend in den Fokus geraten. Es werden parallel unterschiedliche experimentelle Ansätze verfolgt. Diese umfassen Inhibitoren der Tau Phosphorylierung, der Tau Aggregation, der Reduktion der Tau-Menge im Gewebe sowie Mikrotubuli Stabilisatoren (Morris et al., 2011). Einige Wirkstoffe wie das Peptid NAP oder Methylenblau haben in Phase II klinischen Studien vielversprechende Ergebnisse gezeigt und werden weiter getestet

(Gura, 2008, Gozes et al., 2009). Alles in allem sind die A β - und die Tau-Hypothese aktuell die wichtigsten Erklärungsansätze zur Pathogenese der AD.

6.4 THERAPIE DER AD

Trotz intensiver Forschung steht bisher keine kausale Therapie für die AD zur Verfügung. Wie bei anderen neurodegenerativen Erkrankung ohne etablierte Früh-erkenntnisverfahren (Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose etc.) wird die Diagnose erst gestellt, wenn eine große Anzahl an Neuronenpopulationen untergegangen ist (Waragai et al., 2007). Die Therapiebemühungen sind rein symptomatischer Natur und sind, wenn überhaupt, nur in der Lage den Krankheitsverlauf zu verlangsamen, nicht aber diesen rückgängig zu machen.

Nootropika sind Medikamente mit mutmaßlich neuroprotektiven Eigenschaften, die gelegentlich im Rahmen der Demenz-Therapie zum Einsatz kommen. Das am häufigsten verschriebene Nootropikum ist der pflanzliche Wirkstoff Ginkgo biloba. In einer Metaanalyse war die klinische Wirksamkeit von Ginkgo der von Cholinesterase-Inhibitoren unterlegen (Kurz and Van Baelen, 2004). Der Erfolg des Wirkstoffs beruht auf unterschiedlichen Faktoren. Allen voran ist die geringe Wirksamkeit der anderen Antidementiva zu nennen. Desweiteren werden Ginkgo-Präparate intensiv in den Medien beworben. Schließlich werden Ginkgo-Präparate nach ihrer Einstufung als wirksam bei der Verbesserung der „Aktivitäten des täglichen Lebens“ durch das Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen auch politisch unterstützt (https://www.iqwig.de/download/A05-19B_Abschlussbericht_Ginkgohaltige_Praeparate_bei_Alzheimer_Demenz.pdf). Nach den Leitlinien der evidenzbasierten Demenztherapie gelten Nootropika allerdings als nicht wirksam. Die im letzten Kapitel aufgeführten Hypothesen führten zur Zulassung folgender Wirkstoffe mit spezifischen Zielstrukturen.

Donepezil (Aricept[®]), Rivastigmin (Exelon[®]) und Galantamin (Reminyl[®]) wirken cholinomimetisch durch Inhibition der Acetylcholin-abbauenden Acetylcholin-Esterase. Die Wirksamkeit der Mittel konnte in Placebo-kontrollierten multizentrisch durchgeführten Studien gezeigt werden (Rogers et al., 1998), in denen die Wirkung der Medikamente auf Kognition, Gedächtnis sowie den klinischen Zustand des Patienten untersucht wurde. Heute werden Cholinesterase-Inhibitoren in unterschiedlichen Dar-

reichungsformen (oral, transdermal) bei leichter bis mittelschwerer Demenz angewendet.

Ein weiterer seit 2002 zugelassener Wirkstoff ist der NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor-Antagonist Memantin (Ebixa[®], Axura[®]). Hierbei handelt es sich um einen nichtkompetitiven Antagonisten an glutamatergen NMDA-Rezeptoren (Erdo and Schafer, 1991, Chen et al., 1992). Diese Rezeptoren sind wesentlich an der neurotoxischen Wirkung von Glutamat (Lucas and Newhouse, 1957, Olney and Sharpe, 1969, Maragos et al., 1987) beteiligt. Memantin ist zur Behandlung mittelschwerer und schwerer Stadien der AD indiziert.

Durch die Erkenntnis, dass eine chronische Neuroinflammation zu den zentralen Aspekten der AD gehört (Bauer et al., 1991; Hauss-Wegrzyniak et al., 1998), rückten nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID) als symptomatische Therapie in den Blickpunkt. Prospektive klinische Studien konnten allerdings keinen therapeutischen Nutzen aufzeigen (McGeer and McGeer, 2007). Folglich gab es bislang keine Ausweitung der Indikation der NSAID zur AD-Therapie.

Insgesamt stellen die Cholinesterase-Inhibitoren und Memantin Mittel der ersten Wahl dar und kommen sowohl in Mono- als auch in der Kombinationstherapie zum Einsatz (S3 Leitlinie Demenzen der Deutschen Gesellschaft für Neurologie vom November 2009, http://www.dgn.org/images/stories/dgn/leitlinien/II_demenz/II-demenz-lang-170210.pdf). Die sogenannten Nootropika spielen dagegen klinisch eine untergeordnete Rolle.

6.5 GENETISCHE URSACHEN DER FAMILIÄREN AD

Bei der Suche nach genetischen Faktoren als Ursache für AD ist es sinnvoll, zwischen der familiären und der sporadischen AD zu unterscheiden. Bei den seltenen familiären Formen, die mit frühem Krankheitsbeginn vor dem 60. Lebensjahr und aggressivem Verlauf einhergehen, sind bis heute drei von Mutationen betroffene Proteine beschrieben. Die Mutationen werden autosomal-dominant vererbt:

- Amyloid Precursor Protein (APP) auf Chromosom 21;
- Präsenilin-1-Gen auf Chromosom 14;
- Präsenilin-2-Gen auf Chromosom 1.

6.5.1 *Amyloid Precursor Protein*

Wie bereits oben beschrieben entwickeln Menschen mit Down-Syndrom um das 40. Lebensjahr klinische Zeichen einer Demenz mit ähnlichen Veränderungen des Hirnparenchyms wie AD-Erkrankte (Oliver and Holland, 1986). Sie haben krankheitsbedingt eine zusätzliche Kopie des Chromosoms 21, welches auch das Gen für APP kodiert.

Es sind mehrere Mutationen des APP beschrieben – sie werden nach der Nationalität der betroffenen Familie benannt. So ist z.B. die „Swedish Mutation“ an Aminosäure KM670/671NL mutiert (Mullan et al., 1992a). Obwohl die APP-Mutationen äußerst selten sind – etwa 20 Familien weltweit – haben sie große Bedeutung für die Entwicklung von Tiermodellen gehabt (siehe oben).

6.5.2 *Präsenilin 1*

1992 wurde der Zusammenhang zwischen „early-onset“ familiärer AD und einer Mutation auf Chromosom 14 beschrieben (Mullan et al., 1992b, Schellenberg et al., 1992). Sherrington klonierte 1995 das betroffene Gen S182, das heute Präsenilin 1 (PS1) genannt wird (Sherrington et al., 1995). Bis dato sind 94 PS1-Mutationen in Familien unterschiedlicher ethnischer Zugehörigkeit beschrieben worden (aktuelle Übersicht auf www.alzforum.org). Der Krankheitsbeginn liegt zwischen 35-55 Jahren, die Krankheitsdauer bis zum Tod ist mit etwa sechs Jahren eher kurz. Patienten mit PS1-Mutationen haben folglich eine besonders schlechte Prognose.

6.5.3 *Präsenilin 2*

Eine systematische Genom-Untersuchung von acht Familien wolgadeutscher Abstammung führte zur Entdeckung einer Mutation eines Gen auf Chromosom 1 (Levy-Lahad et al., 1995b). Wegen ausgeprägter Homologie zum Präsenilin 1 wurde das neu gefundene Gen zunächst als STM 2 (seven transmembrane domain 2) und später als Präsenilin 2 (PS2) bezeichnet (Levy-Lahad et al., 1995a, Rogaev et al., 1995).

Bis heute sind 12 Mutationen des PS2-Gens beschrieben (s. a. www.alzforum.org). Neben den wolgadeutschen Familien und ihren Nachfahren gibt es eine italienische Familie (Tedde et al., 2003) und eine hessische Familie aus dem Raum Frankfurt (Nikisch et al., 2008) mit dieser Mutation im PS2-Gen. Desweiteren

wurde bis vor kurzem vermutet, dass Aguste Deter, deren Fall 1907 von Alois Alzheimer beschrieben wurde, die „wolgadeutsche“ N141I-Mutation des PS2-Gens hatte (Yu et al., 2010). Dieses wurde 2011 von Gießener Forschern widerlegt (Muller et al., 2011). Die genaue Mutation von Auguste D. bleibt nach Aussage der Forscher weiterhin unbekannt.

Das Erkrankungsalter bei dieser Mutation schwankt sehr stark zwischen 40 und 75 Jahren und die Krankheitsdauer liegt bei etwa 7,6 Jahren, was auf eine mildere Verlaufsform als die PS1-assoziierte AD hinweist.

Die physiologischen Funktionen der Präsenilin-Proteine sind vielschichtig. Zum einen bilden PS1 und PS2 Bestandteile des γ -Sekretase Komplexes, der außer diesen aus Nicastrin, Präsenilin-Enhancer 2 (PEN-2) und Anterior Pharynx-defective 1 (APH-1) besteht (Selkoe and Kopan, 2003). Die γ -Sekretase führt den letzten Schritt bei der A β -Synthese aus (siehe Kapitel 6.7).

Einzelne Präsenilin-Mutationen führen zu spezifischen neuropathologischen Veränderungen (Bentahir et al., 2006). Beispielsweise lassen die Mutationen PS1-G384A und PS2-N141I die absolute Menge von A β konstant, bewirken jedoch eine signifikante Verschiebung des Verhältnisses der einzelnen Spaltprodukte zugunsten von A β 1-42 (Scheuner et al., 1996, Citron et al., 1997, Bentahir et al., 2006) – der toxischeren A β -Spezies (Hardy and Selkoe, 2002).

Desweiteren sind die Präseniline an der Neurotransmitter-Freisetzung aus der Präsynapse sowie an der Long-term Potentiation beteiligt (Zhang et al., 2009). Letztere stellt das zelluläre Substrat für Gedächtniskonsolidierung dar (Bliss and Collingridge, 1993). Erst kürzlich verdichteten sich die Hinweise dafür, dass Präseniline an der Autophagie beteiligt sind (Lee et al., 2010, Neely et al., 2011). Diese ist ein intrazellulärer Mechanismus, der dem Abbau nichtfunktionierender Organellen sowie unlöslicher Proteinaggregate (wie A β oder hyperphosphoryliertem Tau) dient. Autophagie dient darüberhinaus der zellulären Energiesynthese, so dass es bedingt durch Energiemangel letztendlich zur Apoptose der betroffenen Nervenzellen kommen kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bis dato beschriebenen erblichen Formen der AD weitere Belege für die Relevanz der A β -Hypothese liefern. Da-

bei spielen offensichtlich pathologische Veränderungen des A β -Stoffwechsels eine mindestens so wichtige Rolle zu wie Punktmutationen der A β -Sequenz. Die Auseinandersetzung mit den einzelnen mutationstragenden Familien hat aber noch weitere Implikationen.

6.5.4 Implikationen der Erforschung familiärer AD-Formen

Das Interesse an der Erforschung der familiären AD ist kein rein akademisches. Familien mit einer Mutation bieten ein zahlenmäßig großes genetisch homogenes Studienkollektiv, an dem vor allem die Wirksamkeit präventiver Maßnahmen untersucht werden kann. Bisher scheiterten Studien an mangelnder Kooperationsbereitschaft sowie an geringen Mitgliedszahlen betroffener Familien. Kürzlich begann in Kolumbien eine groß angelegte Studie, an der etwa 5000 Mitglieder einer erweiterten Familie mit der sogenannten „Paisa“-Mutation im Präsenilin-1-Gen (E280A) teilnehmen (Lopera et al., 1997). Das Projekt ist eine internationale Kollaboration von Universitäten und Industrie unter der Aufsicht von Francisco Lopera von der Universidad de Antioquia in Medellin, der seit den 1980er Jahren mit den betroffenen Familien zusammenarbeitet. Es sind bereits Daten zum Verlauf kognitiver Leistungen publiziert (Acosta-Baena et al., 2011). In Zukunft sind Therapie- sowie Präventionsstudien geplant, deren Ergebnisse auf alle Alzheimer-Erkrankten ausgeht werden sollen.

6.6 GENETISCHE URSACHEN DER SPORADISCHEN AD

Über 99% der Alzheimer-Patienten sind von einer sogenannten sporadischen AD betroffen (Blennow et al., 2006). Dabei kann es durchaus zu familiärer Häufung an Erkrankungen kommen. Jedoch treten diese Fälle meist jenseits des 65. Lebensjahrs auf und der Vererbungsmodus ist nicht autosomal dominant. Bei sporadischen AD-Formen wird nicht von einer monogenetischen Ätiologie ausgegangen, sondern von sogenannten genetischen Assoziationen. In solchen Fällen haben Personen mit einer bestimmten Isoform eines bestimmten „Risiko“-Gens ein gegenüber der Normalbevölkerung deutlich erhöhtes Erkrankungsrisiko. Das relevanteste beschriebene Risikogen der AD kodiert für Apolipoprotein E (ApoE) und befindet sich auf Chromosom 19.

6.6.1 ApoE

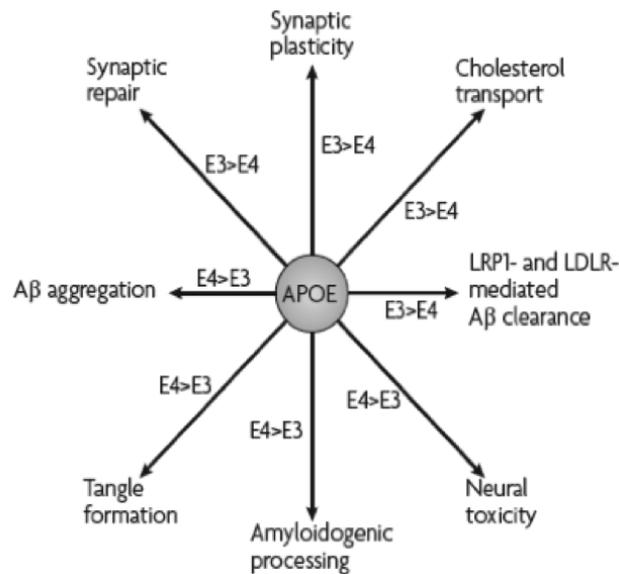


Abb. 4 Pathologische Funktionen der ApoE-Isoformen E3 und E4 im Zusammenhang mit der AD. Darstellung unterschiedlicher Auswirkungen von E3 bzw. E4 im Bezug auf AD-Pathologien. LDLR= Low Density Lipoprotein Receptor, LPR1=LDLR-related Protein 1.

Quelle: modifiziert nach Bu, 2009

Das ApoE-Gen existiert in drei Allel-Varianten – $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ – und kodiert jeweils für drei Plasmaprotein-Isoformen – E2, E3, E4. Diese unterscheiden sich in je einer Aminosäure an Position 112 oder 158. Physiologisch ist ApoE am Abbau von Triglyceriden beteiligt.

Bestimmte Isotypen von ApoE unterscheiden sich in jeweils einer Aminosäure und sind mit einem höheren Erkrankungsrisiko für AD assoziiert. So haben Personen mit ApoE 4-Genotyp ($\epsilon 4$) ein drei- bis vierfach erhöhtes, Personen mit ApoE 2 ($\epsilon 2$) hingegen ein erniedrigtes Erkrankungsrisiko gegenüber der Normalbevölkerung. (Corder et al., 1993, Strittmatter et al., 1993, Bu, 2009).

Interessanterweise stellen Corder et al. fest, dass praktisch alle Patienten, die homozygot für ApoE4 sind, spätestens im Alter von 80 Jahren eine AD entwickeln (Corder et al., 1993). Der ApoE4-assoziierte Altersgipfel für die klinische Manifestation liegt dabei zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr, womit ApoE4 den wichtigsten Risikofaktor für die late-onset AD darstellt (Blacker et al., 1997).

Im neuronalen Stoffwechsel verstärkt ApoE entweder neurotoxische oder schwächt die neuroprotektiven Mechanismen im Vergleich zu anderen ApoE-Allelen.

Das ApoE4-Allel und sein erhöhtes Vorkommen in Populationen mit AD – 40% gegenüber 15% in der Normalbevölkerung – wurde beim Design von therapeutischen Studien berücksichtigt. So hat eine Immunisierungsstudie mit dem A β -Antikörper „Bapineuzumab“ je einen Studienarm für ApoE4-Allel Träger und Nichtträger (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00575055>).

Homozygote und heterozygote Träger des ApoE4-Allels haben ein gegenüber einer ApoE4-negativen Person deutlich erhöhtes Risiko an AD zu erkranken. Aufgrund nachgewiesener negativer Effekte von ApoE4 auf den neuronalen Metabolismus bilden ApoE4-positive AD-Patienten in klinischen Studien ein eigenständiges Kollektiv.

6.7 AMYLOID PRECURSOR PROTEIN STOFFWECHSEL

A β stellt ein Spaltprodukt des Amyloid Precursor Proteins (APP) dar und bildet den Hauptbestandteil unlöslicher extrazellulärer Plaques im Hirngewebe von AD-Patienten. Mit den drei sogenannten Sekretasen und unterschiedlichen Spaltprodukten bildet der APP-Stoffwechsel einen integralen Bestandteil der A β -Pathologie. Die folgenden Abschnitte erläutern die Grundzüge dieses Stoffwechsels.

6.7.1 A β ist ein Spaltprodukt des APP

Das Transmembranprotein APP wird von zahlreichen Geweben des menschlichen Organismus exprimiert (Tanzi et al., 1987). Seine einzelnen Funktionen sind weitgehend ungeklärt. In den Neuronen kommt es jedoch vor allem im Bereich der Synapse vor, wo es an Synapsenbildung und synaptischer Plastizität beteiligt ist (Turner et al., 2003, Priller et al., 2006). In den einzelnen Geweben werden unterschiedliche Isoformen von APP exprimiert (Tanzi et al., 1987). Diese entstehen durch alternatives RNA-Splicing (Ponte et al., 1988, Kosik, 1992), wobei Neurone neben dem 751 Aminosäuren langen APP751 auch das kürzere APP695 exprimieren (Matsui et al., 2007). APP wird auf Chromosom 21 codiert, weswegen das Hirnparenchym von etwa 40-jährigen Patienten mit Down-Syndrom ebenfalls erhöhte A β -Spiegel aufweist (Masters et al., 1985). Die Prozessierung von APP zu A β erfolgt

durch Sekretasen. Diese stellen eine heterogene Gruppe von Proteasen dar, die in α -, β -, und γ -Sekretase eingeteilt werden.

Das 38 bis 43 Aminosäuren lange A β -Peptid hat eine Masse von 4,2 bis 4,5 kDa. Seine Aminosäuresequenz beginnt bei Aminosäure 590 von APP und liegt dabei mit dem N-terminalen Ende im Extrazellulärraum. Der C-terminale Anteil des Peptids liegt innerhalb der Zellmembran, wo es nur von einer besonderen Klasse von Proteasen gespalten werden kann. Dieser Klasse der intramembranös spaltenden Proteasen gehört die γ -Sekretase an (Beel and Sanders, 2008). Die α - und β -Sekretase schneiden hingegen außerhalb der Membran, wobei die β -Sekretase am Anfang der A β -Sequenz spaltet und dadurch das Peptid bildet. Im Gegensatz dazu spaltet die α -Sekretase APP nach Aminosäure 16 der A β -Sequenz und verhindert dadurch die A β -Synthese (siehe Abb.). Anhand der Tatsache, ob A β entsteht oder nicht, werden bei der Proteolyse durch die α - und β -Sekretase zwei Kaskaden unterschieden – die amyloidogene und nicht-amyloidogene Kaskade. Am Anfang der nicht-amyloidogenen Kaskade steht die α -Sekretase. Die β -Sekretase leitet die amyloido-

Nicht-amyloidogene Kaskade

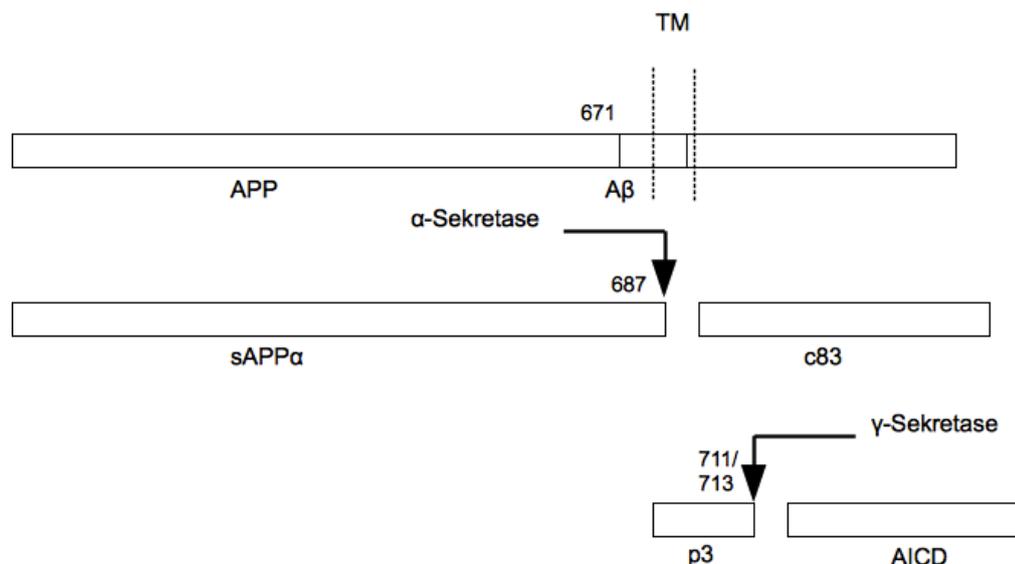


Abb. 5 Nicht-amyloidogene Kaskade der APP-Prozessierung. Das Transmembran-protein APP wird durch die α -Sekretase an Aminosäure 687 (16. Aminosäure der A β -Sequenz) proteolysiert. Dabei entstehen das N-terminale Fragment sAPP α sowie c83. Nach anschließender Proteolyse durch die γ -Sekretase entstehen aus c83 die C-terminalen Fragmente p3 und AICD. Anmerkung: TM bezeichnet den Transmembran-Abschnitt von APP. Quelle: modifiziert nach Selkoe, 1998

gene Kaskade ein. Die γ -Sekretase schließt jeweils beide Stoffwechselwege ab.

Bei der nicht-amyloidogenen Kaskade wird die A β -Synthese verhindert, weil die α -Sekretase APP innerhalb der A β -Sequenz proteolysiert. Dabei wird die extrazelluläre Domäne (sog. Ektodomäne) von APP abgespalten (Lichtenthaler, 2006, 2011b). Diese wird als sAPP α (soluble APP α) bezeichnet und ist der längere extrazelluläre N-Terminus des Proteins. Sie wird bei diesem sogenannten „Ectodomain Shedding“ in den Extrazellulärraum entlassen (Lichtenthaler, 2006). In der Zellmembran verbleibt das C-terminale Fragment c83 (auch α -C-terminales Fragment genannt). Nach anschließender Spaltung durch die γ -Sekretase wird aus c83 das nicht pathogene Fragment P3 (A β 17-42) in den Extrazellulärraum sezerniert (Vassar et al., 1999); in der Zellmembran verbleibt das sogenannte AICD (intracellular domain of APP).

Wie die nicht-amyloidogene läuft auch die amyloidogene Kaskade sowohl an der Zellmembran als auch innerhalb der Zelle an Endosomen, dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat ab (Haass et al., 1992, Annaert et al.,

Amyloidogene Kaskade

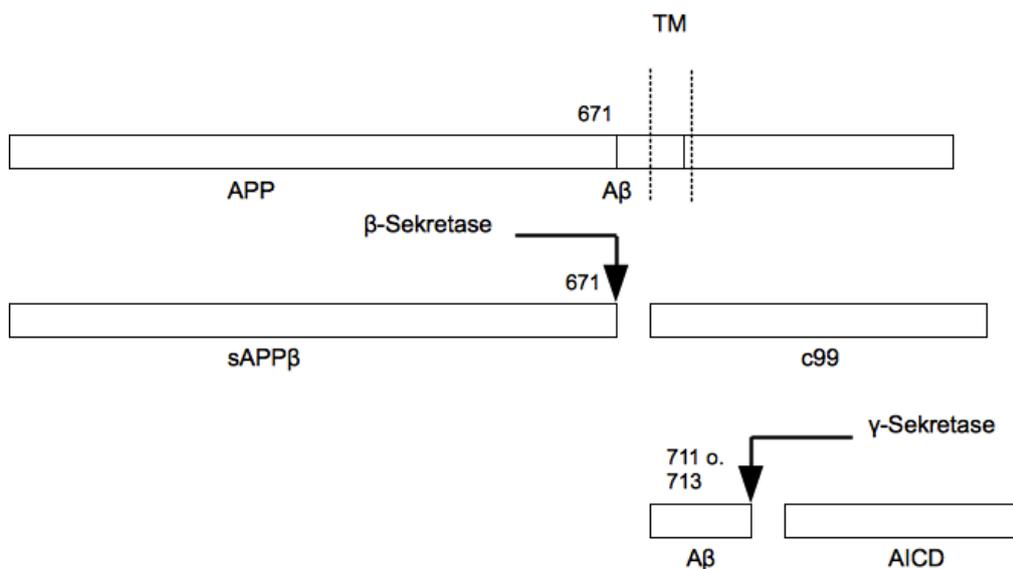


Abb. 6 Amyloidogene Kaskade der APP-Prozessierung. Das Transmembranprotein APP wird durch die β -Sekretase an Aminosäure 671 (erste Aminosäure der A β -Sequenz) proteolysiert. Dabei entstehen das N-terminale Fragment sAPP β sowie c99. Nach anschließender Proteolyse durch die γ -Sekretase entstehen aus c99 die C-terminalen Fragmente A β und AICD. Anmerkung: TM bezeichnet den Transmembran-Abschnitt von APP. Quelle: modifiziert nach Selkoe, 1998

1999). Die β -Sekretase führt bei der amyloidogenen Kaskade den ersten Proteolyse-schritt aus. Das Enzym kommt neben der Zellmembran auch in der Membran von Endosomen vor (Chyung and Selkoe, 2003, Kinoshita et al., 2003). Die Schnittstelle der β -Sekretase (Aminosäure 671) liegt 16 Aminosäuren weiter von der Zellmembran entfernt als die α -Sekretase (Aminosäure 687). Somit entsteht zunächst das lösliche sAPP β als N-terminales Fragment. Als C-terminales Fragment verbleibt c99 (β -CTF) in der Zell-/ Endosomenmembran. Die nachfolgende Spaltung von c99 durch die γ -Sekretase entlässt A β aus der Membran. Wie schon bei der nicht-amyloidogenen Kaskade bleibt wiederum AICD in der Membran zurück.

Im Zuge beider Kaskaden wird APP in drei unterschiedlich große Peptide proteolysiert. Diese Peptide sind jeweils ein lösliches N-terminales Peptid (sAPP α oder sAPP β) ein kurzes „Zwischenstück“ (P3 oder A β) sowie das in der Zellmembran verbleibende C-terminale Peptid AICD. sAPP α und P3 entstehen dabei nur bei der nicht-amyloidogenen Kaskade. sAPP β und A β sind Endprodukte ihres amyloidogenen Pendant. AICD ist schließlich die gemeinsame Endstrecke. Das nächste Kapitel erläutert die bisher bekannten Funktionen der einzelnen APP-Fragmente.

6.7.2 Physiologische Funktionen von APP und seinen Fragmenten

Trotz intensiver Bemühungen ist bisher insgesamt wenig über die physiologischen Funktionen von APP oder seinen Fragmenten bekannt. *In vitro* und *in vivo*-Modelle dienen dem Gewinn von Erkenntnissen über die einzelnen Funktionen.

In *in vitro*-Modellen beeinflusst Amyloid Precursor Protein (APP) Synapsenzahl und Funktion an kultivierten Neuronen (Priller et al., 2006). *In vivo* zeigt sich interessanterweise, dass APP-Knockout-Mäuse lebensfähig sind und kaum Veränderungen im Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigen. Beschrieben ist bei solchen Tieren lediglich eine verschlechterte Long-Term Potentiation (siehe Kapitel 6.5.3) (Phinney et al., 1999, Matsuyama et al., 2007), die aber ebenso bei Mäusen mit APP-Überexpression zu beobachten ist (Matsuyama et al., 2007).

Ob A β eine physiologische Funktion hat, ist umstritten. Plant et al. haben beobachtet, dass erniedrigte A β -Konzentrationen einen negativen Effekt auf das Überleben von Neuronen haben (Plant et al., 2003). Desweiteren wurde ein negativer Effekt von A β auf die Aktivierbarkeit von Synapsen beschrieben (Kamenetz et al., 2003). Im März 2010 wurde eine Arbeit publiziert, die dem Peptid eine membranolyti-

sche Funktion bei der unspezifischen Abwehr von Erregern zuschreibt (Soscia et al., 2010). Das würde laut den Autoren für eine Alzheimer-Ätiologie sprechen, bei der Infektionen einen Trigger darstellen würden (Kamer et al., 2008).

Die N-terminalen Fragmente sAPP α (soluble Amyloid Precursor Protein α) und sAPP β zeigen darüberhinaus gegensätzliche Effekte auf das Überleben von Neuronen. sAPP α werden dabei neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben (Araki et al., 1991). In neuronalen Kulturen ist es in der Lage, Neuriten-Wachstum zu stimulieren (Ohsawa et al., 1997) – ein Effekt, der sich auch *in vivo* zeigen ließ (Roch et al., 1994). Neben diesem rein morphologischen gibt es auch eine funktionelle Wirkung des Peptids. So zeigten mit sAPP α behandelte Tiere nach Scopolamin-induzierten Lernstörungen bessere mnestiche Leistungen als unbehandelte Kontrolltiere (Meziane et al., 1998). Ein weiterer wichtiger Aspekt von sAPP α ist, dass durch seine Bildung der A β -Synthese Substrat entzogen wird.

Im Gegensatz zu sAPP α ist sAPP β als Ligand am sogenannten DR6 (Death Receptor 6) zytotoxisch. Dabei führt ein Entzug von trophischen Faktoren bei Neuronen zu einer Erhöhung der Konzentration von sAPP β im Extrazellulärraum. Dort bindet das durch die β -Sekretase gespaltene APP-Fragment an den DR6 und ruft neuronalen Zelltod hervor (Nikolaev et al., 2009).

Beim P3 ist keine physiologische Funktion bekannt. Obwohl es definitionsgemäß im Rahmen der nicht-amyloidogenen Kaskade entsteht, ist P3 als Bestandteil von Amyloid-Plaques beschrieben (Higgins et al., 1996). Desweiteren ruft es *in vitro* an Neuronen Apoptose hervor, jedoch nicht in dem Maße wie A β (Wei et al., 2002).

Das aus der Spaltung durch die β -Sekretase hervorgehende C-terminale Fragment (β -CTF) stört die Endosomen-Funktion (Jiang et al., 2010). Da die Endozytose eine wichtige Rolle bei der neuronalen Homöostase und Wachstum spielt, steigert β -CTF die Vulnerabilität von Neuronen (Nixon, 2004).

Das 55-57 Aminosäuren lange AICD ist der intrazelluläre Teil des APP und entsteht aus α - oder β -CTF nach Proteolyse durch die γ -Sekretase. Es ist ein unter physiologischen Bedingungen ein Transkriptionsfaktor (Cao and Sudhof, 2001). Desweiteren ist das Peptid möglicherweise an Apoptose, der Dynamik des Zytoskeletts sowie an der Neuroinflammation beteiligt (Chang and Suh, 2010).

Zusammenfassend bleibt Jahre nach seiner Entdeckung A β das am besten erforschte Spaltprodukt von APP. Von den weiteren Peptiden hat sAPP α ein intensives Interesse erfahren. Grund dafür sind seine neuroprotektiven Eigenschaften sowie die Tatsache, dass die Aktivierung der nicht-amyloidogenen Kaskade die Synthese von A β unterdrückt.

6.7.3 Konformationen von A β und ihre Wirkung auf die Toxizität

A β besteht aus 39-43 Aminosäuren und zeigt in wässriger Lösung eine starke Aggregationstendenz (Hilbich et al., 1991). Für seine pathologische Wirkung ist die räumliche Konformation von entscheidender Bedeutung. Das Spektrum geht dabei von löslichen Monomeren und Oligomeren bis hin zu unlöslichen höheren Oligomeren und Fibrillen (Selkoe, 2002b). Nach aktuellem Wissensstand sind lösliche Oligomere diejenige A β -Konformation, die *in vivo* für Störungen der Synapsenfunktion verantwortlich ist (Cleary et al., 2005, Minano-Molina et al., 2011). Vor allem langkettige A β mit über 42 Aminosäuren haben eine erhöhte Aggregationstendenz (Snyder et al., 1994). Passend zu diesem Befund wird bei familiären AD-Formen eine verstärkte Bildung längerer A β -Peptide beobachtet – beschrieben als zunehmende A β 42/40-Ratio (Iwatsubo et al., 1994, Suzuki et al., 1994a).

Da, wie eingangs ausgeführt, im ZNS von AD-Patienten Amyloid-Plaques gefunden wurden, wurde zunächst davon ausgegangen, dass diese neurotoxisch seien (Lorenzo and Yankner, 1994). Plaques sind in neuritische und diffuse Plaques eingeteilt worden. Diesen sind jeweils spezifische Eigenschaften zugeschrieben worden. In den letzten 10 Jahren sind Plaques bzgl. ihrer neurotoxischen Eigenschaften in den Hintergrund getreten und lösliche A β -Oligomere als toxische Spezies zunehmend in den Fokus der Forschung geraten (Lambert et al., 1998, Walsh et al., 2002, Lesne et al., 2008). Diese hatten zunächst unterschiedliche Bezeichnungen, wie z.B. ADDL (A β -derived diffusible ligands) (Lambert et al., 1998), mittlerweile werden sie weitgehend einheitlich als „soluble oligomers“ (deutsch: lösliche Oligomere) bezeichnet.

Für die Erforschung der Oligomer-Effekte sind sehr viele unterschiedliche Aggregations-Protokolle etabliert. Diese Tatsache erschwert die Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen untereinander. Für diese Dissertation

wurde ein von Rakez Kayed etabliertes Oligomerisierungs-Protokoll (Kayed et al., 2004) in leicht modifizierter Form benutzt.

6.8 MIKROGLIA

Die Mikroglia-Zelle ist ein wichtiger Bestandteil der Immunabwehr des ZNS. Mikroglia werden nach ihrem Entdecker auch als Hortega-Zellen bezeichnet (Rio-Hortega and Penfield, 1927). Sie stellen den größten Anteil an residenten Makrophagen des zentralen Nervensystems dar. Weitere gewebeständige Makrophagen-Spezies des ZNS sind u.a. perivaskuläre oder meningeale Makrophagen. Mikroglia bilden die erste Stufe der Abwehr gegen Gewebeschäden und Infektionen und sind daher für die intrazerebrale Immunabwehr essentiell.

Die Morphologie der einzelnen Mikroglia-Zelle hängt von der Präsenz von Pathogenen ab. Unter nicht-pathologischen Bedingungen suchen Mikroglia mit weit verzweigten hochbeweglichen Fortsätzen die Umgebung nach Milieuveränderungen und Pathogenen ab (Nimmerjahn et al., 2005). Werden solche erkannt, gehen Mikroglia in einen „aktivierten“ Zustand über (Mosser and Edwards, 2008). Dieser geht morphologisch mit einer Verklumpung der Fortsätze und Hypertrophie des Zellkörpers einher.

Auch funktionell unterscheidet sich die aktivierte Mikroglia grundlegend von der ruhenden Zelle. Es wird eine Vielzahl von spezifischen Genen exprimiert, die unter anderem Zytokine, Chemokine und Oberflächenrezeptoren kodieren. Zytokine dienen dabei der Initiierung und Aufrechterhaltung von Inflammation, Chemokine rekrutieren weitere Immunzellen und die Oberflächenrezeptoren leiten regulatorische Signale ins Zellinnere (O'Shea and Murray, 2008, Soehnlein and Lindbom, 2010). Außerdem sind aktivierte Mikroglia in der Lage, Erreger abzutöten sowie durch Phagozytose die Integrität des Ausgangsmilieus wiederherzustellen (Soehnlein and Lindbom, 2010).

Wie bei anderen gewebeständigen Makrophagen wird bei der Mikroglia ein Ursprung aus Knochenmarksstammzellen angenommen. Beim Feten werden in den Schwangerschaftswochen 12-15 erstmals Zellen mit mikroglialen Oberflächenstrukturen beobachtet (Rezaie et al., 2005), diese entstammen der Leber und sind somit mesenchymalen Ursprungs. Es können zwar lebenslang Mikroglia aus der Peripherie rekrutiert werden (Hickey and Kimura, 1988). Jedoch wird ein Großteil der

Mikroglia durch asymmetrische Zellteilung von ZNS-ständigen myeloiden Vorläuferzellen gebildet (Ransohoff and Perry, 2009). Diese sind während der Embryogenese ins ZNS eingewandert und halten durch eine langsame Teilungsrate die Zahl der Mikroglia lebenslang aufrecht (Lawson et al., 1992, Ransohoff and Perry, 2009). Asymmetrische Zellteilung bedeutet in diesem Zusammenhang, dass nach der Teilung eine Stammzellen und eine differenzierte Zelle vorliegt (Morrison and Kimble, 2006).

Die Eigenschaften der Mikroglia lassen ihr in der AD-assozierten Neurodegeneration sowohl eine protektive als auch eine schädigende Rolle zukommen. So ist sie einerseits in der Lage, apoptotische Zellen aufzuspüren und zu phagozytieren (Koizumi et al., 2007, Fuller and Van Eldik, 2008). Damit ist eine Wiederherstellung der morphologischen und funktionellen Integrität des Milieus möglich. Desweiteren wird überschüssig produziertes A β dem Extrazellulärraum und damit seiner zytotoxischen Wirkung entzogen. Auf der anderen Seite erhält aktivierte Mikroglia den Zustand der Neuroinflammation aufrecht. Hierbei liegen chronisch erhöhte Spiegel proinflammatorischer Faktoren vor, was die Neurodegeneration zusätzlich begünstigt (Griffin et al., 1989).

Es gibt zahlreiche weitere Theorien zur Wirkung von Mikroglia in der Pathogenese der AD. Eine Hypothese besagt, dass eine Seneszenz der Mikroglia eintritt. Im Zuge des hohen Zellalters kommt es dabei zu einer gestörten Mikroglia-Funktion, was zur Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen beitragen kann (Conde and Streit, 2006).

Nach aktuellem Wissensstand ist der Beitrag der Mikroglia zur Entstehung der AD schwierig zu quantifizieren. Letztendlich ist ein starker Verlust von Neuronen für den Krankheitsausbruch verantwortlich. Kritiker berufen sich auf Publikationen, die zeigen, dass neuronaler Zelluntergang auch in Mikroglia-depletierten AD-Mausmodellen zu beobachten ist (Grathwohl et al., 2009). Befürworter einer tragenden Rolle der Mikroglia verweisen auf das Konzept der Neuroinflammation, das im Folgenden erläutert wird.

6.9 NEUROINFLAMMATION

Der Begriff der Neuroinflammation bezeichnet eine reaktive chronische Aktivierung und Proliferation von Gliazellen, die dauerhaft zu erhöhten Konzentrationen

proinflammatorischer Effektoren im ZNS führt (Streit, 2006). Als Auslöser kommen unterschiedliche Mechanismen infrage. So wird eine neuroinflammatorische Komponente bei zahlreichen Pathologien des ZNS beobachtet, wie bei der AD, dem Morbus Parkinson oder auch in Folge eines Schlaganfalls (Streit et al., 2004). Die dauerhafte Veränderung des ZNS-Milieus beeinträchtigt dabei die neuronale Funktion.

Bereits 1989 wurde erkannt, dass aktivierte Mikroglia nicht nur ein Epiphänomen der AD darstellt, sondern dass sie auch selbst zur Neurodegeneration beitragen kann (Griffin et al., 1989). Zusätzlich gibt es Hinweise auf eine erniedrigte Prävalenz von AD bei Patienten, die chronisch NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drugs) einnehmen (Weggen et al., 2007). Wie oben ausgeführt, zeigen NSAID bei AD-Patienten allerdings in prospektiven Studien keine Wirksamkeit (Etminan et al., 2003, Weggen et al., 2007, Vlad et al., 2008).

Das älteste Modell der experimentell auslösbaren Neuroinflammation ist die „Experimentelle Allergische Enzephalomyelitis“ als Modell der Multiplen Sklerose. Eine akute Entzündung geht dabei mit der Ausschüttung sogenannter damage-associated molecular pattern molecules (DAMP) einher. Solche Moleküle liegen unter physiologischen Umständen nur im Zellinnern vor oder bilden Bestandteile der Zellmembran. Ein extrazelluläres Vorkommen ist Folge gestörter Zellintegrität. Unter anderem handelt es sich dabei um Hitze-Schock Proteine, oxidierte Lipide, DNA und ATP (Bianchi, 2007). Zielstrukturen von DAMPs sind Oberflächenrezeptoren von Makrophagen wie z.B. Scavenger-Rezeptoren und Toll-like-Rezeptoren, die von gewebebeständigen Mikroglia exprimiert werden.

Im Fall der AD ist aggregiertes A β der wichtigste Auslöser der chronischen Entzündungsreaktion. Durch die Aktivierung von Scavenger- und Toll-like Rezeptoren kommt es zu einer chronischen Entzündungsreaktion (Bamberger et al., 2003, Fassbender et al., 2004, Udan et al., 2008). Zusätzlich sind A β -Oligomere aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften in der Lage, die Integrität einer Lipiddoppelschicht, wie der Zellmembran, zu stören (Ambroggio et al., 2005, Last et al., 2011). So geschädigte Zellen schütten zusätzlich DAMPs aus und verstärken damit den Prozess der Neuroinflammation (Akiyama et al., 2000). Schließlich gibt es Hinweise darauf, dass bei der AD die mikrogläre Phagozytose eingeschränkt ist (von Bernhardi

et al., 2007). Das führt zur Persistenz des auslösenden Reizes und zu einer Chronifizierung des inflammatorischen Prozesses.

Es ist umstritten, ob Neuroinflammation zu kognitiven Einschränkungen führt. So stellt eine Studie fest, dass Tiere drei Monate nach einer Sepsis mnestiche Störungen und eine Reduktion kortikaler cholinergischer Verschaltungen aufwiesen (Semmler et al., 2007). Eine weitere Gruppe beobachtete nach Behandlung von Ratten mit Endotoxin das Auftreten der neuropathologischen Merkmale einer AD wie die hippocampale Neurodegeneration sowie mnestiche Störungen (Hausse-Wegrzyniak et al., 1998a). Auf der anderen Seite beschreiben mehrere Studien eine Reduktion von Amyloid-Plaques durch zentrale inflammatorische Zustände (Shafiq et al., 2007b, Chakrabarty et al., 2010).

Die Kausalität zwischen Neuroinflammation und AD ist nicht abschließend geklärt. Zwar wurde das gleichzeitige Vorliegen von AD und Neuroinflammation festgestellt. Das ist aber auch bei zahlreichen anderen ZNS-Pathologien der Fall. Prospektive Studien mit NSAID zeigten keine klinische Besserung bei AD-Patienten unter anti-inflammatorischer Therapie (Bentham et al., 2008). Die genaue Rolle der Neuroinflammation bleibt deshalb weiterhin offen.

6.10 MAP KINASE-INHIBITOR CNI-1493

Bei CNI-1493 handelt es sich um ein synthetisch erzeugtes Guanylylhydrazon. Dieses ist ursprünglich als kompetitiver Inhibitor für den Zytokin-induzierten Arginin-Transport in Makrophagen entwickelt worden (Bianchi et al., 1995). Ziel der Entwicklung ist es gewesen, einen Wirkstoff herzustellen, der zwar die zytotoxische NO-Synthese von Makrophagen hemmt, dabei jedoch die regulatorische NO-Synthese – zum Beispiel die der Endothelzellen von Blutgefäßen – unbeeinflusst lässt. Während der Versuche ist aufgefallen, dass CNI-1493 Versuchstiere vor der tödlichen Wirkung von Endotoxin schützt. Dieser Effekt ist bei Dosen zu beobachten gewesen, die deutlich unter der Wirkungs-dosis für die NO-Synthesehemmung liegen. Eine Analyse der Zytokinprofile proinflammatorischer Zytokine – TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β – hat eine erniedrigte Ausschüttung bei zunehmenden Dosen von CNI-1493 ergeben (Bianchi et al., 1996).

Die beschriebenen CNI-1493-Effekte sind makrophagenspezifisch und lassen sich nicht an T-Lymphozyten auslösen (Bjork et al., 1997). Desweiteren sind sie zytokinspezifisch, da beispielsweise anti-inflammatorische Zytokine, wie TGF- β , nicht beeinflusst werden (Cohen et al., 1996).

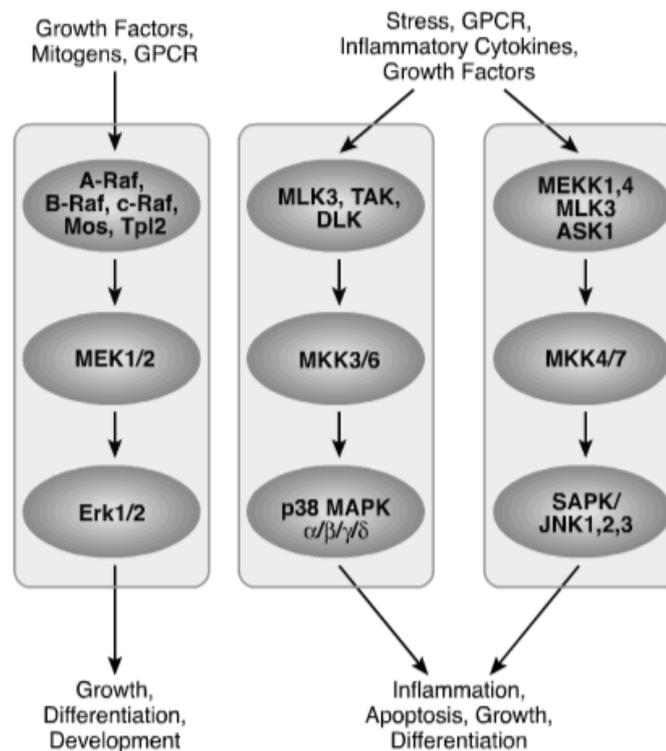


Abb. 8 MAP-Kinase Signalwege. Es sind drei MAPK-Stoffwechselwege beschrieben, die üblicherweise nach dem Endglied der Kette, d. h. der eigentlichen MAP-Kinase, benannt werden. Alle drei Signalwege werden durch CNI-1493 beeinflusst. Quelle: modifiziert nach http://www.cellsignal.com/reference/pathway/images/MAPK_Cascades.jpg

Der Wirkmechanismus bei der Erniedrigung der Spiegel von TNF α scheint posttranskriptionell zu liegen, weil TNF α -mRNA nicht beeinflusst wird (Cohen et al., 1996). Es wurde gezeigt, dass CNI-1493 die Phosphorylierung und dadurch die Aktivierung von p38 (HOG1/stress-activated protein kinase II) (Cohen et al., 1997) und p54 (c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase I) blockiert (Hunt et al., 1999). Zudem ist c-Raf ein direktes Zielmolekül von CNI-1493, nicht aber b-Raf (Lowenberg et al., 2005). Damit inhibiert CNI-1493 die drei MAPK (Mitogen activated protein kinase) Signalwege p38, JNK 1,2,3 und ERK 1/2.

CNI-1493 wurde bei der Behandlung chronisch entzündlicher Zustände untersucht. In Mäusen war es bei letaler Endotoxämie (Bianchi et al., 1995) sowie bei der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) wirksam (Martiney et al.,

1998). Zur Behandlung des Morbus Crohn wurde CNI-1493 in klinischen Studien in Phase I und II getestet (siehe <http://clinicaltrials.gov>). Diese wurden jedoch nicht weitergeführt (Dotan et al., 2010).

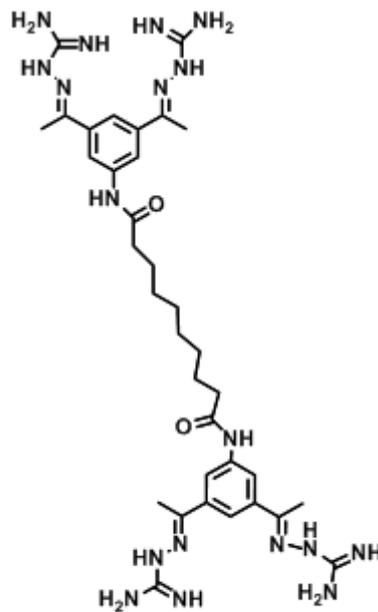
In unserer Arbeitsgruppe ist CNI-1493 bereits an Tiermodellen der AD untersucht worden (Bacher et al., 2008). Nach dem derzeitigen Kenntnisstand wirkt es sowohl durch eine Hemmung der inflammatorischen Kaskade als auch durch eine Interaktion mit A β . *In vitro* lässt sich die Interaktion von CNI-1493 und A β -Peptiden nachweisen, bei der es zur Veränderung von A β -Oligomeren und –Fibrillen kommt. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass CNI-1493 die Anzahl von Amyloid-Plaques reduziert. Gleichzeitig verbessert sich unter der Behandlung signifikant die Gedächtnisleistung der Versuchstiere. Außerdem wird die durch A β -induzierte Aktivierung der Caspasen 6 und 12, sowie die Cytochrom c-Ausschüttung und die Hochregulation von p53 durch CNI-1493 reduziert. Auch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch Mikroglia wird in Anwesenheit von CNI-1493 unterdrückt, wodurch es zu einer Verminderung der durch die Entzündungsreaktion hervorgerufenen neuronale Schädigung kommt.

Synonyme:

- N,N-bis[3,5-bis[N-(diaminomethylidenamino)-C-methyl-carbonimidoyl]phenyl]-decandiamid-tetrahydrochlorid
- Decandiamid,N,N-bis(3,5-bis(1-((aminoiminomethyl)hydrazono)ethyl)phenyl)-tetrahydrochlorid
- N,N-Bis(3,5-bis(1-((aminoiminomethyl)hydrazono)ethyl)phenyl)decandiamid-tetrahydrochlorid
- Semapimod tetrahydrochlorid
- CNI-1493
- AXD 455

CAS Nummer:164301-51-3

Molekulare Summenformel: C₃₄H₅₆Cl₄N₁₈O₂

**CNI-1493****Abb. 7 Strukturformel von CNI-1493**

6.11 P2Y2-REZEPTOREN

Der P2Y2-Rezeptor (P2Y2R) ist ein Protein G_q gekoppelter purinerges Rezeptor. Er wird von zahlreichen Geweben des menschlichen Organismus exprimiert, wobei er im ZNS sowohl auf Neuronen als auch auf Gliazellen nachgewiesen werden kann (Peterson et al., 2010). Interessanterweise ist der Rezeptor sowohl an der Verarbeitung inflammatorischer Reize als auch an der Prozessierung von APP beteiligt.

1970 sind erstmals Hinweise auf purinerge Rezeptoren gefunden worden. Dabei hat ATP (Adenosintriphosphat) sogenannte NANC Nerven (non-adrenergic, non-cholinergic) auf der glatten Darmmuskulatur stimuliert (Burnstock et al., 1970). Heute ist sowohl die synaptische Ausschüttung von Nukleotiden als auch die Familie der P1- und P2-Rezeptoren intensiv erforscht (Burnstock, 2008). Die Einteilung der Rezeptoren erfolgt nach pharmakologischen Gesichtspunkten. Adenosin aktiviert P1-Rezeptoren, während ADP und ATP Agonisten an P2-Rezeptoren sind. Zusätzlich werden die P2-Rezeptoren in P2X (ionotrope) und P2Y (metabotrope) Rezeptoren eingeteilt (Burnstock, 2009).

Unser Interesse wurde 2009 auf purinerge Rezeptoren gelenkt, nachdem eine Arbeit gezeigt hatte, dass der neuronale P2Y2R zum einen inflammatorisch reguliert

ist. Zum anderen ist dieser Rezeptor durch Aktivierung der α -Sekretase in der Lage, die nicht-amyloidogene Kaskade der APP-Prozessierung hochzuregulieren (Kong et al., 2009).

Agonisten des Protein G_q -gekoppelten P2Y2R stimulieren über die Phospholipase C die Bildung von Inositol1,4,5-Trisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) (Weisman et al., 1999). Diese setzen Kalzium aus intrazellulären Speichern frei und aktivieren die Proteinkinase C (PKC). Neben der Aktivierung der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung steuert der Rezeptor die Zellmigration (Bagchi et al., 2005). Desweiteren reguliert er die Phosphorylierung von EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), der ERK1/2- (extracellular-signal-regulated Kinase) sowie der p38-MAPK. EGFR beeinflusst im ZNS neuronales Überleben, ERK1/2- und p38-MAPK beeinflussen die Proliferation und Apoptose von Astrozyten (Wagner et al., 2006, Washburn and Neary, 2006, Burgos et al., 2007). Diese Vorgänge steuern gliale Anpassungsvorgänge im Zuge inflammatorischer Veränderungen des ZNS-Gewebes. Proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β), Interferon γ sowie Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) sind in der Lage P2Y2R hochzuregulieren (Peterson et al., 2010). Bei primären kortikalen Neuronen führt eine Stimulation mit IL-1 β zur Hochregulation von P2Y2R und später zur Aktivierung der α -Sekretase und damit der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung (Kong et al., 2009).

P2Y2R ist eine Gruppe von Rezeptoren, die unter inflammatorischen Bedingungen hochreguliert werden. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren führt zur Hochregulation der nicht-amyloidogenen Kaskade der APP-Prozessierung. Dabei entsteht vermehrt neuroprotektiv wirksames sAPP α . Desweiteren werden unterschiedliche Stoffwechselwege aktiviert, die das Überleben von Neuronen sowie Proliferation und das Überleben glialer Zellen steuern. Diese Eigenschaften machen den P2Y2R zu einem potenziellen Ziel bei der Therapie der AD.

7 FRAGESTELLUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Effekte der Behandlung mit A β und CNI-1493 auf primäre murine Neurone und Mikroglia charakterisiert werden. Zahlreichen Publikationen zufolge hat A β zytotoxische und proinflammatorische Effekte auf Zellen des zentralen Nervensystems. Diese Tatsache führte im Vorfeld der Versuche zur Formulierung folgender Fragestellungen:

1. In welchem Ausmaß ist eine Behandlung mit A β toxisch auf primäre murine Neurone und Mikroglia?
2. Hat eine Vorbehandlung mit CNI-1493 positive Effekte auf eine nachgewiesene A β -Toxizität?
3. Führt die Behandlung mit A β zu einer vermehrten mikroglialen Ausschüttung der Zytokine TNF α , IL-6, IL-1 β sowie IL-10 und beeinflusst eine Vorbehandlung mit CNI-1493 die Ausschüttung der oben genannten Zytokine?
4. Hat die Behandlung mit A β oder CNI-1493 einen Effekt auf die Expression des purinergen P2Y2-Rezeptors, der unter inflammatorischen Verhältnissen hochreguliert wird?

8 MATERIAL UND METHODEN

8.1 ZELLKULTUR

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer Sterilbank durchgeführt. Vor jedem Arbeitsgang wurden die Arbeitsflächen mit 70% Ethanol gereinigt. Als Verbrauchsmaterialien wurden hitzesterilisierte Glasgeräte und -gefäße und steril erworbene Plastikmaterialien verwendet. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Zellkulturbrutschrank bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit 5% CO₂.

8.1.1 Polyethylenimin (PEI)-Lösung

Vor der Inkubation primärer Zellen in Multiwell Zellkulturplatten wurden diese 24 h bei 36°C mit Polyethylenimin (PEI) beschichtet. Zur Herstellung einer PEI-Lösung wurde 14,4 g BORAX (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) abgewogen und in 800 mL sterilem Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 8,3 eingestellt. Anschließend wurde diese mit sterilem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt. Unter ständigem Rühren wurden nun 4 g Polyethylenimin (PEI, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) zugefügt. Mit Hilfe eines Magnetrührers wurde die Lösung 30 min rühren gelassen und anschließend steril filtriert.

Die PEI-Lösung wurde bei 4°C gelagert und vor Gebrauch nochmals steril filtriert. Bei der Beschichtung von Multiwell Zellkulturplatten war vor allem darauf zu achten, dass der Flüssigkeitsfilm den gesamten Boden der einzelnen Wells bedeckte.

8.1.2 Primäre Zellen

Es wurden primäre neuronale und mikrogliale Zellkulturen aus Swiss Webster (CFW[®]) Mäusen am Embryonaltag E13 isoliert. Die Präparation der Mikroglia erfolgte aus dem Mesenzephalon, die der neuronalen Mischkulturen aus dem Kortex.

24 h vor der Präparation wurden Zellkultur-Multiwell-Platten (6-, 12-, 24-Well) mit Polyethylenimin (PEI) beschichtet und bis zur Präparation bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Vor der Präparation wurden die Platten viermal mit steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Alle verwendeten Medien wurden vor Gebrauch steril filtriert.

Zur Präparation wurden die trächtigen Mäuse-Weibchen mittels Genickbruch getötet. Nach einer x-förmigen Laparatomie wurden die Embryonen freigelegt und

während der Präparation in L15-Medium gelagert. Mesenzephalata und Kortizes wurden nach Entfernung der darüber liegenden Schädeldecke und Lösen von anhaftenden Meningen in L15-Medium gegeben. Zur besseren Übersicht werden je 12 Mesenzephalata bzw. Kortizes in je einem 15 mL-Falcon gesammelt. Die Gehirne wurden nach der Präparation mit Hilfe einer 1000 µL Eppendorfpipette 25-Mal aspiriert, um eine homogene Suspension herzustellen. Anschließend wurde die Suspension mit L15-Medium auf 7 mL aufgefüllt, invertiert und 5-10 min stehen gelassen, damit größere Gewebeklumpen sedimentieren konnten. Nach Ablauf der Zeit wurden vom Überstand 5 mL in neue 15 mL-Falcons überführt und 3 min bei 1200 1/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einem geeigneten Volumen des jeweiligen Mediums resuspendiert.

8.1.3 Inkubation und Weiterverarbeitung der primären Mikroglia-Kultur

Mikroglia wurde in DMEM-Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin inkubiert. Die Zellen wurden zunächst in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Alle 3 Tage wurden 1000 µL Medium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Nach einer Woche wurde die Kultur mit Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) behandelt, um die Zellzahl der Mikroglia zu steigern. Nach Ablauf der Stimulationszeit von 3-5 Tagen wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers mechanisch von ihrer Unterlage gelöst und in PEI-beschichtete 12- bzw. 24-Well-Zellkulturplatten subkultiviert. Anschließend wurde eine Ruhezeit von mindestens 48 h vor der Durchführung von Versuchen eingehalten.

8.1.4 Inkubation der primären neuronalen Mischkultur

Neurone wurden in Neurobasal A-Medium mit 2% B27-Supplement, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin inkubiert. Nachdem die kortikalen Zellkulturen in 12- bzw. 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät worden waren, erfolgte kein Mediumwechsel. Eine Selektion neuronaler gegenüber glialen Zellen erfolgte durch die Wahl des Mediums und des B27-Supplements sowie durch Weglassen von fetalem Kalbserum (FCS). Eine Charakterisierung des Mikroglia-Anteils an der Gesamtheit der Zellen mittel FACS-Färbung mit CD11b-Antikörpern ergab einen Anteil von etwa 1% Mikroglia Zellen.

Die anschließenden Versuche wurden nach 5-7 Tagen Inkubationszeit im Zellkulturbrutschrank durchgeführt.

8.2 AMYLOID BETA ANSATZ

Für die Versuche wurden die beiden häufigsten A β -Spezies 1-40 und 1-42 verwendet. Die Peptide wurden bei -20°C aufbewahrt. Um aggregiertes A β zu erhalten, wurde ein von Rakez Kayed beschriebenes Protokoll in leicht modifizierter Form angewandt (Kayed et al., 2003). Vor einem Experiment wurde A β 1-40 abgewogen und in Lowbind-Eppendorf-Caps überführt, in deren Deckel vorher mit einer gelben Kanüle 5 Löcher gestochen worden waren. Danach wurde A β mit einer Konzentration von 3,33 mg/ml in Hexafluor-2-Propanol (HFIP) gelöst und kurz mit Hilfe des Vortex-Schüttlers durchmischt. Die Lösung wurde mit MilliQ-Wasser auf 1 mg/ml (ca. 232 μ M) aufgefüllt, kurz auf dem Vortex-Schüttler gemischt und für 15 min in ein Ultraschallbad mit 65°C heißem Wasser gestellt. Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe eines Magnetrührstäbchens bei einer Umdrehungszahl von 1400 /min für 48 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Ablauf von 48 h wurde das Eppendorf-Cap 10 min in einer Vakuumzentrifuge zentrifugiert, um letzte HFIP-Reste zu evaporieren. Das verdunstete Volumen wurde mit Hilfe einer Pipette durch sterile phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) aufgefüllt.

A β 1-42 wurde im Wesentlichen gleich behandelt. Es wurde mit 1,52 mg/ml in HFIP gelöst und anschließend auf 0,45 mg/ml (100 μ M) mit doppelt destilliertem Wasser (MilliQ) aufgefüllt. Nach dem Ultraschallbad wurde die Lösung für 24 h unter Rühren bei Raumtemperatur stehen gelassen und für 1 h bei Vakuum zentrifugiert. Das verdunstete Volumen wurde ebenfalls mit PBS aufgefüllt.

Die Zellen wurden mit A β -Konzentrationen von 1, 5 und 10 μ M behandelt. Als Lösungsmittelkontrolle dienten entsprechende Volumen von HFIP in MilliQ-Wasser (Verhältnis 0,3:0,7). Diese wurden gleich behandelt wie die A β -Ansätze und für die Versuche in der Zellkultur benutzt.

8.3 CNI-1493 BEHANDLUNG PRIMÄRER ZELLEN

CNI-1493 wurde bei +4°C gelagert. Es wurde vor den Versuchen abgewogen und auf 20 mg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, etwa 1 min mit dem Vortex-Schüttler gemischt und 3 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde die

Lösung auf 1 mg/ml mit MilliQ-Wasser aufgefüllt, wiederum 1 min mit dem Vortex Schüttler durchmischt und für 3 min im Ultraschallbad behandelt.

Für Experimente zur Dosiswirkung wurden primäre Mikroglia oder Neurone mit CNI-1493 bei Konzentrationen von 1 bis 10 μM behandelt. Die Auswertung der Effekte erfolgte nach 24 oder 48 h mittels MTT- und LDH-Test. Als Lösungsmittelkontrolle dienten entsprechende Volumen aus DMSO und MilliQ-Wasser (Verhältnis 1:20) ohne CNI-1493.

Für Wirksamkeitsstudien bezüglich anti-inflammatorischer Effekte von CNI-1493 wurde nach 24-stündiger Präinkubation mit 2,5 μM CNI-1493 A β in einer Konzentration von 10 μM in jedes Well einer 24-Well Multiwell Platte gegeben. Bei der Auswertung wurde mittels ELISA die Konzentration proinflammatorischer Zytokine im Zellkulturmedium bestimmt. Dabei wurde nach 24-stündiger A β -Behandlung das gesamte Medium abgenommen und bei -80°C gelagert. Später wurde in dem unverdünnten Medium die Konzentration der Zytokine TNF α , IL-6, IL-1 β und IL-10 mittels ELISA-Kit bestimmt.

Um die Wirksamkeit von CNI-1493 gegen A β -Toxizität an Neuronen zu untersuchen, wurden die Zellen 24 h mit CNI-1493 präinkubiert und anschließend mit 5 μM A β behandelt. Die Auswertung des Versuchs erfolgte nach 48 h mittels MTT-Assay. Sämtliche Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt ($n \geq 3$). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Versuch.

8.4 ZELLTOXIZITÄTSASSAYS

8.4.1 *Mitochondrialer Zellvitalitätsassay (MTT)*

Beim MTT-Assay handelt es sich um einen Test auf Zellvitalität und Proliferation. Lebende Zellen nehmen das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) auf und setzen es mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem stark blauen, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff um.

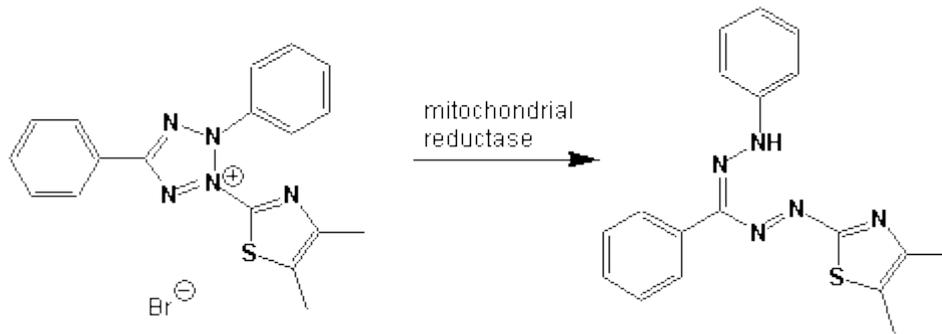


Abb. 9 Reaktionsmechanismus des MTT-Tests. Das Tetrazoliumsalz MTT wird mittels der mitochondrialen Reduktase zu einem Formazanfarbstoff umgewandelt. Bei der Auswertung wird die Tatsache ausgenutzt, dass Edukt und Produkt unterschiedliche Absorptionsmaxima besitzen. Quelle: http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay

Für die fotometrische Messung (570-590 nm) zur Quantifizierung des Farbstoffs werden die Zellen mit einem organischen Lösungsmittel lysiert, um den Farbstoff freizusetzen und in Lösung zu bringen. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen.

Als Stocklösung wurden 5 mg/mL MTT-Pulver in PBS gelöst und in 2 mL-Aliquots bei -20°C gelagert. Für den Test wurde die MTT-Stammlösung im Zellkulturmedium im Verhältnis 1:10 (500 µg/mL) auf die Zellen gegeben und diese für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) lysiert und nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur die Absorption bei 570 nm im Photometer gemessen. Um Artefakte durch optische Unebenheiten auszuschließen, wurde zusätzlich die Absorption bei einer Referenzwellenlänge von 750 nm bestimmt. Diese Werte werden von den Absorptionswerten bei 570 nm abgezogen.

Die Zellvitalität wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Absorption}_{\text{behandelter Zellen}}}{\text{Absorption}_{\text{unbehandelter Zellen}}} * 100$$

8.4.2 LDH-Zytotoxizitätsassay

Mit dem LDH-Zytotoxizitätsassay wird im Gegensatz zum MTT-Test die Nekrose von Zellen nachgewiesen. Bei dieser kommt es zu einer Zellmembranpermeabilisierung, wodurch große Mengen zytosolischer Proteine in das Medium diffundieren, unter anderem auch die Laktatdehydrogenase (LDH). Die LDH katalysiert über die

Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ die Oxidation von Laktat zu Pyruvat. Diese Reaktion wird zur Quantifizierung des Enzyms als Stellvertreter der freigesetzten zytosolischen Proteine genutzt, wobei der Katalysator Diaphorase anfallendes NADH/H^+ wieder oxidiert, während er das gelbe Tetrazoliumsalz INT ((2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium Chlorid) in sein rotes Formazansalz umwandelt. Dieses kann anschließend photometrisch gemessen werden. Dadurch entsteht ein zeitabhängiger Kreislauf, der den Farbstoff umso schneller umsetzt, je mehr LDH zur Verfügung steht.

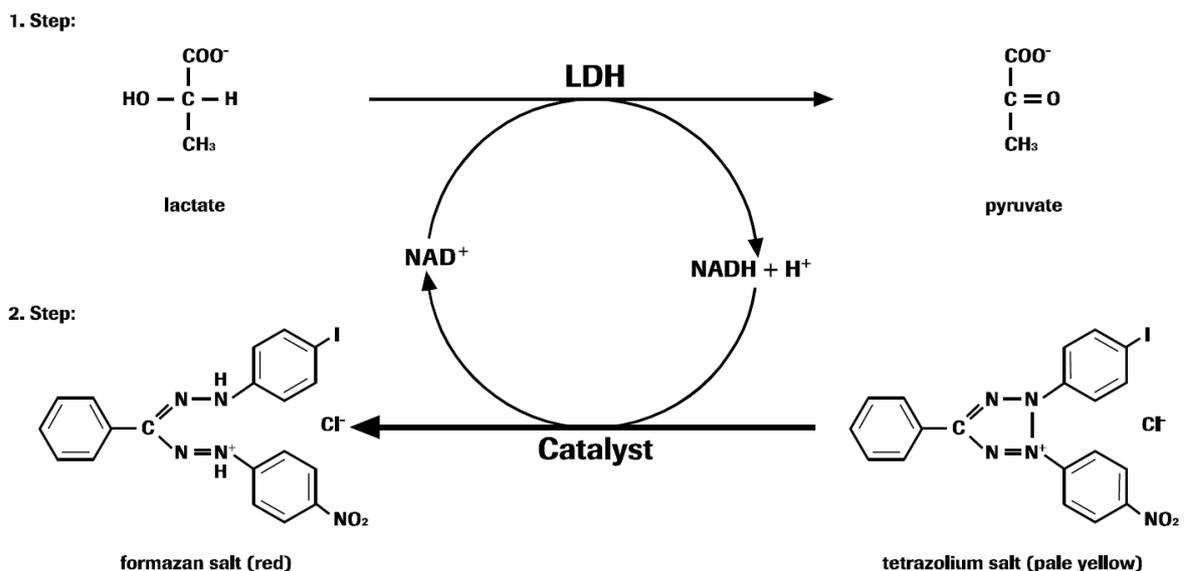


Abb. 10 Reaktionsmechanismus des LDH-Tests. Extrazelluläre LDH setzt Laktat zu Pyruvat um. Dabei entsteht die Reduktionsäquivalente NADH , die für die Umsetzung des Tetrazoliumsalzes INT zu einem Formazansalz gebraucht wird. Dieses wird anschließend photometrisch gemessen. Quelle: © Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland

Der LDH-Zytotoxizitätsassay ist eine Ergänzung zum MTT-Zellvitalitätsassay, um zytotoxische Effekte zu messen.

Um die maximal mögliche LDH-Ausschüttung bestimmen zu können (Positivkontrolle), wurden die Zellen in einigen Wells der 24-Well Multiwellplatte vor der LDH-Bestimmung mit 1% Triton X-100 lysiert. Für die photometrische Messung wurden 50 μL Medium in einer Mikrotiterplatte mit 50 μL MilliQ-Wasser verdünnt und mit 50 μL der Testlösung aus dem Kit gemischt. Nach 15 Minuten wurde die Absorption (Abs.) bei 490 nm gegen die Referenzwellenlänge von 750 nm gemessen.

Die Berechnung der Zytotoxizität erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Absorption}_{\text{behandelter Zellen}} / \text{Absorption}_{\text{unbehandelter Zellen}}}{\text{Absorption}_{\text{tritonbehandelter Zellen}}} * 100$$

Sämtliche Toxizitätsversuche wurden mindestens dreimal durchgeführt (n≥3). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Versuch.

8.5 PROTEOMISCHE VERFAHREN

8.5.1 Zytokin-ELISA

Der quantitative Nachweis von Zytokinen im Zellkulturüberstand erfolgte mittels ELISA-Kit-Analyse nach Protokoll des Herstellers.

Es handelt sich dabei um einen Sandwich-ELISA, bei dem die 96-Well Mikrotiterplatte zunächst mit einem zytokinspezifischen Antikörper beschichtet wird. Nach dem Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen wird die Probe aufgetragen und anschließend mit einem biotinylierten zytokinspezifischen Antikörper gekoppelt. Durch die Bindung von Meerrettichperoxidase (engl. Horseradish-Peroxidase, HRP) -gekoppeltem Streptavidin an das Biotin kann die Menge der gebundenen Antikörper über ein Farbsubstrat, das durch HRP umgesetzt wird, sichtbar gemacht werden. An-

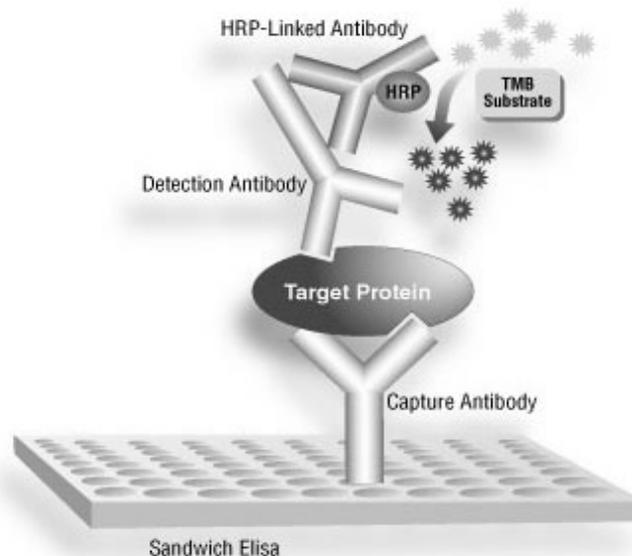


Abb. 11 Funktionsprinzip eines Sandwich-ELISA. Das Zielmolekül wird an einen Antikörper gebunden und anschließend von einem Detektionsantikörper erkannt. Mehrere HRP-gekoppelte Sekundärantikörper binden an den Detektionsantikörper und setzen das Substrat TMB zu einem Farbstoff um. Dieser kann dann gemessen werden. Quelle: © 2009 New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland

hand einer Standardkurve kann von der Absorption auf die Konzentration des Zytokins in der Probe geschlossen werden.

Der ELISA wurde nach Vorschrift des Herstellers in Round bottom ELISA-Platten der Firma IWAKI (Tokio, Japan) durchgeführt. Abweichend von der Herstellervorschrift wurde zum Blockieren Super Block verwendet und als Farbsubstrat 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB).

Die Messung der Zytokine aus Mikroglia-Überständen erfolgte nach 24 h Inkubationszeit. 100 µL Medium wurden in ein Well einer 96-Well-Multiwellplatte pipettiert. Nach Ablauf der vorgegebenen Inkubations- und Waschschrte wurde die Absorption mit Hilfe des Tecan M200 Multimode Reader gemessen.

Sämtliche ELISA-Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt (n≥3). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Versuch.

8.5.2 Proteinextraktion

Zur Erstellung von neuronalen und Mikroglia-Zelllysaten wurden 12-Well-Multiwell-Platten genutzt. Für Mikroglia-Kulturen wurden etwa 1,6 Mesenzephala pro Well, bei Neuronen 0,44 Kortizes pro Well ausgesät. Am Versuchstag wurden die Zellen mindestens 3 Stunden lang mit CNI-1493 vorbehandelt. Danach folgte die Behandlung mit Aβ. Nach Ablauf von 24 bzw. 48 h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die Proteinextraktion mittels M-PER-Puffer (Thermo Fischer Scientific, Bonn, Deutschland) durchgeführt, wodurch die zytosolische Fraktion gewonnen werden konnte. Um die Gesamtproteinfraktion einschließlich der Membranproteine zu extrahieren, wurde der RIPA-Puffer benutzt (Protokoll: <http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/WB-beginner.pdf>). Beiden Puffern wurden kommerziell erwerbliche Proteinase- bzw. Phosphatase-Inhibitoren (Complete 25 bzw. PhosStop, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) zugesetzt.

Puffer-Lösung wurde für 30 min bei +4°C auf die Zellen gegeben, das entstehende Gemisch wurde mittels eines Zellschabers abgezogen, in ein Eppendorf-Röhrchen pipettiert und für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und bei -80°C gelagert.

Die Dauer der Zellbehandlung war bei den einzelnen Experimenten unterschiedlich und werden bei den einzelnen Experimenten im Ergebnisteil genannt.

Sämtliche Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt ($n \geq 3$). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Versuch.

8.5.3 Gelelektrophorese

Um die Expression zellulärer Proteine unter CNI-1493-Behandlung zu untersuchen, wurden diese aus Zellen extrahiert und durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Bei der hier durchgeführten Gelelektrophorese handelt es sich um eine diskontinuierliche, eindimensionale SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Diskontinuität meint unter anderem, dass innerhalb eines Gels unterschiedliche Porengrößen vorkommen, was dazu dient, die Fokussierung einzelner Banden zu optimieren.

Im Proteinlysate liegen die zellulären Proteine ungeordnet vor. Durch Wechselwirkung mit dem Probenpuffer wird zunächst ihre räumliche Struktur aufgelöst. Dadurch liegen alle Proteine als unterschiedlich lange Aminosäureketten vor. Anschließend wird das Protein-Probenpuffer-Gemisch in das Sammelgel des Elektrophorese-Gels aufgetragen und entlang eines elektrischen Feldes gleichsam durch das Trenngel gezogen.

Die Wechselwirkung zweier Kräfte bestimmt dabei, wie weit einzelne Proteine laufen. Die eine Kraft ist die des Abstoßungskraft des elektrischen Feldes, die andere ist die Reibungskraft zwischen Protein und den Poren des Gels. Beide Kräfte sind einander entgegengesetzt. Das elektrische Feld bewirkt, dass sich die Proteine ins Gel bewegen, während die Poren des Gels (bestehend aus Acrylamid und Bisacrylamid) die Proteine je nach Kettenlänge unterschiedlich stark aufhalten. Dabei laufen kleine Proteine weiter als große. Je nach Molekulargewicht werden einzelne Proteine nach jeweils spezifischer Laufstrecke in Banden fokussiert. Nachdem die Laufmittelfront das untere Ende des Gels erreicht, wird das elektrische Feld abgestellt und die Proteine mittels Western Blot auf eine Membran übertragen.

Die elektrophoretische Auftrennung und der anschließende Western Blot erfolgten mit dem NuPage-System (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und den dazugehörigen kommerziell erwerblichen Puffern. 10 µg der jeweiligen zytosolischen oder Membranproteinfraktion wurden mit Probenpuffer für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und auf ein diskontinuierliches SDS-Polyacrylamid-Gradientengel geladen, das

sowohl für kleine, als auch für große Proteine eine gute Auflösung ermöglicht. Die anschließende Auftrennung der Proteine erfolgt bei konstant 200 V über 35 Minuten.

8.5.4 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine von einem Gel auf auf eine Trägermembran übertragen und anschließend unter Benutzung spezifischer Antikörper dargestellt.

Es existieren unterschiedliche Methoden, Proteinen auf eine Trägermembran zu übertragen. Bei dieser Arbeit wurde ein Tank-Blot-System verwendet, das mittels Elektrophorese funktioniert. Dabei wandern Proteine entlang eines senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichteten elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran. An deren Oberfläche haften Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt erhalten, die Proteine sind nun aber für weitere Methoden zugänglich (z. B. Antikörper-Bindung).

Für eine spezifische Antigenerkennung werden unspezifische Bindungsstellen auf der Trägermembran blockiert. Dies geschieht mit einem vom Antikörper nicht er-

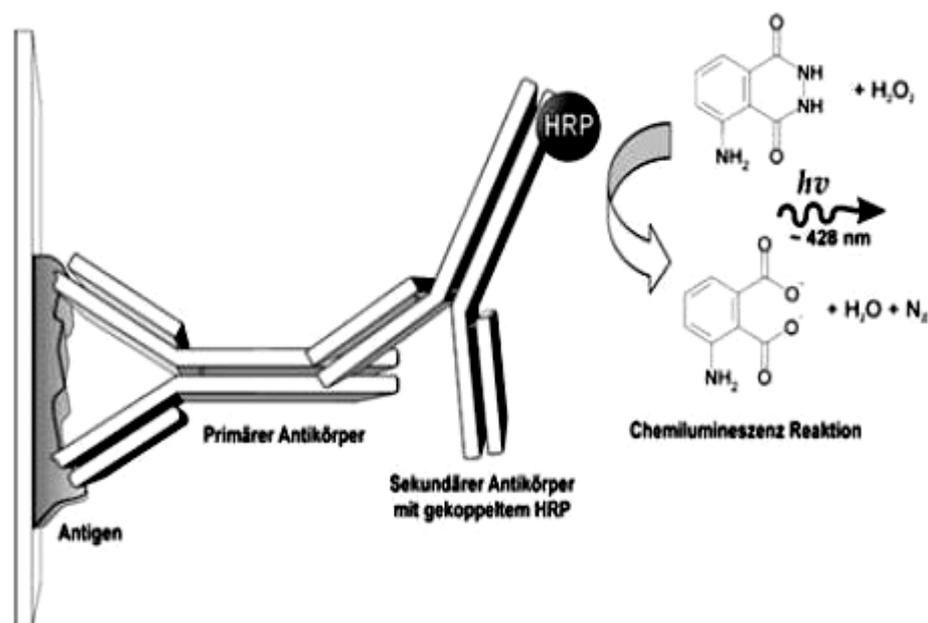


Abb. 12 Immundetektion im Western Blot. Der primäre Antikörper bindet an sein Antigen, welches auf einer Trägermembran fixiert ist. Ein HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper bindet wiederum an den Primärantikörper. HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, dessen Chemilumineszenz detektiert werden kann.

Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked_Immunesorbent_Assay

kannten Protein (z. B. Milchpulver) oder einem synthetischen Polymer. In dieser Arbeit wurde dazu Rotiblock (Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. An den spezifischen Primärantikörper bindet ein sekundärer Markierungsantikörper. Dieser ist meistens gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und an ein Detektionsmolekül gekoppelt. In dieser Arbeit wurde zur Detektion das Enzym Meerrettich-Peroxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP) verwendet. Dieses katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form. Die bei dieser Reaktion entstehende Lumineszenz kann mittels Röntgenfilm detektiert werden.

Der Proteintransfer vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte mittels Tank-Blot-Verfahren. In einer Transferkassette wurden die Komponenten in folgender Reihenfolge blasenfrei durch Ausrollen mit einer Glaspipette aufeinandergelegt: Schwamm, Whatman-Papier, Gel, Nitrozellulose-Membran, Whatman-Papier, Schwamm. Die Membran befand sich dabei auf der Seite der Anode und das Gel auf der Seite der Kathode. Der Western Blot wurde bei konstanter Stromstärke von 200 mA für 1 h durchgeführt.

Der erfolgreiche Transfer wurde mittels MemCode-Kit (Thermo Fischer Scientific, Bonn, Deutschland) sichtbar gemacht. Diese Färbung ist reversibel und interferiert nicht mit der späteren Bindung der Antikörper. Zusätzlich wird dadurch das Signal bei der Entwicklung des Films verstärkt. Die Membranen wurden mit Rotiblock über Nacht bei 4°C blockiert und anschließend dreimal 15 Minuten mit PBS + 0,1% Tween gewaschen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte ebenfalls über Nacht bei 4°C und mit anschließendem Waschen (siehe oben). Der Erst- und Zweitantikörper wurden in der Blockierflüssigkeit gelöst. Die Inkubation des HRP-gekoppelten Zweitantikörpers erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit anschließendem Waschen (siehe oben). Zuletzt wurden die spezifischen Banden mittels SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fischer Scientific, Bonn, Deutschland) auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Die Lösungen, die das Substrat für die Peroxidase enthalten, wurden 1:1 gemischt. Die Membran wurde in einer Plastikschiene mit der Detektionslösung beschichtet. Nach drei Minuten wurde die Membran mit MilliQ-Wasser abgespült und mit der Proteinseite nach oben in eine Filmkassette gelegt. Die Entwicklung war je nach Signalstärke unterschiedlich lang (1 Sekunde bis 24 h).

Um dieselbe Membran ein zweites Mal mit anderen Antikörpern (z. B. zwecks Ladekontrolle) zu inkubieren, wurden die gebundenen Antikörper durch 20-minütiges Waschen in 0,2 M Natronlauge (NaOH) entfernt und die Membran nach erneutem Waschen wieder blockiert und wie oben beschrieben entwickelt. Sämtliche Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt ($n \geq 3$). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Versuch.

Es wurden folgende Block- und Antikörperkombinationen verwendet:

P2Y2-Rezeptor

Blocklösung: RotiBlock (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

1. *Antikörper:* P2Y2R rabbit polyclonal antibody, 1:1000

2. *Antikörper:* anti-Rabbit HRP-linked IgG antibody, 1:3000

GAPDH

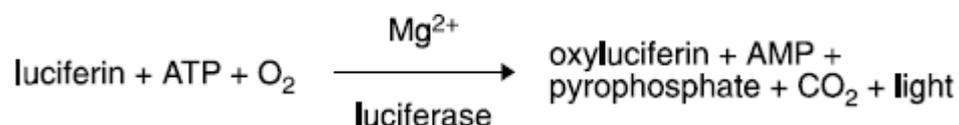
Blocklösung: RotiBlock (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

1. *Antikörper:* GAPDH mouse monoclonal antibody, 1:20.000

2. *Antikörper:* anti-mouse HRP-linked IgG antibody, 1:20.000

8.6 ATP-DETERMINATION ASSAY

Zur Bestimmung der ATP-Konzentration in Zellüberständen wurde das ATP Determination Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) benutzt. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Glühwürmchen-Luziferase zur Umsetzung ihres Substrats D-Luciferin ATP benötigt. Bei diesem Vorgang entsteht Licht mit einem Emissionsmaximum von 560 nm. Dieses kann mit einem Gerät ausgewertet werden, das Lumineszenz messen kann. Die dem Vorgang zugrunde liegende Reaktionsgleichung ist:



Die Messungen wurden nach Hersteller-Protokoll durchgeführt. Die ATP-Konzentrationen in Mikroglia-Überständen wurden nach 24 h bestimmt. 10 μ L Medium wurden abgenommen und in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden 90 μ L vorher angesetzter Reaktionslösung dazu gegeben und die Lumineszenz mit Hilfe des Tecan M200 Multimode Reader (Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen.

8.7 STATISTISCHE AUSWERTUNGEN

Unter Annahme einer Normalverteilung der erhobenen Daten wurden die statistischen Auswertungen mit Hilfe des Student's t -Test vorgenommen. Ein $p \leq 0,05$ wurde, wenn nicht anders angegeben, als signifikant angesehen. Zur Darstellung der Daten in Diagrammen wurde, wenn nicht anders angegeben, der arithmetische Mittelwert aus Doppelbestimmung und die entsprechende Standardabweichung vom Mittelwert verwendet.

8.8 MATERIAL

8.8.1 Versuchstiere

Swiss-Webster-Mäuse, E13, bezogen vom Centre d'Elevage René Janvier, Le Genest St. Isles, Frankreich

8.8.2 Wasser

Es wurde ausschließlich doppelt destilliertes Wasser (MilliQ; ddH₂O) verwendet.

8.8.3 Zellkultur

Produkt	Hersteller	Katalognummer
DMEM mit Phenolrot	LONZA, Wuppertal, Deutschland	# BE12-733F
Neurobasal A	Gibco Life Technologies, Eggenstein, Deutschland	# 12349
Leibovitz's L15-Medium	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland	# E15-020
Fetales Kälberserum (FCS)	LONZA, Wuppertal, Deutschland	# DE14-850F
	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland	# A15-101
L-Glutamin (200 mM in 0,85% NaCl)	LONZA, Wuppertal, Deutschland	# BE17-605E
Penicillin/Streptomycin 100x	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland	# P11-010
NEAA (Non-Essential Amino	LONZA, Wuppertal, Deutsch-	# BE13-114E

Acid Solution)	<i>land</i>	
DPBS w/o Ca and Mg	<i>LONZA, Wuppertal, Deutschland</i>	<i># BE17-512F</i>
B27-Supplement	<i>Gibco Life Technologies, Eggenstein, Deutschland</i>	<i># 17504-044</i>
6 Well-Platten Cell Star	<i>Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland</i>	<i># 657160</i>
12 Well-Platten Cell Star	<i>Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland</i>	<i># 665180</i>
24 Well-Platten Cell Star	<i>Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland</i>	<i># 662160</i>
Zellschaber	<i>Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland</i>	<i># 541080</i>
 8.8.4 Polyethylenimin (PEI)-Lösung:		
BORAX	<i>Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland</i>	<i># B9876</i>
Polyethylenimin 50% w/v	<i>Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland</i>	<i># P-3143</i>
 8.8.5 Aβ-Ansatz		
A β 1-40	<i>PSL, Heidelberg, Deutschland</i>	<i>n. v.</i>
A β 1-42	<i>PSL, Heidelberg, Deutschland</i>	<i>n. v.</i>
Low binding Eppendorf Röh-	<i>Eppendorf, Hamburg,</i>	<i># 0030 120.094</i>

chen 2mL	<i>Deutschland</i>	
Hexafluor-2-Propanol	<i>Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland</i>	# 52512
Magnetührstäbchen	<i>VWR, Darmstadt, Deutsch- land</i>	# 58948-976

8.8.6 Zytotoxizitätsassays

Thiazolyl blue Tetrazolium Bromide Pulver	<i>Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland</i>	# M5655
Dimethylsulfoxid zur Synthese	<i>AppliChem, Darmstadt, Deutschland</i>	# A2765,1000
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	<i>Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland</i>	# 11644793001
96-Well-Platten	<i>Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland</i>	# 82.1581

8.8.7 CNI-1493

CNI-1493 (Molekulargewicht 748,9 g/mol) wurden von Prof. Dr. Yousef Al-Abed (Laboratory of Medicinal Chemistry, The Feinstein Institute for Medical Research, Manhasset, NY 11030) synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Dimethylsulfoxid für die Zell- kultur	<i>AppliChem, Darmstadt, Deutschland</i>	# A3672,0050
--	--	--------------

8.8.8 Zytokin-ELISA

TNF- α DuoSet ELISA Develop- ment System	<i>R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland</i>	# DY410
IL-6 DuoSet ELISA Develop- ment System	<i>R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland</i>	# DY406

IL-1 β DuoSet ELISA Development System	<i>R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland</i>	# DY401
IL-10 DuoSet ELISA Development System	<i>R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland</i>	# DY417
IWAKI-ELISA Plate	<i>IWAKI (Tokio, Japan)</i>	# 3802-696
Reagent Diluent Concentrate 2 (10x)	<i>R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland</i>	# 841380
SuperBlock® Blocking Buffer in TBS	<i>Thermo Fischer Scientific, Bonn, Deutschland</i>	# 37535
TMB soluble	<i>Calbiochem, Darmstadt, Deutschland</i>	# 613544

8.8.9 Western blot

10x Trisgepufferte Salzlösung (TBS):

- 24,2 g Tris (*Roth, Karlsruhe, Deutschland, # AE15.2*)
- 80 g NaCl (*Sigma Aldrich Taufkirchen, Deutschland, # 31434*)
- In 1 L Wasser gelöst
- pH mit HCl (*Roth, Karlsruhe, Deutschland, # 4625.2*) auf 7,6 eingestellt

TBS-Tween:

1x TBS mit 0,1% Tween 20 (*AppliChem, Darmstadt, Deutschland, # A4974,1000*)

TBS-T + Bovines Serumalbumin (BSA):

TBS-T mit 5% BSA (*Probumin, Millipore, Schwalbach, Deutschland, #82-045-1*)

Erstantikörper:

Anti-P2Y2 Antikörper	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>	# ab46537
Anti-GAPDH Antikörper (NB615)	<i>Novus biologicals, Littleton, USA</i>	#NB300-285SS

Zweitantikörper:

Anti Rabbit IgG HRP-linked Antibody	<i>Cell signaling, Frankfurt am Main, Deutschland</i>	# 7074
Anti Mouse IgG HRP-linked Antibody	<i>Thermo Fischer Scientific, Bonn, Deutschland</i>	# 31430

Puffer und sonstiges:

PhosStop Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	<i>Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland</i>	# 04906845001
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (EDTA-free)	<i>Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland</i>	# 11873580001
NuPAGE Novex 4-12% BisTrisGel 1mm 10 well	<i>Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland</i>	# NP0321BOX
NuPAGE Novex 4-12% BisTrisGel 1mm 12 well	<i>Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland</i>	# NP0322BOX
NuPAGE SDS Sample Buffer (4x)	<i>Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland</i>	# NP0007
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x)	<i>Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland</i>	# NP0002
SEE Blue Plus 2 Prestained	<i>Invitrogen, Karlsruhe,</i>	# LC5925

Standard (1x)	<i>Deutschland</i>	
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	<i>Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland</i>	<i># NP0006-01</i>
Protran BA83 Nitrocellulose Transfer Membrane Pore Size 0,2 µm	<i>Whatman, Dassel, Deutschland</i>	<i># 10 401 396</i>
MemCode Reversible Protein Stain Kit for nitrocellulose membrane	<i>Thermo Fischer Scientific, Bonn, Deutschland</i>	<i># 24580</i>
Rotiblock	<i>Roth, Karsruhe, Deutschland</i>	<i># A151.2</i>
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	<i>Thermo Fischer Scientific, Bonn, Deutschland</i>	<i># 34076</i>
CL-Xposure Film Clear blue X- Ray Film	<i>Thermo Fischer Scientific, Bonn, Deutschland</i>	<i># 34089</i>
M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent	<i>Thermo Fischer Scientific, Bonn, Deutschland</i>	<i># 78501</i>

8.8.10 RIPA Puffer (Radio Immuno Precipitation Assay Puffer)

150 mM NaCl (*Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, # S3014*)

1% NP-40 (*Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, # 74385*)

0,5% Na-Deoxycholat (*Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, # D6750*)

0,1% SDS (Na-Dodecylsulfat) (*Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland,
L3771*)

50 mM Tris, pH 8,0 (*Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, # 38731*)

8.8.11 ATP Determination Assay

ATP Determination Kit	<i>Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland</i>	# A22066
Schwarze 96-Well-Platten	<i>Greiner bio-one, Frickenhau- sen, Deutschland</i>	# 655090

8.8.12 Geräteliste

CO ₂ -Inkubator CB210	<i>Binder, Tuttlingen, Deutschland</i>	
Eclipse80i Durchlichtmikro- skop	<i>Nikon, Langen, Deutschland</i>	
Laborwaage PCB	<i>Kern, Balingen-Frommern, Deutschland</i>	
Magnetrührer Hei-Tec	<i>VWR, Darmstadt, Deutschland</i>	
Mikrozentrifuge 5415D	<i>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</i>	
pH-Meter MP 220	<i>Mettler Toledo, Gießen, Deutschland</i>	
PowerPac Universal Power Supply	<i>Bio-Rad Laboratories, Richmond CA, USA</i>	
Präzisionswaage BE BK	<i>Satorius, Göttingen, Deutschland</i>	
Tecan M200 Multimode Reader	<i>Tecan, Crailsheim, Deutschland</i>	
Vakuumzentrifuge Speed Vac RC 1010	<i>UVP, Upland CA, USA</i>	
pH-Meter MP 220	<i>Mettler Toledo, Gießen, Deutschland</i>	
PowerPac Universal Power Supply	<i>Bio-Rad Laboratories, Richmond CA, USA</i>	

9 ERGEBNISSE

9.1 UNTERSUCHUNG DER AMYLOID-BETA-TOXIZITÄT AN PRIMÄREN ZELLKULTURMODELLEN

9.1.1 *A β 1-40 bewirkte einen konzentrationsabhängigen Zelluntergang von primärer Mikroglia*

48-stündige Behandlung mit 1 μ M A β 1-40 reduzierte die Stoffwechselaktivität (mittels MTT-Test ermittelt) primärer Mikroglia auf 52,0% (\pm 2,3%) verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Dieser Wert blieb auch bei höheren Konzentrationen weitgehend konstant mit 50,1% (\pm 1,6%) bei 5 μ M und 46,9% (\pm 0,5%) bei 10 μ M A β (Abb. 13 A). Gleichzeitig fand sich kein entsprechender Anstieg der LDH-Aktivität im Zellüberstand, was eine Störung der Membranintegrität bedeuten würde. Erst in der höchsten Konzentration von 10 μ M A β 1-40 stieg die LDH-Aktivität auf etwa 21,4% (\pm 8,5%) gegenüber einer mit Triton X-100 behandelten Positivkontrolle an (Abb. 13 B).

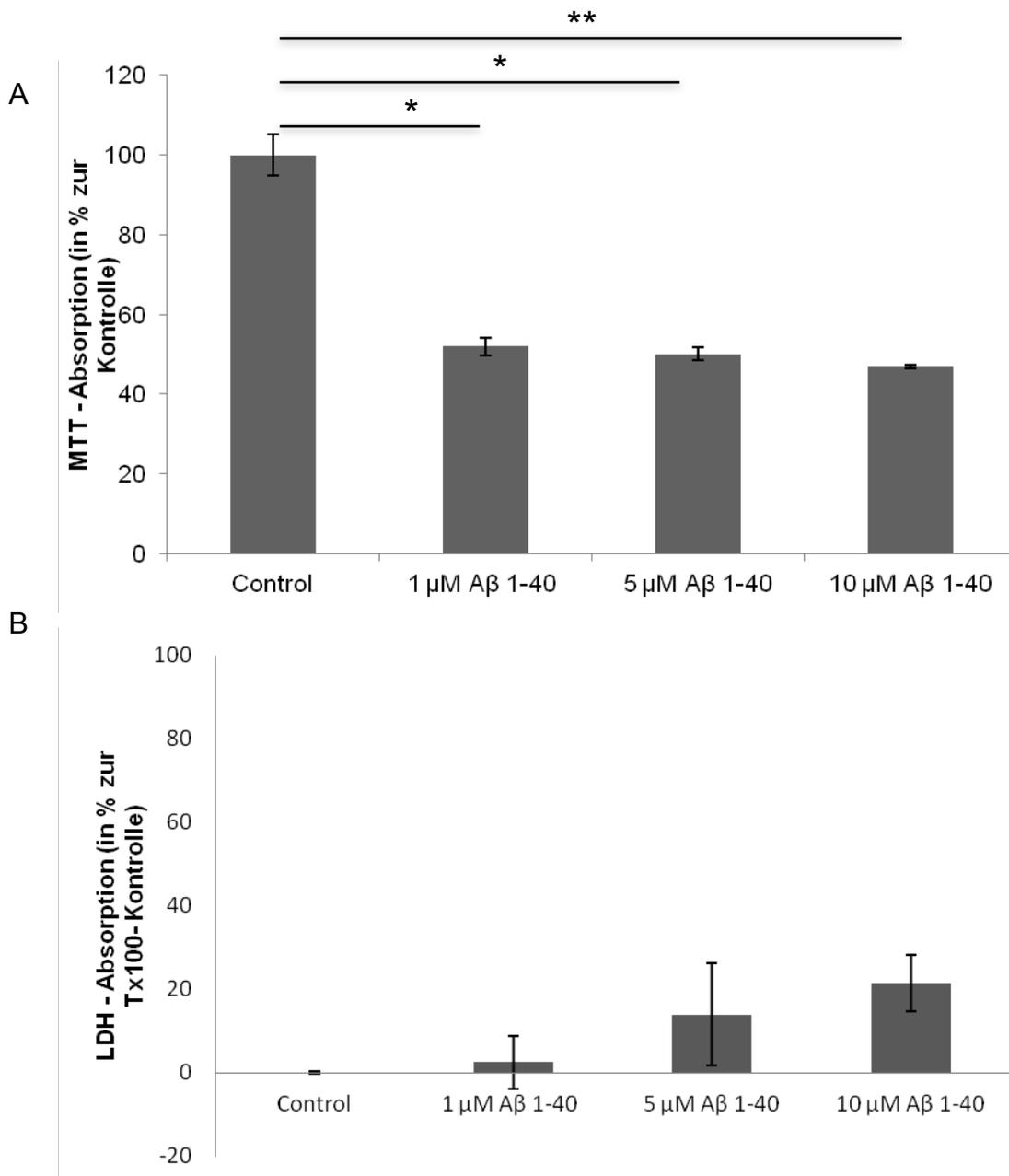


Abb. 13 MTT- und LDH-Assay von primärer Mikroglia mit A β 1-40. Nach 48-stündiger Behandlung von Mikroglia mit 1-10 μ M A β 1-40 wurde das Zellüberleben mittels (A) MTT-Assay und (B) LDH-Assay ausgewertet. Dargestellt ist die prozentuale Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch (n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

9.1.2 A β 1-42 führte wie A β 1-40 zu einem konzentrationsabhängigen Untergang primärer Mikroglia

Die Toxizität von A β 1-42 auf primäre Mikroglia ergab einen konzentrationsabhängigen Verlauf der Zytotoxizität. Das Zellüberleben sank dabei auf 67,6% (\pm 1,1%) bei 1 μ M sowie 53,1% (\pm 0,9%) bzw. 47,2% (\pm 0,3%) bei 5 bzw. 10 μ M A β 1-42 (Abb. 14 A). Im Gegensatz zu A β 1-40 ergab sich selbst bei Konzentrationen von 10 μ M kein Anstieg der LDH-Aktivität im Zellüberstand (Abb. 14 B).

Die Lösungsmittel-Kontrolle hatte keinen Einfluss auf das Überleben der Mikroglia-Zellen. Weder eine Abnahme des MTT-Signals (Abb. 15 A) noch eine Zunahme der LDH-Aktivität (Abb. 15 B) war festzustellen. Das Ergebnis bestätigte, dass der zytotoxische Alkohol HFIP, der vor der Inkubationszeit von 24 bzw. 48 Stunden als Lösungsmittel für A β dient, vollständig evaporiert war und somit keine Auswirkungen auf die A β -vermittelte Toxizität ausübte.

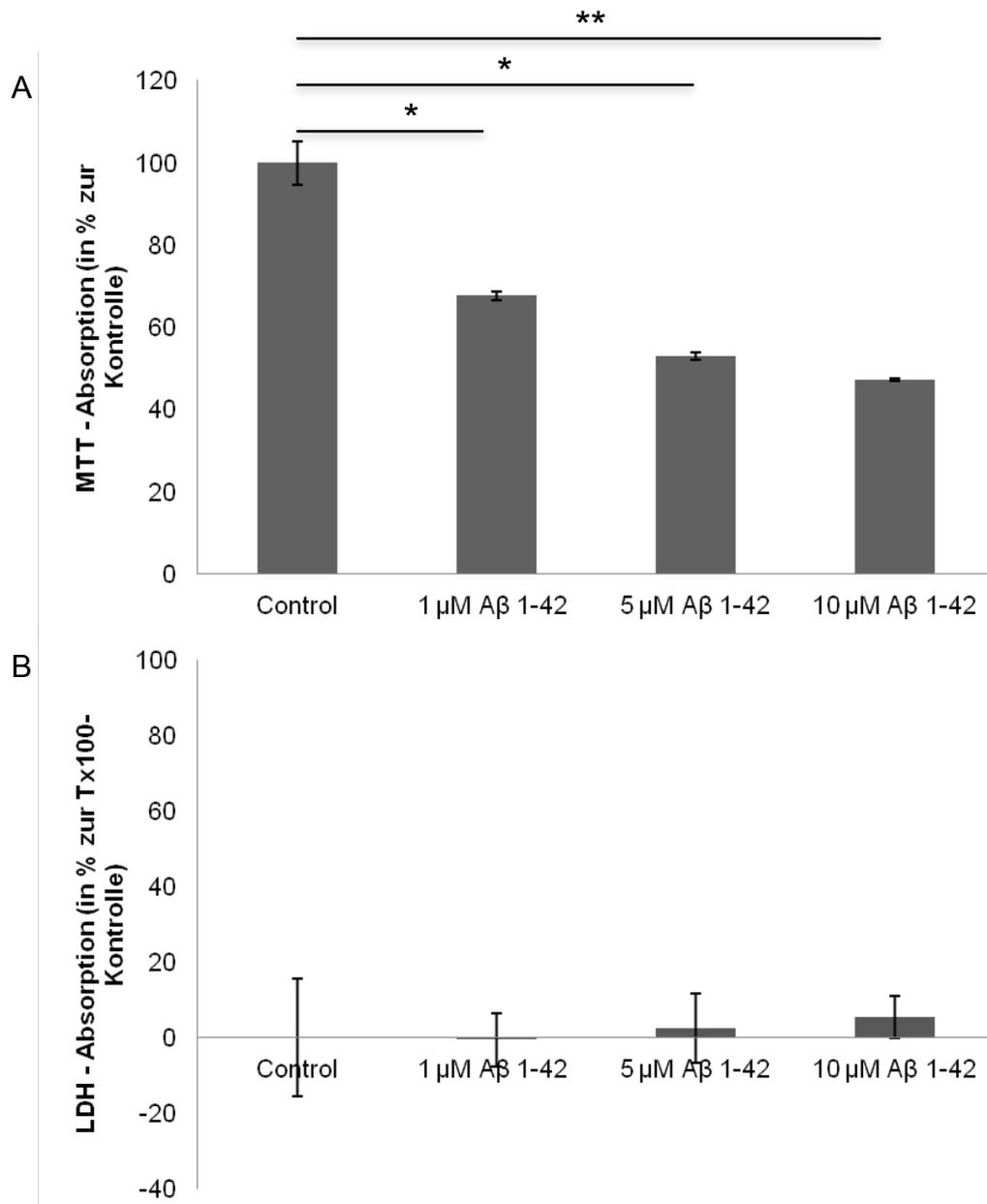


Abb. 14 MTT- und LDH-Assay von primärer Mikroglia mit A β 1-42. Einer 48-stündigen Behandlung von Mikroglia mit 1-10 μ M A β 1-42 folgte die Auswertung des Zellüberlebens mittels (A) MTT-Assay und (B) LDH-Assay. Dargestellt ist die prozentuale Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch (n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

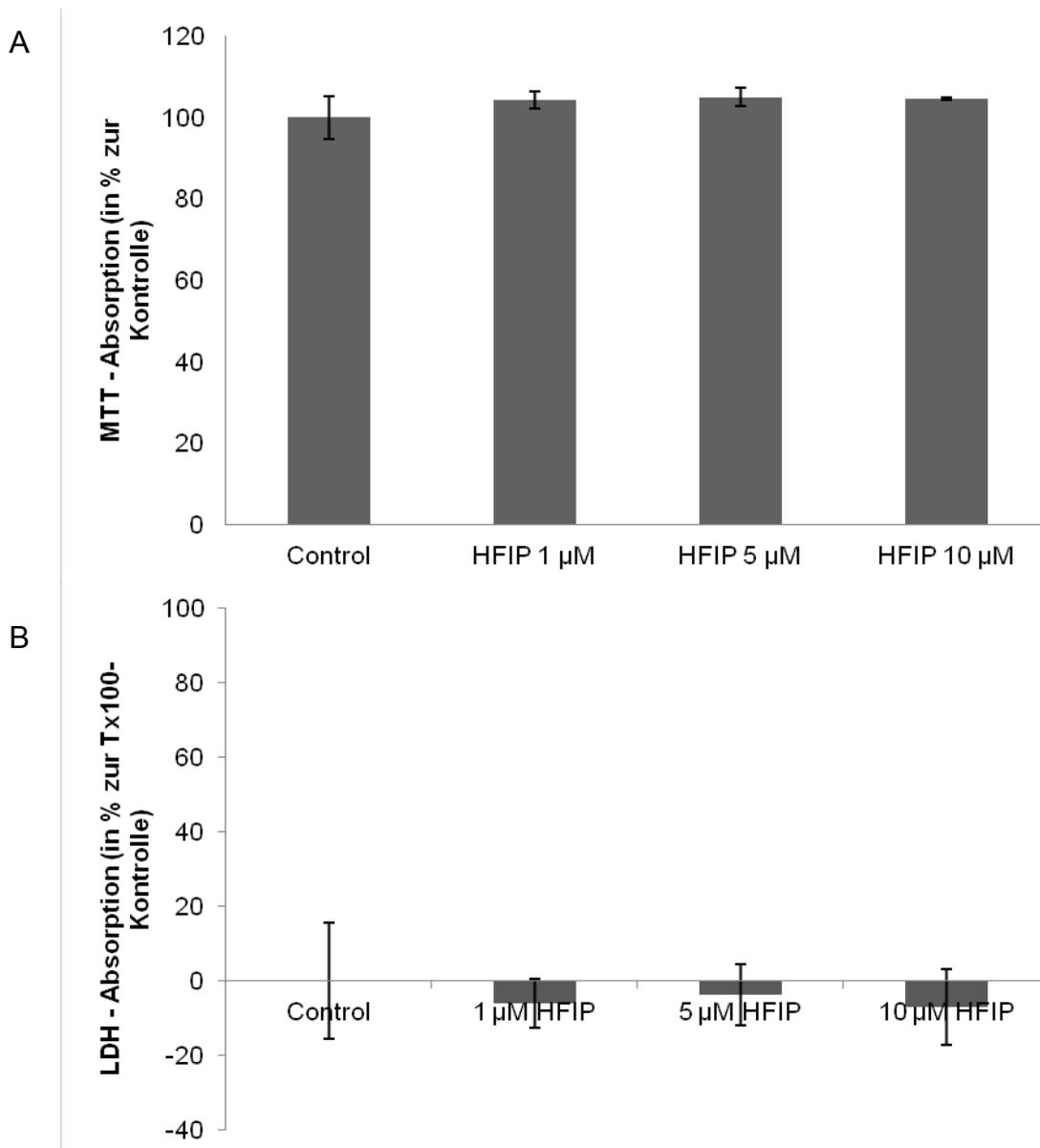


Abb. 15 MTT- und LDH-Assay von primärer Mikroglia – Lösungsmittelkontrolle. Einer 48-stündigen Behandlung von Mikroglia mit 1 bis 10 µM des Lösungsmittels, das kein A β enthielt, folgte eine Auswertung des Zellüberlebens mittels (A) MTT-Assay und (B) LDH-Assay. Dargestellt ist die prozentuale Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch (n=3).

9.1.3 A β 1-40 führte konzentrationsabhängig zum Zelluntergang in primären neuronalen Mischkulturen

Die Toxizität von A β wurde in einem Bereich von 1-10 μ M getestet. A β 1-40 reduzierte das Zellüberleben primärer neuronaler Mischkulturen konzentrationsabhängig – bei 1 μ M A β sank das MTT-Signal (Abb. 16 A) auf 57,6% (\pm 2,0%) und nahm bei 10 μ M bis auf 41,9% (\pm 1,0%) ab. Um wiederum die Frage zu beantworten, ob Zellnekrose vorliegt, wurde ein LDH-Assay (Abb. 16 B) durchgeführt. Dieser zeigte negative Werte, die jedoch nicht statistisch signifikant von den Kontrollwerten abwichen.

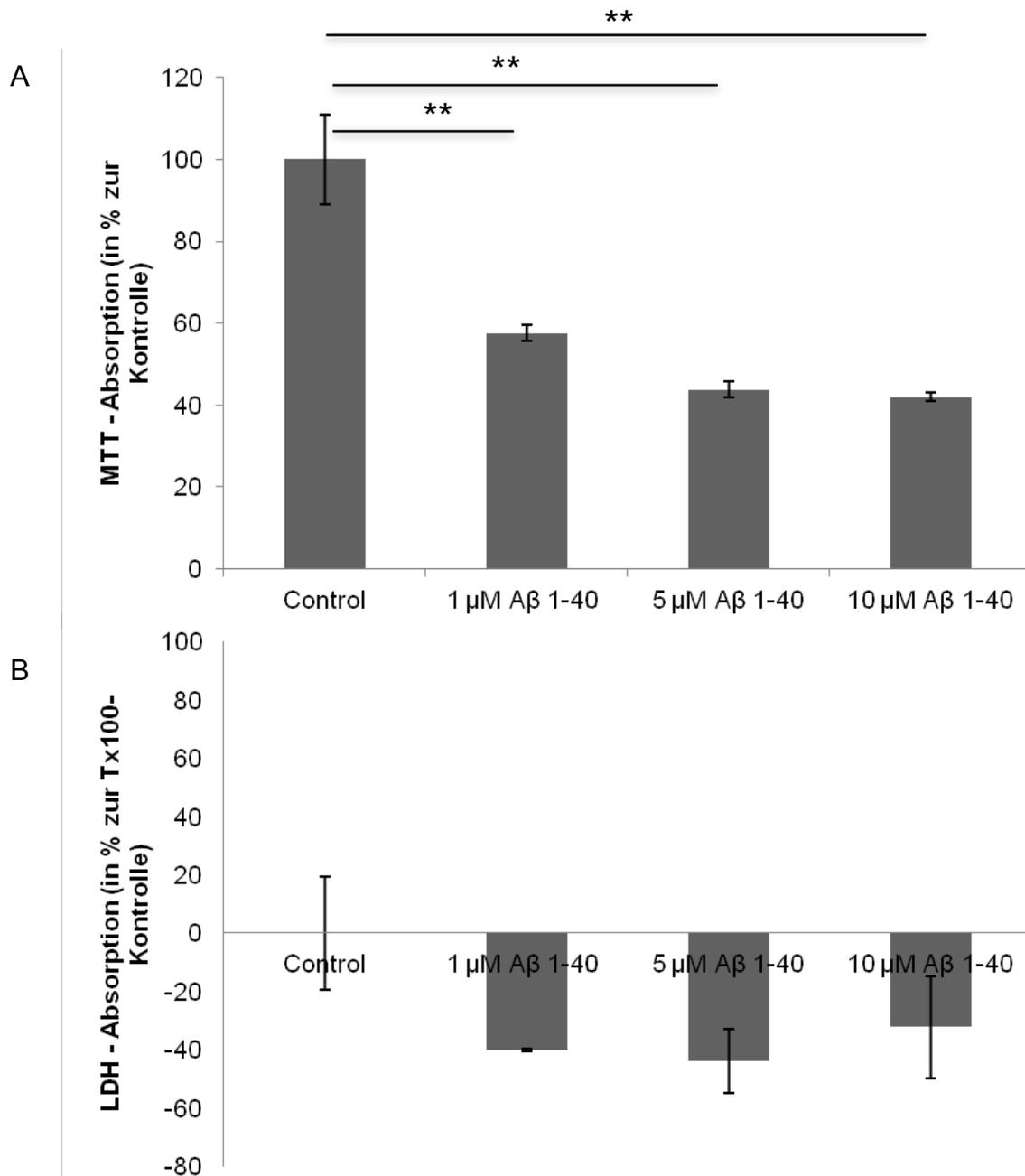


Abb. 16 MTT- und LDH-Assay von primären neuronalen Mischkulturen mit A β 1-40.

Einer 48-stündigen Behandlung von primären neuronalen Mischkulturen mit 1 bis 10 μ M A β 1-40 folgte eine Auswertung des Zellüberlebens mittels (A) MTT-Assay und (B) LDH-Assay. Dargestellt ist die prozentuale Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch (n=3). ** p< 0,01

9.1.4 A β 1-42 wirkte zytotoxisch auf primäre neuronale Mischkulturen

Die Behandlung mit A β 1-42 führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des MTT-Signals auf 79,8% (\pm 5,3%) bei 1 μ M bis 60,4% (\pm 5,1%) bei 10 μ M A β 1-42 verglichen zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 17 A). Auch im Falle von A β 1-42 wurde keine Zunahme der LDH-Aktivität beobachtet (Abb. 17 B). Somit wurde auch hier eine durch A β bewirkte Toxizität beobachtet ohne gleichzeitige Beeinträchtigung der Integrität der Zellmembran.

Das A β -Lösungsmittel beeinflusste das Zellüberleben nicht signifikant und hatte somit keinen additiven Effekt auf die oben beschriebene A β -vermittelte Zytotoxizität (Abb. 18). Das Lösungsmittel bestand dabei wie schon bei den Versuchen an primärer Mikroglia aus 30% HFIP in doppelt destilliertem Wasser. HFIP ist während der Inkubationszeit vollständig evaporiert. Die fehlende Toxizität der Lösungsmittelkontrolle verdeutlichte abschließend, dass alle in diesem Abschnitt gemessenen Toxizitäten auf A β -vermittelten Effekten beruhten.

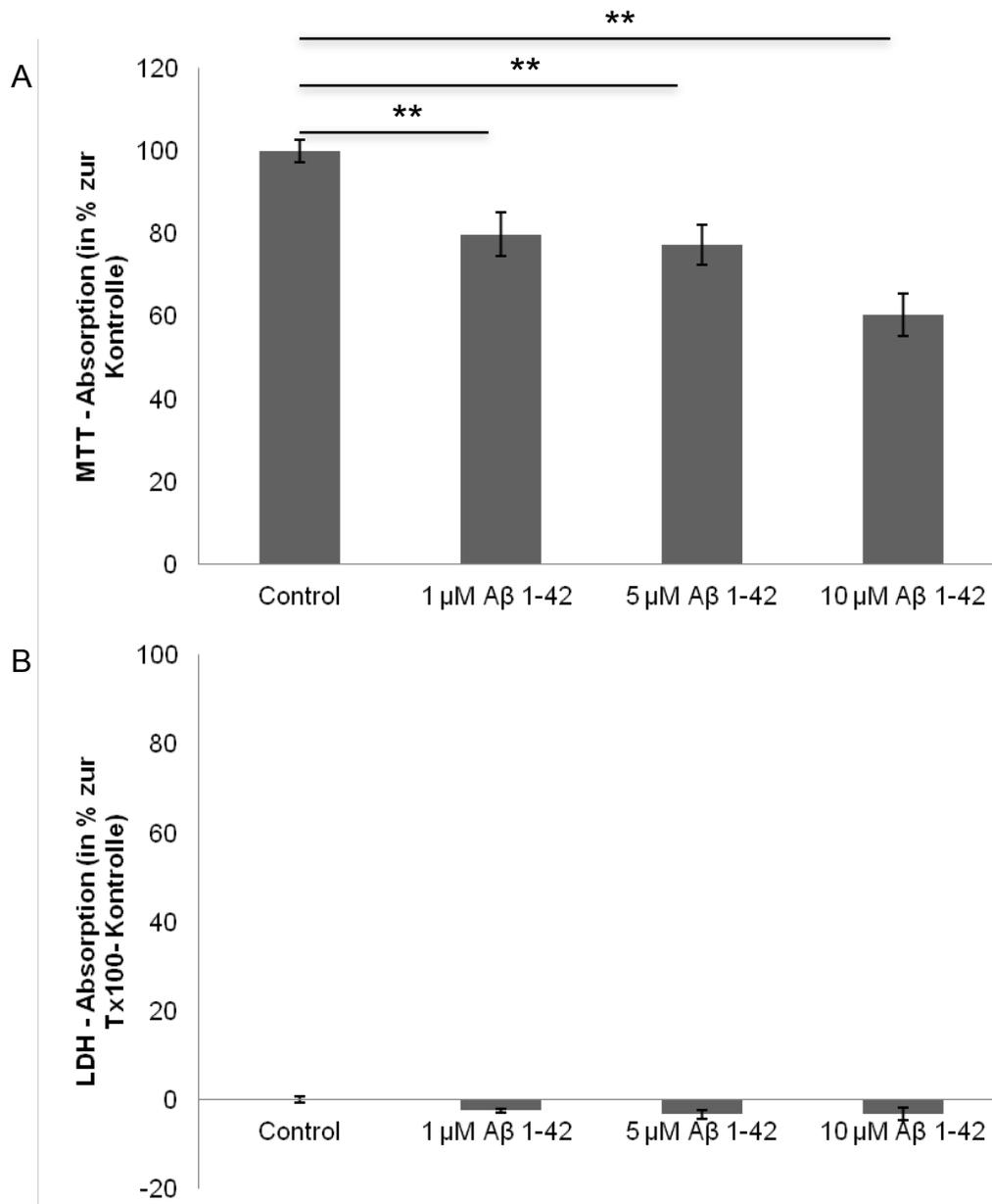


Abb. 17 MTT- und LDH-Assay von primären neuronalen Mischkulturen mit Aβ1-42. Einer 48-stündigen Behandlung von primären neuronalen Mischkulturen mit 1 bis 10 μM Aβ1-42 folgte eine Auswertung des Zellüberlebens mittels (A) MTT-Assay und (B) LDH-Assay. Dargestellt ist die prozentuale Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch (n=3). ** p < 0,01

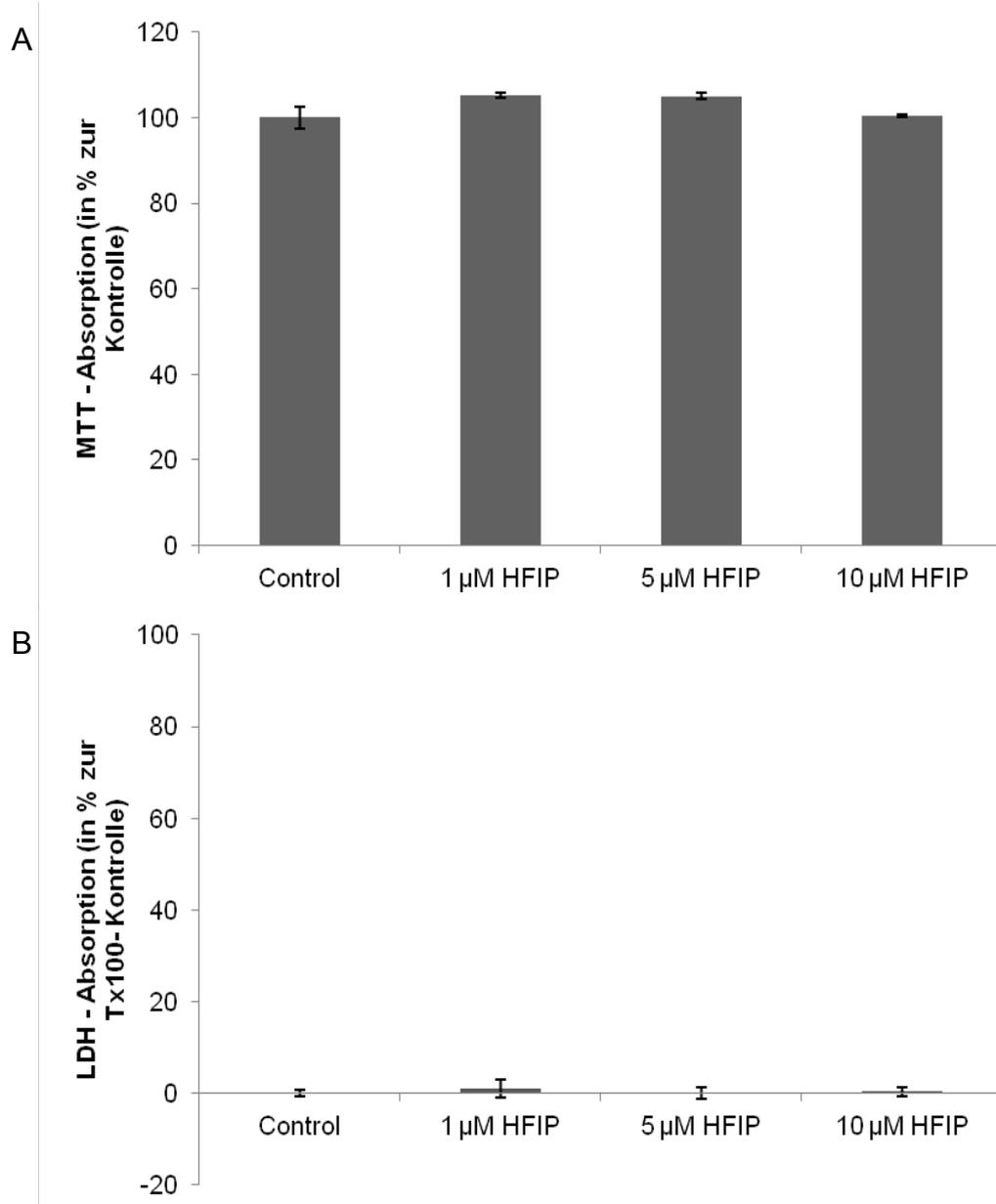


Abb. 18 MTT- und LDH-Assay von primären neuronalen Mischkulturen mit Lösungsmittelkontrolle. Einer 48-stündigen Behandlung von primären neuronalen Mischkulturen mit 1-10 µM einer 30%igen HFIP-Lösung folgte eine Auswertung des Zellüberlebens mittels (A) MTT-Assay und (B) LDH-Assay. Dargestellt ist die prozentuale Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch (n=3).

9.2 BESTIMMUNG VON KONZENTRATIONSEFFEKTEN VON CNI-1493 AUF DAS ÜBERLEBEN PRIMÄRER ZELLEN

9.2.1 *CNI-1493 hatte unter 2,5 µM keine zytotoxischen Konzentrations-effekte bei primärer Mikroglia und neuronalen Mischkulturen*

CNI-1493 führte bei Mikroglia-Kulturen ab einer Konzentration von 5 µM zu einer Signal-Abnahme im MTT-Assay auf 83,3% ($\pm 0,1\%$) (Abb. 19 A). Das entsprach einer Reduktion der Stoffwechselaktivität der gemessenen Zellkultur und damit einer zellulären Schädigung, die auf einen konzentrationsabhängigen Effekt von CNI-1493 zurückzuführen war. Bei 2,5 µM zeigte CNI-1493 keine wesentliche Eigentoxizität. Daher wurde für die folgenden Versuche mit primärer Mikroglia eine CNI-1493 Konzentration von 2,5 µM festgelegt. Die Lösungsmittelkontrolle aus doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) und DMSO (Verhältnis 20:1) hatte im untersuchten Bereich keine Eigentoxizität (Abb. 19 B). Somit ist bei den später beschriebenen Effekten nicht von Lösungsmittel-bedingten Artefakten auszugehen.

Bei neuronalen Mischkulturen wurde im untersuchten Konzentrationsbereich zwischen 1 und 10 µM CNI-1493 keine signifikante Abnahme des MTT-Signals beobachtet (Abb. 20 A). Desweiteren hatte auch hier die Lösungsmittelkontrolle keinen zytotoxischen Effekt (Abb. 20 B).

Zur Vermeidung von Artefakten durch konzentrationsbedingte toxische Effekte von CNI-1493 wurde bei den nachfolgenden Versuchen eine einheitliche Konzentration von CNI-1493 bei 2,5 µM festgelegt. Diese wurde durchgehend für Mikroglia- sowie neuronale Mischkulturen beibehalten.

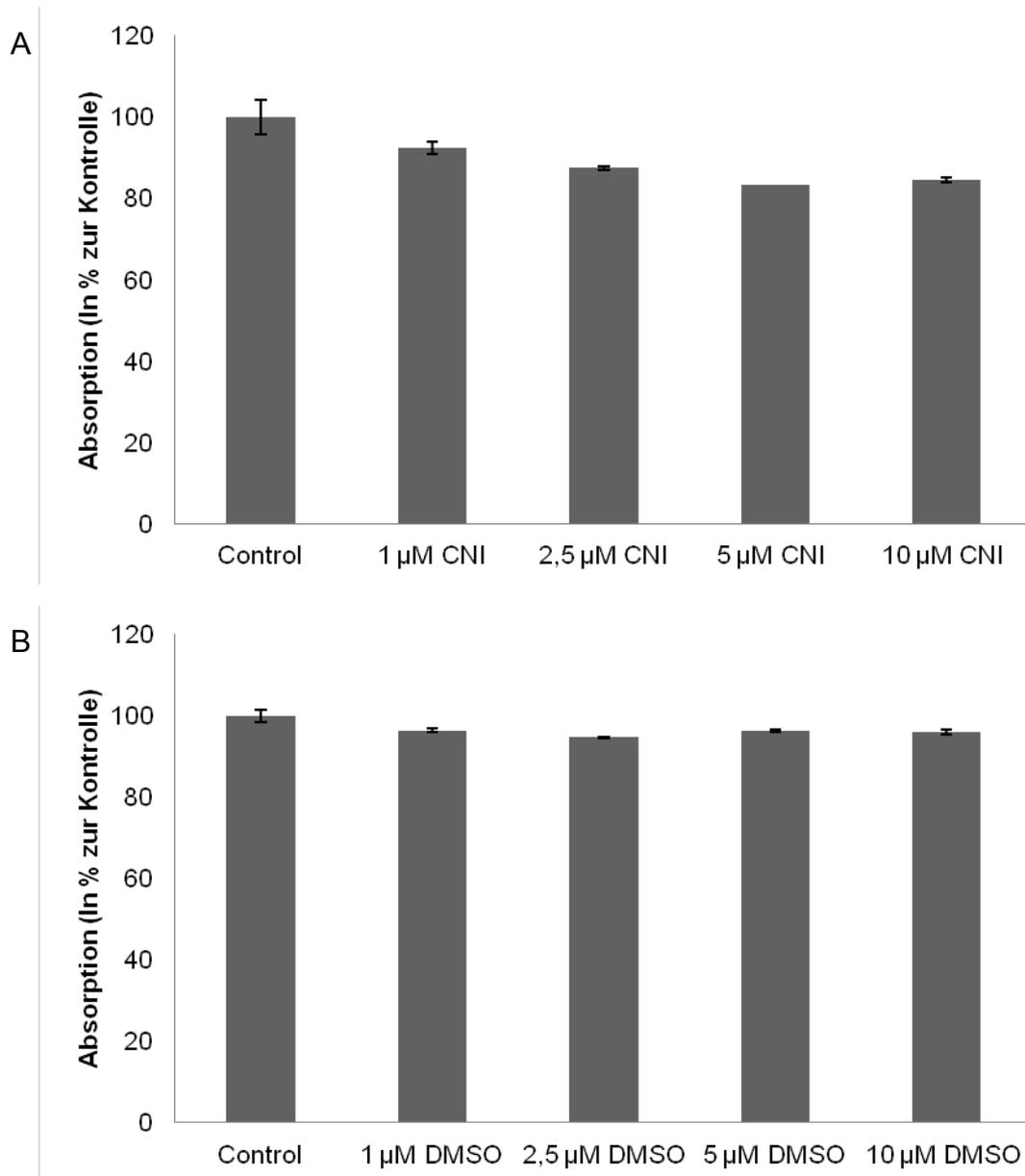


Abb.19 MTT-Assay von primärer Mikroglia mit CNI-1493 und Lösungsmittelkontrolle.

Primäre Mikroglia wurde 48 h mit 1-10 µM (A) CNI-1493 und (B) entsprechenden Konzentrationen der Lösungsmittelkontrolle (5% DMSO in MilliQ) behandelt. Das Zellüberleben wurde mittels MTT-Assay ausgewertet. Dargestellt ist die prozentuale Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch (n=3).

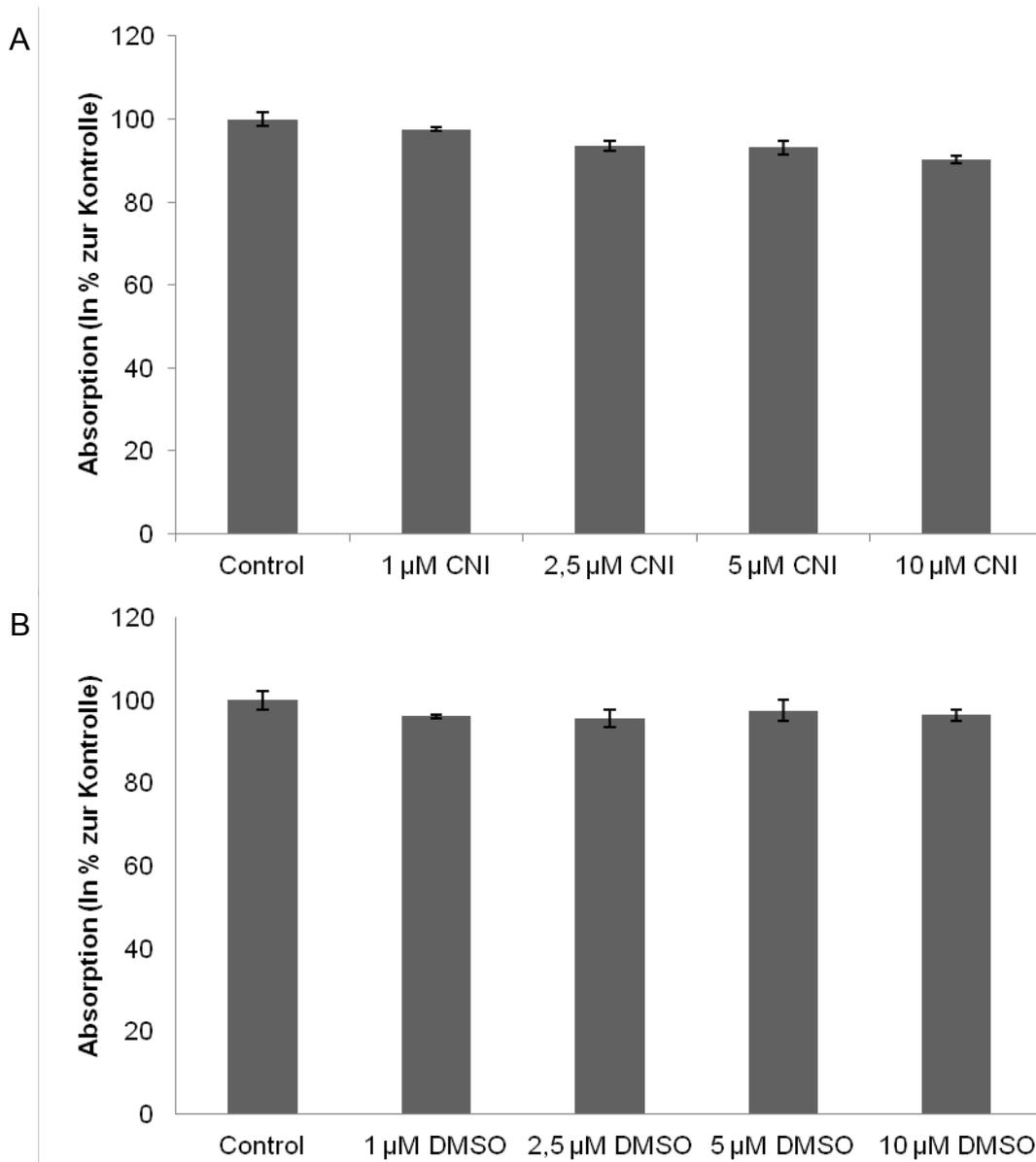


Abb. 20 MTT-Assay von primären neuronalen Mischkulturen mit CNI-1493 und Lösungsmittelkontrolle. Nach 48-stündiger Behandlung neuronaler Mischkulturen mit 1 bis 10 µM (A) CNI-1493 und (B) entsprechenden Konzentrationen der Lösungsmittelkontrolle (5% DMSO in MilliQ) wurde das Zellüberleben mittels MTT-Assay ausgewertet. Dargestellt ist die prozentuale Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch (n=3).

9.2.2 *Behandlung von Mikroglia mit CNI-1493 reduzierte die toxische Wirkung von A β*

Die Präinkubation primärer muriner Mikroglia mit CNI-1493 führte zur Reduktion der anschließenden A β -vermittelten Toxizität. Im einzelnen stieg das MTT-Signal bei der Behandlung mit A β 1-40 von 66,1% (\pm 2,5%) mit A β 1-40 allein auf 70,7% (\pm 0,6%) nach Präinkubation mit CNI-1493 (Abb. 21 A). Dieser Anstieg war allerdings nicht statistisch signifikant.

Behandlung mit A β 1-42 reduzierte das MTT-Signal von 100% (\pm 2,0%) bei der unbehandelten Kontrolle auf 68,4% (\pm 0,7%). Nach Vorbehandlung mit CNI-1493 stieg dieser Wert wiederum auf 83,78% (\pm 1,0%) der unbehandelten Kontrolle (Abb. 21 B). Dieser Anstieg des Zellüberlebens war statistisch signifikant.

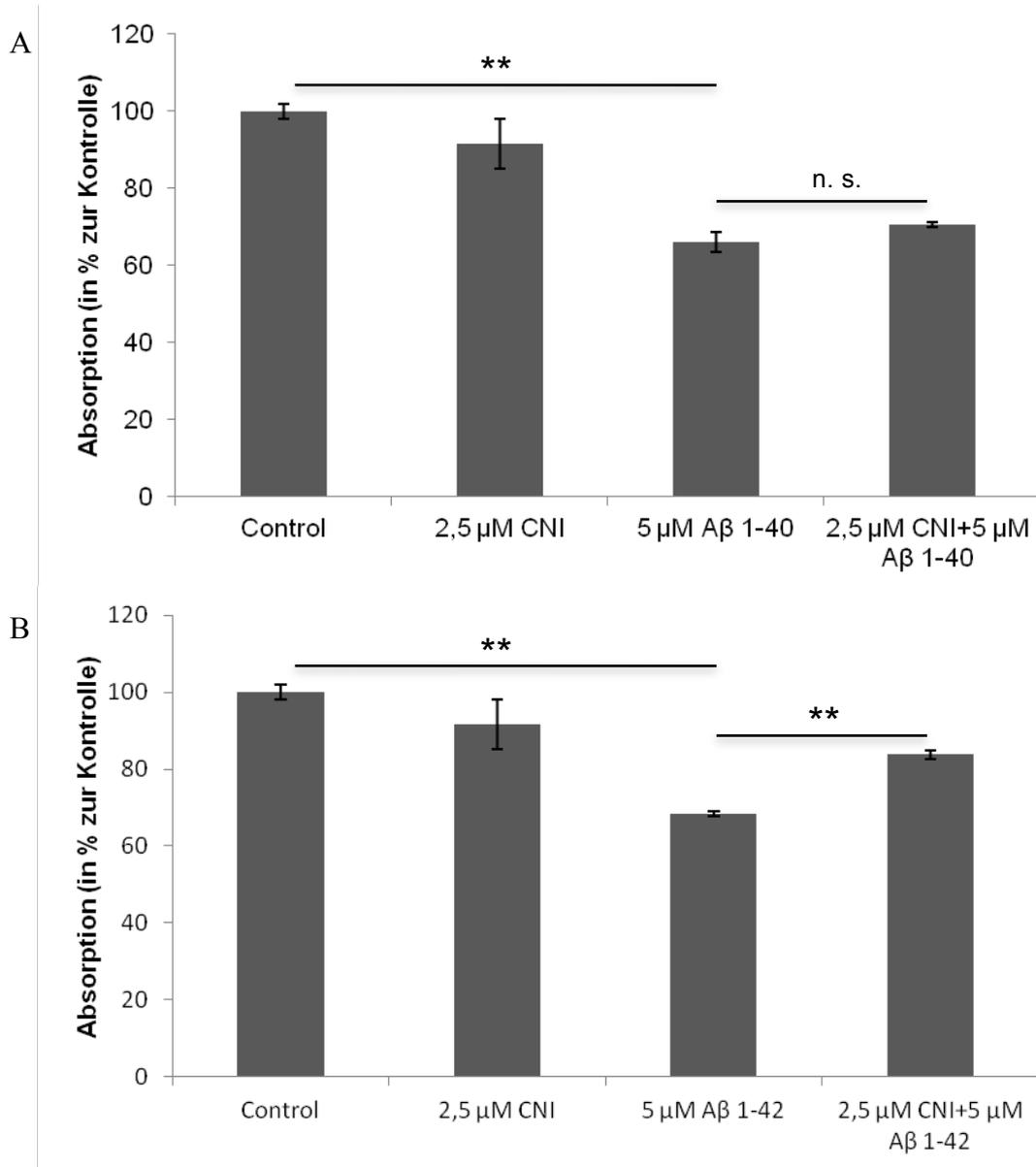


Abb. 21 MTT-Assay – Präinkubation von primärer Mikroglia mit CNI-1493 und anschließende Behandlung mit Aβ1-40 und Aβ1-42. Primäre Mikroglia wurden zunächst für 24 h mit CNI-1493 vorbehandelt. Nach Ablauf dieser Zeit folgte die Behandlung mit (A) Aβ1-40 und (B) Aβ1-42 für weitere 24 h. Die Auswertung des Zellüberlebens erfolgte mittels MTT-Assay. Dargestellt ist die prozentuale Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch (n=3). ** p < 0,01; n. s. – nicht signifikant

9.2.3 Behandlung primärer neuronaler Mischkulturen mit CNI-1493 reduzierte die toxische A β -Wirkung

Präinkubation primärer neuronaler Mischkulturen mit CNI-1493 führte zu einem erhöhten Zellüberleben nach 24-stündiger Behandlung mit A β . Dabei stieg das MTT-Signal in Anwesenheit von A β 1-40 von 49,3% (\pm 7,8%) auf 76,7% (\pm 5,3%) nach vorausgehender Inkubation mit CNI-1493 (Abb. 22 A).

24-stündige Behandlung mit A β 1-42 reduzierte das Zellüberleben von 100% bei unbehandelten Zellen auf 66,2% (\pm 0,1%). Eine Präinkubation mit CNI-1493 erhöhte wiederum das MTT-Signal auf 80,4% (\pm 0,6%) (Abb. 22 B).

9.2.4 Zusammenfassung

Die Behandlung von primärer Mikroglia und primären neuronalen Mischkulturen mit A β 1-40 und A β 1-42 hatten einen konzentrationsabhängigen zytotoxischen Effekt. Dieser war nach einer Präinkubation mit CNI-1493 weniger stark ausgeprägt.

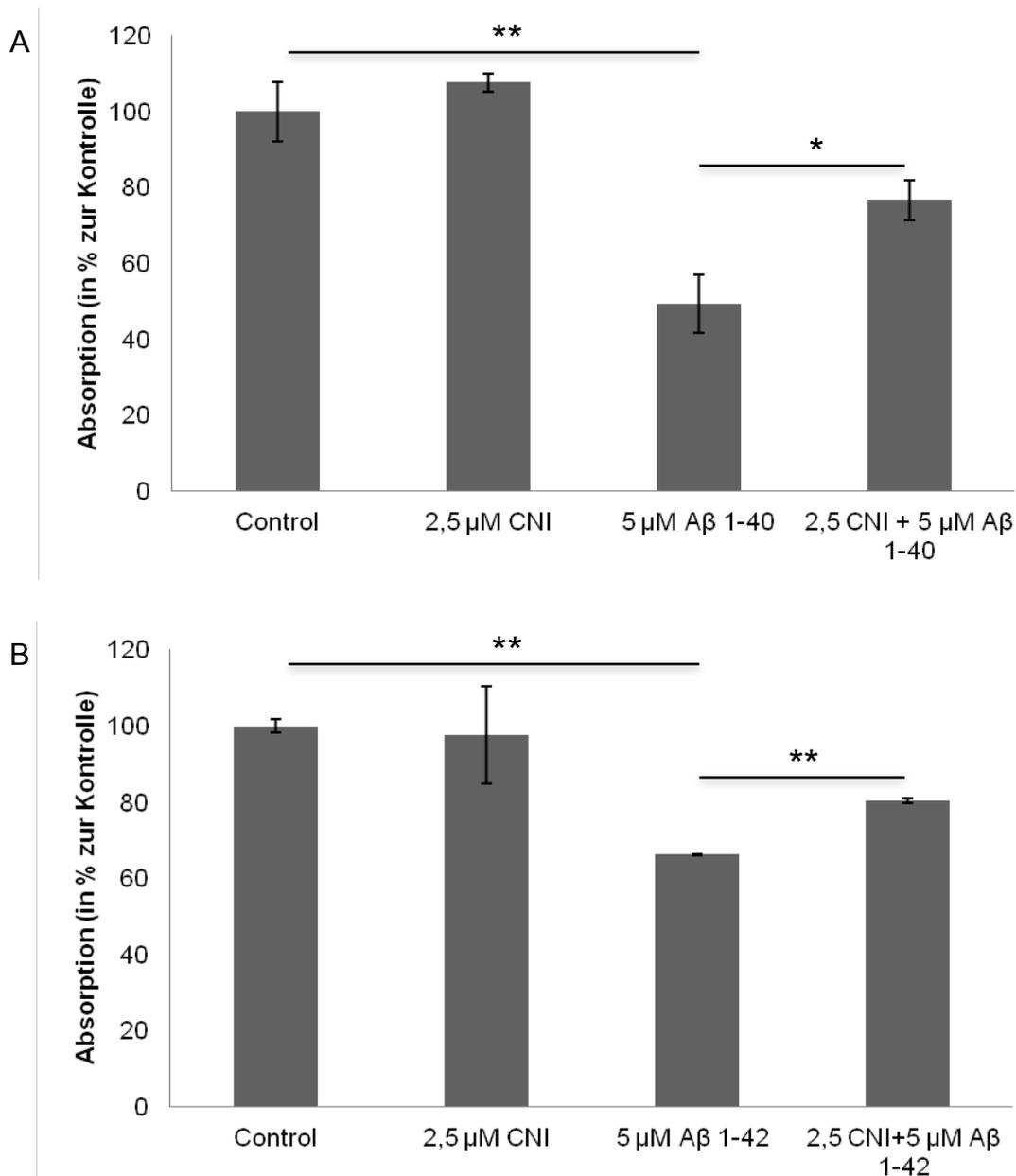


Abb. 22 MTT-Assay – Vorbehandlung von primären Neuronen mit CNI-1493 mit anschließender Gabe von Aβ1-40 und Aβ1-42. Primäre Neurone wurden für 24 h mit CNI-1493 vorbehandelt. Es folgte die Behandlung mit (A) Aβ1-40 und (B) Aβ1-42 für weitere 24 h. Die Auswertung des Zellüberlebens erfolgte mittels MTT-Assay. Dargestellt ist die prozentuale Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch (n=3). * p< 0,05; ** p<0,01

9.3 ZYTOKINPROFILE PRIMÄRER MURINER MIKROGLIA UNTER DER BEHANDLUNG MIT CNI-1493 UND AMYLOID BETA

9.3.1 CNI-1493 unterdrückte die A β -assoziierte erhöhte TNF α -Ausschüttung

Um die Effekte von CNI-1493 auf die TNF α -Ausschüttung zu untersuchen, wurden Mikroglia mit und ohne 24-stündige CNI-1493-Präinkubation mit A β behandelt. Nach Ablauf von 24 h wurden Zellmediumüberstände abgenommen. Die TNF α -Spiegel wurden anschließend mittels ELISA gemessen.

10 μ M A β 1-40 führten zur Ausschüttung von TNF α (Abb. 23 A). Ausgehend von einer TNF α -Konzentration von 118,4 pg/ml (\pm 0,1 pg/ml) bei der unbehandelten Kontrolle nahm diese auf 160,2 pg/ml (\pm 6,1 pg/ml) zu. Nach Präinkubation mit CNI-1493 blieb die extrazelluläre Konzentration von TNF α mit 121,4 pg/ml (\pm 4,2 pg/ml) auf dem Niveau der Kontrolle.

Behandlung mit 10 μ M A β 1-42 führte zu einer Erhöhung des TNF α -Spiegels auf 204,5 pg/ml (\pm 0,9 pg/ml) gegenüber 118,4 pg/ml (\pm 0,1 pg/ml) bei der Kontrolle (Abb. 23 B). Demgegenüber blieb die TNF α -Konzentration nach 24-stündiger Präinkubation mit CNI-1493 und anschließender A β -Behandlung bei 130,2 pg/ml (\pm 2,9 pg/ml) und somit nicht signifikant höher als die Kontrolle.

24-stündige Behandlung mit A β 1-40 bzw. A β 1-42 erhöhte die extrazelluläre TNF α -Konzentration auf 160,2 pg/ml (\pm 6,1 pg/ml) bzw. 204,5 pg/ml (\pm 0,9 pg/ml) gegenüber 118,4 pg/ml (\pm 0,1 pg/ml) bei unbehandelten Zellen. Somit blieb ein A β -assoziierter Anstieg des proinflammatorischen Zytokins nach Vorbehandlung der Mikroglia mit CNI-1493 aus.

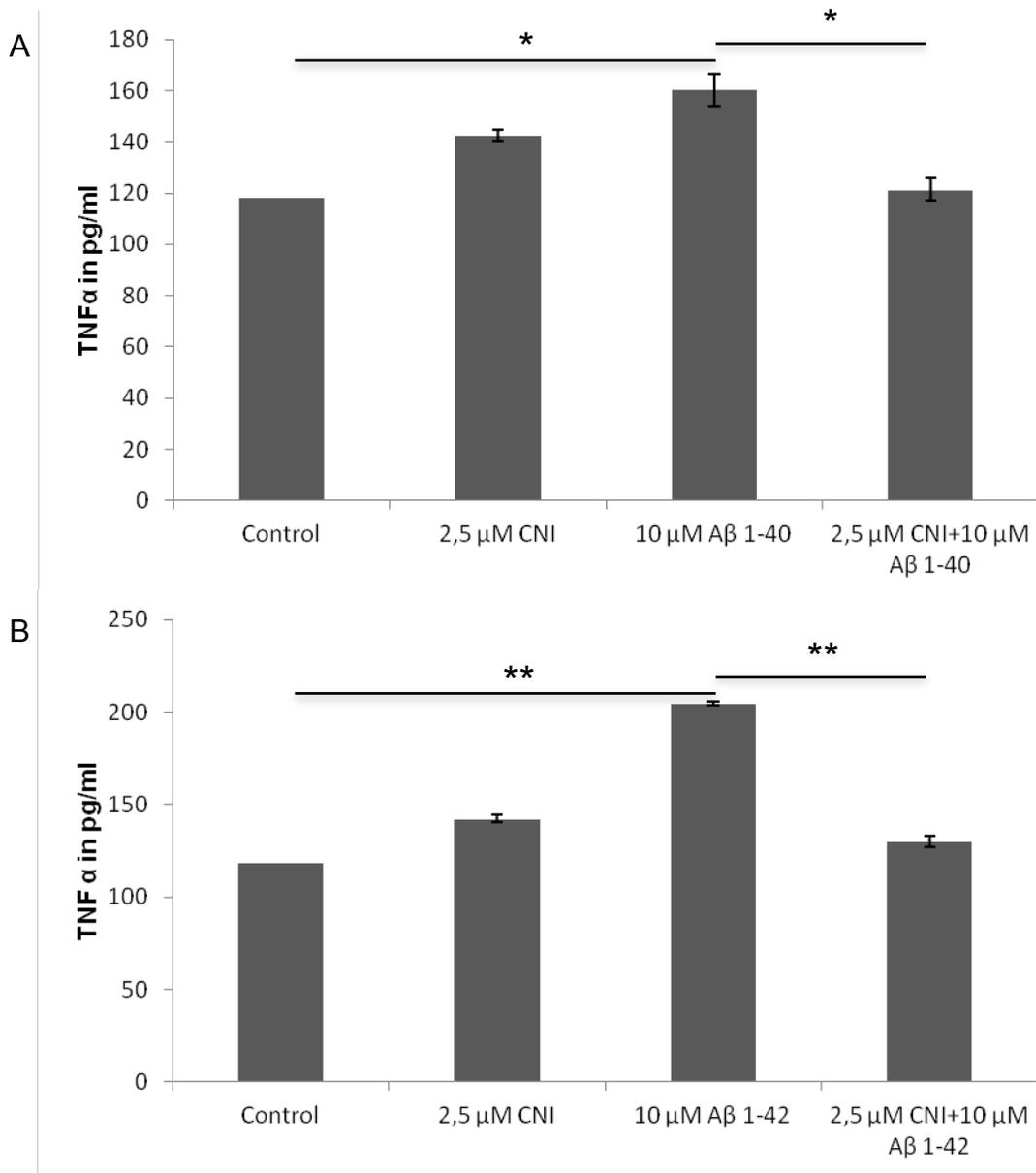


Abb. 23 TNFα-ELISA – Präinkubation von primärer Mikroglia mit CNI-1493 und anschließende Behandlung mit Aβ1-40 und Aβ1-42. Einer 24-stündigen Vorbehandlung primärer Mikroglia mit CNI-1493 schloss sich eine 24-stündige Behandlung mit (A) Aβ1-40 und (B) Aβ1-42 an. Zellüberstände wurden abgenommen und mittels ELISA auf TNFα untersucht. Dargestellt sind die Konzentrationen von TNFα in den jeweiligen Zellüberständen als Mittelwert mit Standardabweichung. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch (n=3). * p< 0,05; ** p< 0,01

9.3.2 CNI-1493 hemmte die A β -induzierte IL-6-Ausschüttung

Extrazelluläres IL-6 wurde im Überstand primärer Mikroglia gemessen. Einer 24-stündigen Präinkubation von Mikroglia mit CNI-1493 folgte die Behandlung mit A β 1-40 bzw. A β 1-42 für weitere 24 h. Die Messung der IL-6-Konzentrationen erfolgte mittels ELISA.

Die Behandlung primärer Mikroglia mit A β 1-40 führte zu einer Erhöhung der IL-6 Ausschüttung von 42,5 pg/ml (\pm 1,6 pg/ml) auf 66,2 pg/ml (\pm 1,0 pg/ml) (Abb. 24 A). Nach Präinkubation mit CNI-1493 und anschließender Behandlung mit A β 1-40 lag die extrazelluläre IL-6 Konzentration bei 39,9 pg/ml (\pm 4,2 pg/ml) und damit auf dem Niveau der unbehandelten Kontrolle (Abb. 24 A).

A β 1-42 führte ebenfalls zu einer signifikant erhöhten IL-6 Ausschüttung von 74,0 pg/ml (\pm 3,1 pg/ml) gegenüber 42,5 pg/ml (\pm 1,6 pg/ml) bei der Kontrolle. Im Anschluss an die Präinkubation mit CNI-1493 löste die Behandlung mit A β 1-42 keine Erhöhung von IL-6 aus. Die IL-6 Konzentration verblieb bei 39,8 pg/ml (\pm 3,3 pg/ml) und somit auf Höhe der Kontrolle.

Wie auch im Falle von TNF α war CNI-1493 in der Lage, die A β -induzierte Erhöhung von extrazellulären IL-6 Spiegeln zu unterdrücken. Nach Vorbehandlung mit CNI-1493 verblieb die Ausschüttung von IL-6 trotz Behandlung mit A β auf Kontrollniveau, während sie sich ohne Vorbehandlung auf 66,2 pg/ml (\pm 1,0 pg/ml) mit A β 1-40 (Abb. 24 A) und 74,0 pg/ml (\pm 3,1 pg/ml) mit A β 1-42 beinahe verdoppelte (Abb. 24 B).

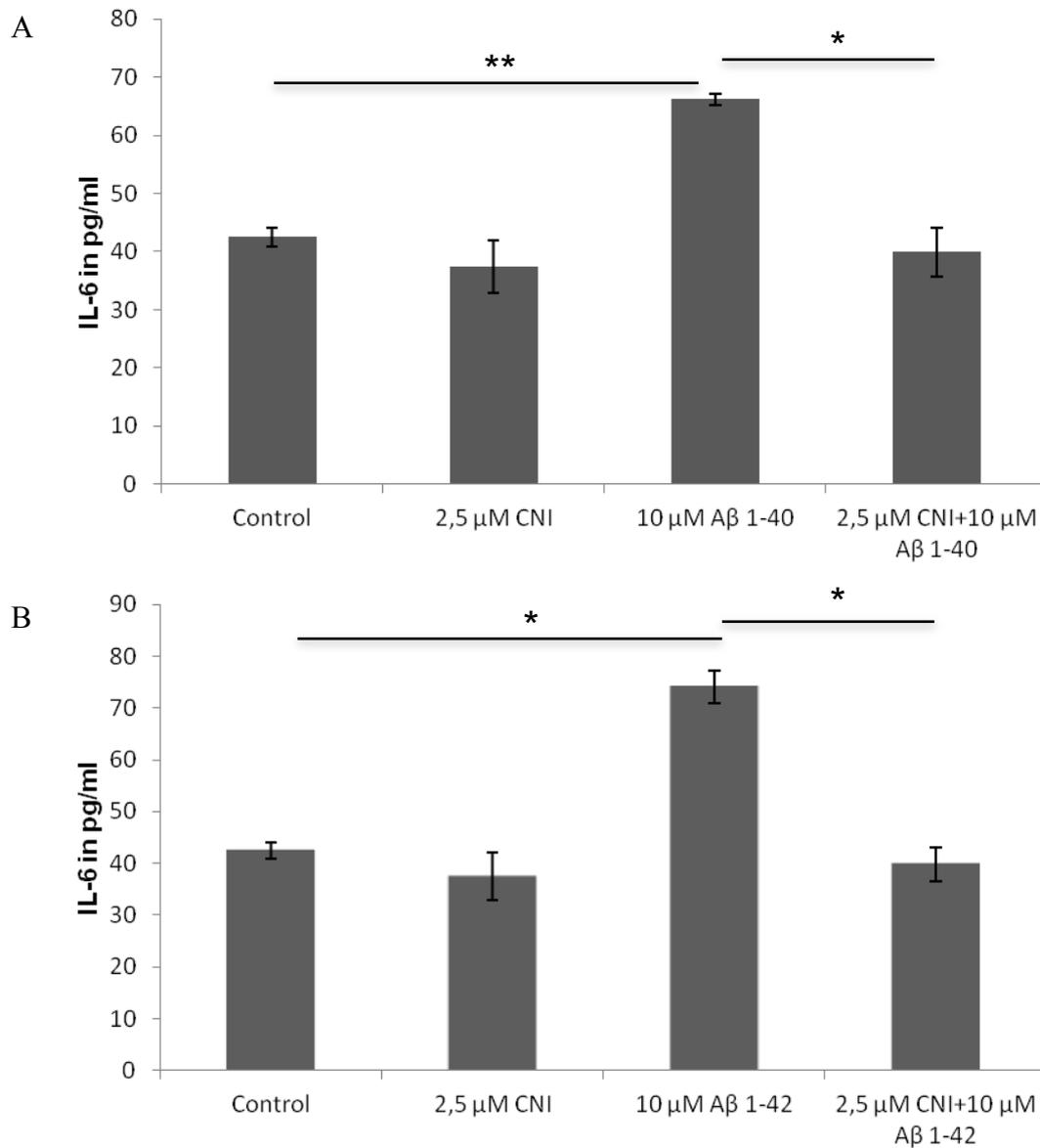


Abb. 24 IL-6-ELISA – Präinkubation von primärer Mikroglia mit CNI-1493 mit anschließender Behandlung mit Aβ1-40 und Aβ1-42. Einer 24h-stündigen Vorbehandlung primärer Mikroglia mit CNI-1493 schloss sich eine 24-stündige Behandlung mit (A) Aβ1-40 und (B) Aβ1-42 an. Zellüberstände wurden abgenommen und mittels ELISA auf IL-6 untersucht. Dargestellt sind die Konzentrationen von IL-6 in den jeweiligen Zellüberständen als Mittelwert mit Standardabweichung. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch (n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

9.3.3 CNI-1493 erhöhte die IL-1 β Ausschüttung von A β -behandelten Mikroglia

24-stündige Behandlung mit A β 1-40 hatte keinen Einfluss auf die Ausschüttung von IL-1 β . Präinkubation mit CNI-1493 erhöhte diese leicht, jedoch nicht signifikant (Abb. 25 A).

A β 1-42 hingegen erhöhte die extrazelluläre IL-1 β Konzentration auf 9,6 pg/ml (\pm 0,5 pg/ml) gegenüber 7,2 pg/ml (\pm 0,02 pg/ml) bei der unbehandelten Kontrolle (Abb. 25 B). Präinkubation mit CNI-1493 und nachfolgende Behandlung mit A β 1-42 erhöhte die Ausschüttung von IL-1 β zusätzlich auf 11,5 pg/ml (\pm 0,1 pg/ml). Dies war statistisch signifikant höher als die IL-1 β Ausschüttung der unbehandelten Kontrolle. CNI-1493 allein hatte indessen keinen Einfluss auf die mikrogläre IL-1 β Sekretion.

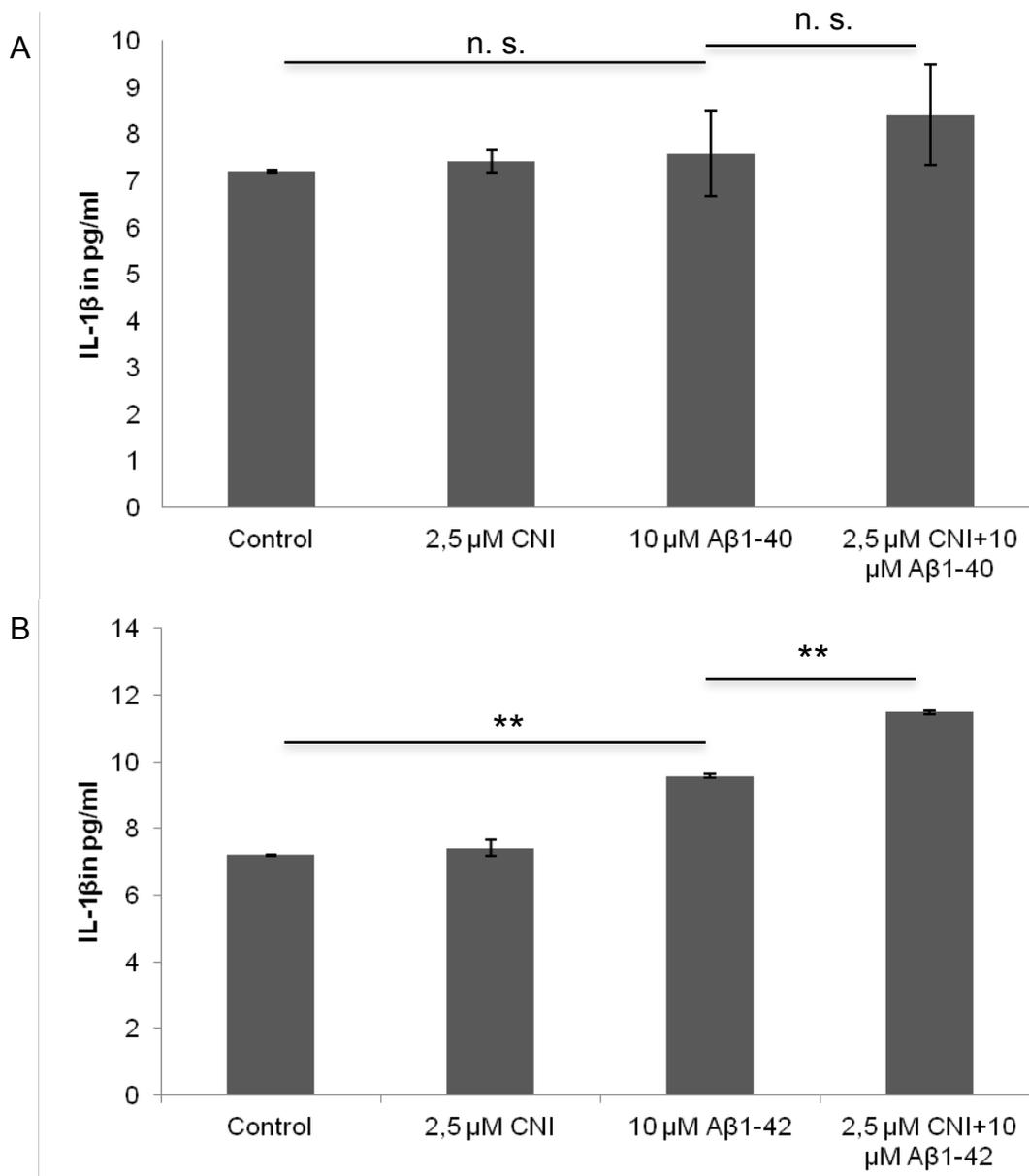


Abb. 25 IL-1 β -ELISA – Präinkubation von primärer Mikroglia mit CNI-1493 mit anschließender Behandlung mit A β 1-40 und A β 1-42. Nach 24h-stündiger Vorbehandlung primärer Mikroglia mit CNI-1493 erfolgte eine 24-stündige Behandlung mit (A) A β 1-40 und (B) A β 1-42. Zellüberstände wurden abgenommen und mittels ELISA auf IL-1 β untersucht. Dargestellt sind die Konzentrationen von IL-1 β in den jeweiligen Zellüberständen als Mittelwert mit Standardabweichung. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch (n=3). ** p< 0,01; n. s. – nicht signifikant

9.3.4 CNI-1493 und A β hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Ausschüttung von IL-10

Die Messung der Effekte von A β und CNI-1493 auf die IL-10-Synthese erfolgte auf gleiche Weise wie bei den oben genannten Zytokinen: Eine 24-stündige Präinkubation von Mikroglia mit CNI-1493 ging einer 24-stündigen Behandlung mit A β voraus. Nach Ablauf der A β -Behandlung wurden die Zellüberstände mittels ELISA auf IL-10 untersucht.

Eine 24-stündige Behandlung primärer Mikroglia mit A β 1-40 ließ die IL-10 Konzentration auf 20,3 pg/ml (\pm 1,5 pg/ml) ansteigen (Abb. 26 A). 24-stündige Präinkubation mit CNI-1493 senkte die IL-10 Konzentration auf 15,7 pg/ml (\pm 5,0 pg/ml). Beide Werte unterschieden sich nicht statistisch signifikant von dem Wert der unbehandelten Kontrolle von 17,4 pg/ml (\pm 1,8 pg/ml).

24-stündige Behandlung mit A β 1-42 senkte die IL-10 Konzentration auf 8,9 pg/ml (\pm 1,3 pg/ml) (Abb. 26 B). 24-stündige Präinkubation der Mikroglia mit CNI-1493 erhöhte diesen Wert leicht auf 11,2 pg/ml (\pm 2,6 pg/ml). Diese Werte wichen ebenfalls nicht statistisch signifikant von der Kontrolle (23,7 pg/ml \pm 5,6 pg/ml) ab.

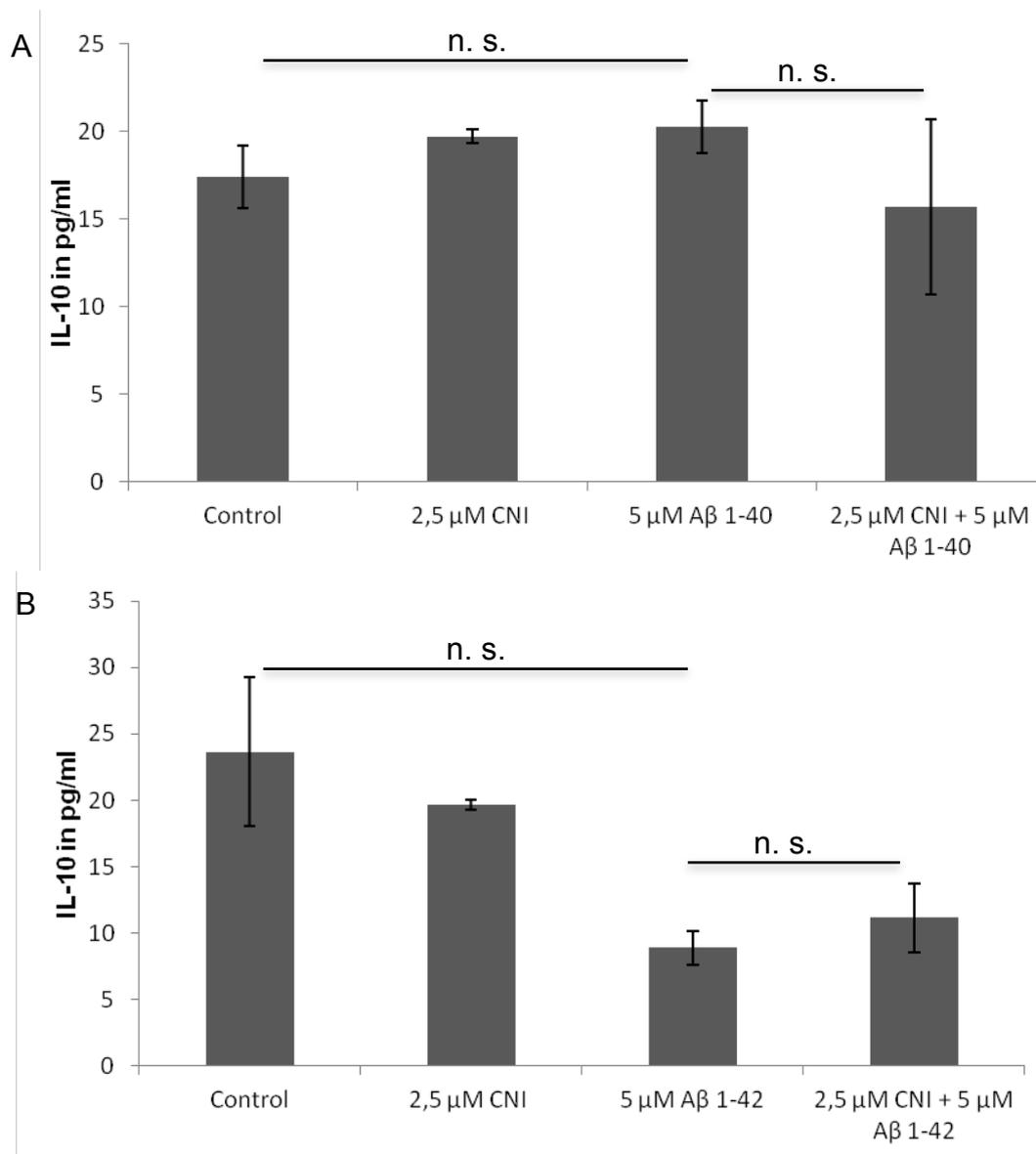


Abb. 26 IL-10-ELISA – Präinkubation von primärer Mikroglia mit CNI-1493 und anschließende Behandlung mit Aβ1-40 und Aβ1-42. Nach 24h-stündiger Vorbehandlung primärer Mikroglia mit CNI-1493 erfolgte eine 24-stündige Behandlung mit (A) Aβ1-40 und (B) Aβ1-42. Zellüberstände wurden abgenommen und mittels ELISA auf IL-10 untersucht. Dargestellt sind die Konzentrationen von IL-10 in den jeweiligen Zellüberständen als Mittelwert mit Standardabweichung. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch (n=3). n. s. – nicht signifikant

9.3.5 Einfluss von CNI-1493 und A β auf die Expression des purinergen P2Y2-Rezeptors

9.3.5.1 A β 1-42 reduzierte die Expression des P2Y2R auf primären Neuronen, CNI-1493 antagonisierte diesen Effekt

Um die Effekte von CNI-1493 und A β auf die Expression von P2Y2R zu untersuchen, wurde bei der Behandlung der neuronalen Mischkulturen das gleiche Behandlungsschema gewählt wie vorher bei der Messung der mikroglären Zytokinausschüttung. Primäre neuronale Mischkulturen wurden 24 Stunden mit CNI-1493 präinkubiert und weitere 24 Stunden mit A β 1-40 und 1-42 behandelt. Nach Ablauf der Zeit folgten eine Proteinextraktion und Western Blot-Analyse.

Dieses Behandlungsschema sollte die Gliazellen in der neuronalen Mischkultur veranlassen, vermehrt IL-1 β zu bilden, welches dann auf neuronalen Zellen in der Mischkultur wirken konnte. Mittels Western Blot wurde dann untersucht, ob es entsprechend Kong et al. zu erhöhter Expression des neuronalen P2Y2R auf neuronalen Zellen in der Mischkultur kommt (siehe Abb. 28).

Es ergab sich eine erniedrigte Expression des P2Y2R in Anwesenheit von A β 1-42 und eine erhöhte, wenn Zellen erst mit CNI-1493 und dann mit A β 1-42 behandelt wurden. CNI-1493 allein zeigte keinen Effekt auf die Expression des Rezeptors.

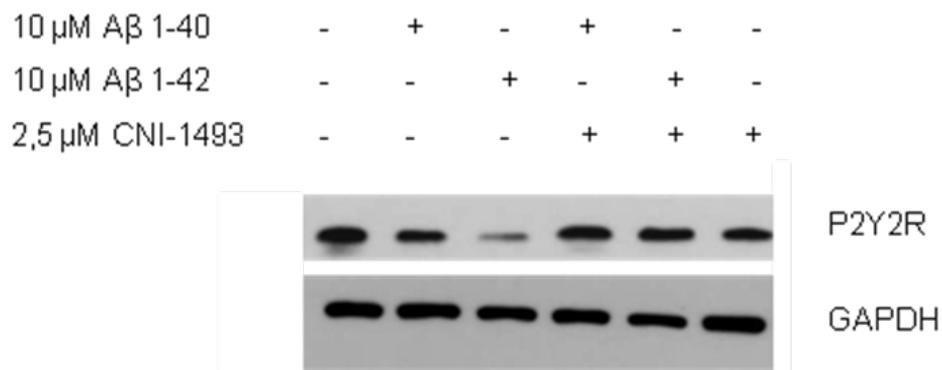


Abb. 28 Western Blot – Expression des P2Y2R bei CNI-1493 behandelten primären Neuronen. Nach 24h-stündiger Präinkubation primärer Neurone mit CNI-1493 folgte eine 24-stündige Behandlung mit A β 1-40 und 1-42. Nach Ablauf der Behandlung wurden die Zellen mit Hilfe des RIPA-Puffers lysiert. 10 μ g Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Anschließend erfolgte die Darstellung gewünschter Proteine mittels polyklonalem P2Y2R-Antikörper mit einem Anti-rabbit Antikörper als Zweitantikörper. Zur Erstellung der Ladekontrolle diente ein monoklonaler muriner GAPDH-Antikörper und ein gegen murines Gewebe gerichteter Zweitantikörper.

10 DISKUSSION

10.1 DARLEGUNG DER FRAGESTELLUNG

Die AD ist eine neurodegenerative Erkrankung und die häufigste Ursache für die Entwicklung des klinischen Bildes einer Demenz. Die Ursache der AD ist trotz intensiver Forschung bisher nicht geklärt. Neuropathologisch imponiert das Hirngewebe von Betroffenen durch extrazelluläre Amyloid-„Plaques“ sowie intrazelluläre Tau-„Tangles“. Zusätzlich ist sekundär eine chronische Aktivierung von Glia-Zellen festzustellen, die als „Neuroinflammation“ bezeichnet wird.

In den letzten zehn Jahren konnten zahlreiche Studien unterschiedliche Effekte von A β *in vitro* und *in vivo* aufzeigen. Diese haben unter anderem eine proapoptotischen Wirkung sowie die Einschränkung der Synapsenfunktion an Neuronen und die Ausschüttung proinflammatorischer Faktoren an Glia-Zellen zur Folge.

Diese Arbeit untersucht Effekte von A β an primären Mikroglia und neuronalen Mischkulturen *in vitro*. Dabei liegt das Augenmerk auf der inflammatorischen Komponente der A β -Wirkung. Zusätzlich sollte die anti-inflammatorische Wirksamkeit des p38-MAPK Inhibitors CNI-1439 im Bezug auf die A β -Wirkung untersucht werden.

In diesem Modell, bei dem die inflammatorische Reaktion mittels Zytokin-freisetzung selektiv inhibiert werden konnte, wurde darüber hinaus die Expression des purinergen P2Y2-Rezeptors (P2Y2R) untersucht. Dieser Rezeptor ist inflammations-reguliert, das heißt er wird unter entzündlichen Bedingungen verstärkt exprimiert und aktiviert neuroprotektive Mechanismen. Wir konnten zeigen, dass A β 1-42 eine Supprimierung der Expression des Rezeptors bewirkt, die durch eine CNI-1493 Behandlung wieder aufgehoben werden kann.

10.2 AMYLOID BETA BEWIRKTE DEN ZELLUNTERGANG VON PRIMÄREN MIKROGLIA UND NEURONEN

Aggregiertes A β ist neben hyperphosphoryliertem Tau-Protein das Hauptmerkmal der AD-Pathologie (Tiraboschi et al., 2004). Die toxischen Effekte von synthetisch erzeugtem A β mit der humanen Aminosäuresequenz (40 oder 42 Aminosäuren) wurden im Rahmen dieser Arbeit an primären murinen Mikroglia und neuronalen Mischkulturen untersucht. Dabei wurden die Zellen mit löslichen A β -Oligomeren behandelt bzw. geschädigt. Dieser Versuchsaufbau stellt ein etabliertes *in vitro* Modell für die AD dar (Haass and Selkoe, 2007).

Aggregiertes A β führt zu unterschiedlichen Effekten an einzelnen Zellpopulationen des ZNS. Die Wirkung auf gliale Zellen beinhaltet dabei unter anderem die Sekretion proinflammatorischer Zytokine. Der daraus resultierende Zustand, bei dem erhöhte Zytokinmengen anfallen, wird als Neuroinflammation bezeichnet (Craft et al., 2006). Desweiteren ist die Produktion von zytotoxischen Radikalen durch Mikroglia beschrieben. Hier spielen vor allem die reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) und Stickoxid (NO) eine wichtige Rolle. Diese werden nach A β -vermittelter Aktivierung der NADPH-Oxidase vermehrt gebildet (Wilkinson and Landreth, 2006). Sie reagieren mit Fettsäuren der Lipiddoppelschicht (Butterfield et al., 2002), schädigen DNA (Butterfield et al., 2001) und stören die Funktion von Mitochondrien (Lin and Beal, 2006, Reddy, 2009). Insgesamt werden dabei zwei Epiphänomene beobachtet. Es kommt zunächst zu einer Aktivierung von Mikroglia, später folgt dann ein massiver Zelluntergang.

Vor der Aktivierung liegen Mikroglia als ruhende Zellen vor, die das umgebende Milieu nach Veränderungen absuchen. Das Erkennen einer Veränderung (zum Beispiel in Form eines Pathogens) versetzt Mikroglia in die Lage, dieses zu neutralisieren und durch Phagozytose zu beseitigen. Dieser Vorgang wird als Inflammation bezeichnet. Im experimentellen Setting eignen sich die sogenannten MAP-Kinase-Stoffwechselwege (Mitogen aktivierte Protein-Kinasen) dazu, den Aktivierungsstatus von Mikroglia zu beurteilen. Dabei spielt die p38-

MAP-Kinase eine wichtige Rolle. Sie wird durch Phosphorylierung aktiviert und induziert die Transkription proinflammatorischer Proteine, die unter anderem zu Apoptose und Entzündung führen (Zhu et al., 2000, Kumar et al., 2003).

Die Effekte von A β auf neuronale Zellen lassen sich grundsätzlich in zwei Kategorien einteilen: direkte und indirekte. Letztere sind dabei durch Gliazellen vermittelt. Glia-vermittelte Effekte werden unter anderem durch inflammatorische Milieuveränderungen verursacht – zum Beispiel durch Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies (Butterfield et al., 2001, Floden et al., 2005). Direkte Effekte von A β führen unter anderen zu Zelluntergang durch Apoptose (LaFerla et al., 1995) sowie zur Inhibition der Langzeitpotenzierung (Walsh et al., 2002). Diese pathologisch bedingten Milieuänderungen beeinflussen die Homöostase von Neuronen, was zu veränderter Expression von Proteinen und Funktionseinschränkungen führt. Durch Schwächung einzelner Glieder kommt es zur Desintegration neuronaler Netzwerke und in fortgeschrittenen Stadien zum Auftreten klinischer Symptome der Demenz (Palop et al., 2006, Sonntag, 2010).

A β 1-40 bildet die größte Entität des löslichen A β , während A β 1-42 den Hauptbestandteil von unlöslichen Amyloid-Plaques darstellt (Suzuki et al., 1994b). Beide zeigten in unseren Versuchen sowohl an Neuronen als auch an Mikroglia eine deutliche konzentrationsabhängige Zytotoxizität. Diese wurde mit Hilfe des MTT-Assays gemessen.

Der MTT-Assay ist ein kalorimetrisches Verfahren, bei dem der Metabolismus einer Zellpopulation anhand der Verstoffwechslung von MTT zu Formazan quantifiziert und mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen wird (Mosmann, 1983). Der Assay gibt nicht Auskunft über die absolute Zahl von Zellen, sondern lediglich über die Reduktase-Aktivität der Gesamtheit der Zellen in einem Well einer Zellkulturplatte. Der Vorteil dabei ist, dass nicht ein subjektiver Parameter – wie die Morphologie von Zellen – beurteilt wird, sondern die Stoffwechselaktivität als objektiv quantifizierbarer Parameter. Stark wirksame

Nekrose-auslösende Toxine bewirken innerhalb von Stunden eine Veränderung von Zellzahl und -morphologie (Majno and Joris, 1995). Mit Hilfe des MTT-Assays lassen sich hingegen subtilere Zellschädigungen anhand metabolischer Parameter nachweisen (Mosmann, 1983).

Die Reduktion des im MTT-Assay gemessenen Signals wurde in unterschiedlichen Arbeiten als Parameter sowohl für die Toxizität von A β als auch zum Nachweis einer protektiven Wirkung einzelner Substanzen in diesem Kontext verwendet (Green et al., 2000, Akan et al., 2009).

Bei der höchsten Konzentration von 10 μ M A β 1-40 und A β 1-42 reduzierte sich das MTT-Signal von primären Mikroglia und Neuronen um über 50% gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Somit stellte die Behandlung mit einer der beiden Isoformen von A β unabhängig vom Zelltyp ein stark toxisches Agens dar.

Zusätzlich dazu wurde der Zellüberstand der behandelten Zellen auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) untersucht. Dieser Versuch sollte Aufschluss über den Mechanismus der Zellschädigung geben. Das Vorliegen des sonst intrazellulär vorkommenden Enzyms LDH im Extrazellulärraum weist dabei indirekt auf eine Schädigung der Zellmembran hin. Was wiederum als Hinweis auf Nekrose zu werten wäre (Haslam et al., 2000, Wolterbeek and van der Meer, 2005). Von Nekrose ist bei der A β -bedingten Schädigung nicht auszugehen, weil im Rahmen dieser Arbeit keine signifikante LDH-Aktivität im Zellüberstand nachweisbar war.

Behandlung primärer Mikroglia und Neurone mit A β 1-40 und A β 1-42 reduzierte die Stoffwechselaktivität der Zellen, ohne dass LDH als Nekrose-Parameter anstieg. Desweiteren wurden in einer anderen Dissertation in unserer Arbeitsgruppe die Aktivierung des p38-MAPK sowie Apoptose-assoziiierter Caspasen unter A β -Behandlung gezeigt (persönliche Kommunikation mit David Mengel, Doktorand der Arbeitsgruppe). Caspasen sind zentrale Ausführungsorgane beim programmierten Zelltod (Apoptose) (Lamkanfi et al., 2007), die der p38-MAPK nachgeschaltet sind (Grethe et al., 2004). Diese Befunde sprechen

für einen komplexen Schädigungsmechanismus sowohl an Mikroglia als auch an neuronalen Mischkulturen.

Insgesamt liegt die in dieser Arbeit nachgewiesene Toxizität von A β 1-40 und A β 1-42 auf dem Niveau anderer Publikationen (Pike et al., 1993, Iversen et al., 1995). Ein Problem bei der direkten Vergleichbarkeit solcher Toxizitätsstudien liegt allerdings in der Vielzahl unterschiedlicher Aggregationsprotokolle für A β (Stine et al., 2003, Sondag et al., 2009, Jan et al., 2010).

10.3 VORBEHANDLUNG MIT CNI-1493 REDUZIERT DEN AMYLOID-BETA-ASSOZIIERTEN ZELLUNTERGANG

Nachdem CNI-1493 in einer Studie aus unserer Arbeitsgruppe günstige Effekte in AD-Modelltieren zeigte (Bacher et al., 2008), wurden die Effekte dieses Wirkstoffs auf in einem *in vitro* Modell der AD untersucht. Dazu wurden primäre Mikroglia und neuronale Mischkulturen zunächst 24 Stunden mit CNI-1493 und anschließend weitere 24 Stunden mit A β 1-40 oder A β 1-42 behandelt.

CNI-1493 hatte selbst eine dosisabhängige toxische Wirkung auf primäre Mikroglia. Nach 48 Stunden Inkubation mit 10 μ M CNI-1493 reduzierte sich das MTT-Signal auf 85,6% (\pm 0,7%). Bei neuronalen Mischkulturen war der toxische Effekt weniger ausgeprägt und lag bei 90,1% (\pm 0,9%). Da sich bei einer CNI-1493 Konzentration von 2,5 μ M weder bei neuronalen Mischkulturen noch bei Mikroglia ein toxischer Dosiseffekt nachweisen ließ, wurde diese Konzentration in sämtlichen Versuchen beibehalten.

Die toxische Wirkung von A β auf neuronale Mischkulturen und Mikroglia wurde durch 24-stündige Vorbehandlung der Zellen mit CNI-1493 reduziert. Das MTT-Signal war signifikant höher, wenn neuronale Mischkulturen mit A β 1-40 sowie A β 1-42 und wenn primäre Mikroglia mit A β 1-42 behandelt wurden. Präinkubation A β 1-40 behandelter Mikroglia mit CNI-1493 führte zwar ebenfalls zu einem erhöhten MTT-Signal, diese Erhöhung erwies sich aber nicht als statis-

tisch signifikant. Der Grund für diesen Unterschied beruht auf unterschiedlichen Faktoren.

A β 1-42 ist um die die C-terminalen Aminosäuren Isoleucin und Alanin länger als A β 1-40 (Kosik, 1999). Diese beiden aliphatischen Aminosäuren führen zu unterschiedlichen Eigenschaften der Peptide. Die Gründe dafür liegen neben einer verschiedenen starken Aggregationstendenz auch in der Art der Wechselwirkung der beiden A β -Spezies mit Zellen.

Als das längere Peptid hat A β 1-42 eine stärkere Aggregations-Tendenz (Snyder et al., 1994). Da unterschiedliche Aggregationsstufen von einer A β -Spezies unterschiedliche Wirkungen auf Zielzellen haben (Tamagno et al., 2006), liegt die Vermutung nahe, dass es auch zwischen den einzelnen A β -Spezies deutliche Unterschiede in der zellulären Wirkung gibt. Tatsächlich hat eine Gruppe gezeigt, dass verschieden lange A β sich nicht nur in ihrer Adsorptionstendenz an eine Zelle unterscheiden, sondern auch, dass A β 1-42 innerhalb der Zelle ganz anders verstoffwechselt wird als A β 1-40 oder A β 1-28 (Burdick et al., 1997). Diese Unterschiede werden auch durch Studien belegt, die jeweils spezifische pharmakologische Wirkungen der von A β 1-40 und A β 1-42 auf Zellrezeptoren untersuchen (Lee and Wang, 2003).

Zusammenfassend lässt sich ein zytoprotektiver Effekt von CNI-1493 auf primäre neuronale Mischkulturen und Mikroglia feststellen, die mit A β 1-42 behandelt wurden. Für A β 1-40 ist der protektive Effekt des Wirkstoffs lediglich bei neuronale Mischkulturen nachweisbar. Der Grund für diese Wirkungsunterschiede liegt wahrscheinlich in den unterschiedlichen biologischen Eigenschaften von A β 1-40 und A β 1-42.

10.4 BEHANDLUNG MIT AMYLOID BETA ERHÖHTE DIE AUSSCHÜTTUNG PROINFLAMMATORISCHER ZYTOKINE

Entzündliche Prozesse setzen ein, wenn das physiologische Milieu eines Gewebes durch endogene oder exogene Pathogene gestört wird. Es kommt zur

Infiltration von phagozytierenden Zellen und zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und unspezifischer toxischer Substanzen wie reaktive Sauerstoffspezies (Dheen et al., 2007).

Die akute entzündliche Reaktion ist selbstlimitierend. Durch gleichzeitige Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine und das Abräumen des auslösenden Pathogens klingt die Entzündung ab. Der Idealzustand nach einer Entzündung ist die vollständige Wiederherstellung der Gewebefunktion im Sinne einer *restitutio ad integrum* (Fulop et al., 2007). Ein chronisch entzündlicher Zustand ist gekennzeichnet durch ein Persistieren des auslösenden Pathogens und ständige Aktivierung und Präsenz Entzündungs-auslösender Zellen im betreffenden Gewebe (Streit et al., 2004).

Das zentrale Nervensystem (ZNS) ist ein immunprivilegiertes Organ. Ein Großteil immunologischer Aufgaben wird von der hochspezifischen Bluthirnschranke und Mikroglia-Zellen übernommen (Griffiths et al., 2007). Mikroglia sind gewebsständige Makrophagen des ZNS. Sie exprimieren einen Großteil der Pattern Recognition Receptors (PRR) – einer Rezeptorklasse, die pathogen-assoziierte molekulare Strukturen erkennt. Sollte ein exogenes oder endogenes Pathogen die Bluthirnschranke überqueren, wird von aktivierter Mikroglia eine Reihe Signalmoleküle ausgeschüttet, die die Rekrutierung anderer Gliazellen und peripherer Immunzellen bewirken. Diese Situation wird als akute Neuroinflammation bezeichnet. Bei Persistenz des Pathogens entsteht ein Zustand chronischer Neuroinflammation (Streit et al., 2004).

Im Falle von AD bildet unter anderem A β das persistierende endogene Pathogen. Durch eine letztlich nicht geklärte Synthese- oder Abräumstörung fallen große Mengen zytotoxischer Peptid-Oligomere an, deren Clearance eingeschränkt ist (Fiala et al., 2005). Tatsächlich wurden vor kurzem erstmals Daten vorgestellt, die einen verminderten Abbau von A β belegen (Mawuenyega et al., 2010). Als Oligomer vorliegendes A β weist molekulare Muster auf, die von den oben genannten PRRs erkannt werden. Das löst eine entzündliche Reaktion aus

(Salminen et al., 2009). Obwohl in den letzten Jahren Studien publiziert wurden, die günstige Aspekte der Inflammation hervorhoben (Shaftel et al., 2007b, Chakrabarty et al., 2010), wird von einer selektiven Inaktivierung der Entzündungsreaktion therapeutischer Nutzen erhofft.

Wie aus den Ausführungen zur Inflammation deutlich wird, handelt es sich bei diesem Zustand um eine konzertierte Leistung mehrerer unterschiedlicher Zelltypen und Mediatorensysteme (monozytäre im ZNS gliale Zellen inklusive Mikroglia, periphere Makrophagen etc.) (Simard et al., 2006). Die Zellkommunikation geschieht dabei vor allem über Zytokine und Chemokine. Zytokine werden in der Peripherie von Zellen des Immunsystems, im ZNS von glialen Zellen ausgeschüttet und sind proinflammatorisch – wie $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β – oder anti-inflammatorisch wirksam wie IL-10 und TGF- β . Chemokine – z. B. CXCL1 und CXCL2 – „locken“ Effektorzellen an den Ort der Entzündung.

In dieser Arbeit wurde primäre Mikroglia mit und ohne CNI-1493 Vorbehandlung 24 h mit A β behandelt. Anschließend wurden die Zellüberstände mittels ELISA auf die proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und IL-1 β sowie auf das anti-inflammatorisch wirksame IL-10 untersucht.

In der Literatur sind diverse Versuchsansätze beschrieben, bei denen A β eine inflammatorische Antwort bei Mikroglia auslöst. Diese lassen sich einerseits einteilen in Ansätze, bei denen die Zellen mit einem immunogenen Kostimulator – zum Beispiel dem Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) vobehandelt – und anschließend mit A β behandelt werden (Forloni et al., 1997). Auf der anderen Seite stehen Ansätze, bei denen A β allein als Stimulator wirkt (Sondag et al., 2009).

Es wurde in früheren Arbeiten gezeigt, dass mit LPS stimulierte Mikroglia proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und IL-1 ausschüttet (Sebire et al., 1993). Eine zusätzliche Behandlung mit A β hatte dabei einen additiven Effekt (Forloni et al., 1997). Bei solchen Versuchsansätzen besteht die Schwierigkeit darin, dass LPS die sehr starke Aktivierung zahlreicher stressassoziiertes

Stoffwechselwege bewirkt (Opal, 2010). Dabei sind A β -spezifische Effekte methodisch schwierig abzugrenzen. Abgesehen vom methodischen Aspekt folgen Ansätze, die sowohl A β als auch einen unspezifischen proinflammatorischen Reiz beinhalten, einer akzeptierten Hypothese zur AD. Diese besagt, dass ein nicht bekannter inflammatorischer Stimulus – beispielsweise eine Infektion – im ZNS ein inflammatorisches Milieu auslösen, das die Entstehung von AD begünstigt (Kamer et al., 2008).

Bei der vorliegenden Arbeit wurde A β als alleinigen Aktivator von Mikroglia genutzt. Der Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass es mit A β nur einen auslösenden Faktor für die Inflammation gibt. In den folgenden Kapiteln wird die A β -assoziierte Zytokin-Ausschüttung anhand der einzelnen Zytokine erörtert.

10.4.1 Vorbehandlung mit CNI-1493 unterdrückte den A β -bedingten Anstieg von TNF α

24-stündige Behandlung von primärer Mikroglia mit A β 1-40 und A β 1-42 führte zu erhöhter Ausschüttung von TNF α . Nach Präinkubation der Zellen mit CNI-1493 blieben die Spiegel von TNF α bei Behandlung mit A β auf dem Niveau der unbehandelten Kontrolle.

Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), ein proinflammatorisches Zytokin, wurde 1984 erstmals kloniert (Pennica et al., 1984) und 1985 als der entscheidende Modulator des septischen Schocks beschrieben (Beutler et al., 1985). Das TNF α -Vorläuferprotein liegt als Transmembranprotein vor und ist als Trimer angeordnet. Durch proteolytische Abspaltung entsteht die aktive Form, die an den TNF α -Rezeptor bindet (Black et al., 1997). Der Rezeptor führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells (NF- κ B) sowie der MAPK-Stoffwechselwege und in geringem Maße des Cell Death Signaling (Wajant et al., 2003). Beim Cell Death Signaling (Zelltod Signalwege) handelt es sich um die Gesamtheit der Stoffwechselwege, die im Rahmen der Apoptose aktiviert werden. Die Enzymklasse der Caspasen stellt dabei zentrale Verschaltungsstellen dar (Jin and El-Deiry, 2005).

Sowohl bei der AD als auch bei deren Vorstufe dem Mild Cognitive Impairment (MCI) liegen erhöhte Serumspiegel von TNF α vor (Alvarez et al., 2007). Der Begriff Mild Cognitive Impairment (Leichte kognitive Beeinträchtigung) beschreibt ein Nachlassen kognitiver Fähigkeiten, das über die Altersnorm hinausgeht, ohne dass dabei die Kriterien einer Demenz erfüllt werden (Petersen et al., 1999). Im diesem Zusammenhang wurde 2006 eine Pilotstudie veröffentlicht, die eine Verbesserung der klinischen Symptome von AD-Patienten unter einer TNF α -Inhibitor-Therapie zeigen konnte (Tobinick et al., 2006). Dadurch wird die mögliche Bedeutung dieses Zytokins im Bezug auf die anti-inflammatorisch ausgerichtete Therapie der AD unterstrichen.

TNF α induziert über NF κ B die Transkription zahlreicher proinflammatorischer, anti-apoptotischer und proliferativer Faktoren. Desweiteren aktiviert es den JNK-MAP Kinase Stoffwechselweg (Liu et al., 1996, Comalada et al., 2003), welcher eine Zelldifferenzierung bewirkt und letztlich proapoptotisch auf Zielzellen wirkt (Gaur and Aggarwal, 2003, Mishra et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde primäre Mikroglia 24 Stunden mit A β 1-40 und A β 1-42 behandelt. Das führte zu einer signifikanten Erhöhung der TNF α Ausschüttung gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Diese Zunahme der Sekretion blieb nach 24-stündiger Präinkubation mit CNI-1493 aus. CNI-1493 unterdrückte somit die TNF α Antwort von Mikroglia auf Behandlung mit A β . Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass CNI-1493 alle drei MAPK – p38, p44 und JNK – inhibiert. Da zur Ausschüttung von TNF α die p38-MAPK aktiviert werden muss (O'Sullivan et al., 2009), kann dies ein Erklärungsansatz für die Wirkung von CNI-1493 auf die TNF α -Sekretion bieten.

Das Zytokin TNF α wirkt vor allem proinflammatorisch, proliferativ und proapoptotisch. Die Hemmung der Produktion dieses Zytokins kann somit mit positiven Effekten verbunden sein, da dadurch neben Inflammation unter Umständen auch Zelluntergang unterbunden werden kann.

10.4.2 Vorbehandlung mit CNI-1493 unterdrückte den A β -assoziierten Anstieg von IL-6

24-stündige Behandlung von Mikroglia mit A β 1-40 und A β 1-42 führte zu einem signifikanten Anstieg von IL-6. Dieser blieb wiederum aus, wenn Mikroglia mit CNI-1493 vorbehandelt wurde.

IL-6 wurde erstmals Anfang der 1980er im Zusammenhang mit B-Lymphozyten beschrieben. 1986 wurde die entsprechende cDNA-Sequenz veröffentlicht (Hirano et al., 1986). Das Zytokin wird neben einer Reihe nichtimmunologischer Zellen (u. a. quergestreifter und glatter Muskulatur und Osteoblasten) auch von T-Zellen und Makrophagen ausgeschüttet. Seine immunologische Funktion liegt an der Schnittstelle von angeborener und erworbener Abwehr, beim sogenannten „Immunological Switch“. IL-6 beeinflusst dabei die Ausschüttung einer Reihe von Zytokinen und Chemokinen, die das Zusammenwirken von Gewebsmakrophagen (z. B. Mikroglia im ZNS) und von B- und T-Zellen koordinieren (Jones, 2005). Bei der AD werden erhöhte IL-6-Spiegel im peripheren Blut gemessen (Swardfager et al., 2010).

A β -induzierter Anstieg von IL-6 wurde *in vitro* (Sondag et al., 2009) und *in vivo* (Patel et al., 2005) beschrieben. Ähnlich wie in dieser Arbeit steigt IL-6 unter dem Einfluss von A β in diesen Publikationen um das Zwei- bis Dreifache an. Es wirkt vor allem proinflammatorisch (Xing et al., 1998). Die zelluläre Wirkung von IL-6 an Mikroglia erfolgt über den Glycoprotein 130 (gp130) Rezeptor. Dieses Transmembranprotein aktiviert die so genannte JAK-STAT (JAK = Janus-Kinase; STAT = Signal Transducers and Activators of Transcription) Signalkaskade, an deren Ende der Transkriptionsfaktor Signal Transducers and Activators of Protein Transcription (STAT3) phosphoryliert wird. Dieser bewirkt die Expression unterschiedlicher Proteine, die Inflammation und Apoptose regulieren (Abell et al., 2005, Hodge et al., 2005). An der Phosphorylierung von STAT3 sind dabei unter anderem Akt und mammalian target of Rapamycin (mTOR) beteiligt. Beide sind wichtige Zielstrukturen der Tumorbologie mit sehr breitem Wirkungsspekt-

rum. Unter anderem sind sie an Zellproliferation und Apoptose beteiligt (Castedo et al., 2002, Abell et al., 2005).

Neben der Aktivierung von JAK-STAT ist die Phosphorylierung von GSK-3 β (Glycogen-Synthase-Kinase 3 beta) eine weitere wichtige Funktion von Akt. GSK-3 β ist wiederum an der Hyperphosphorylierung von Tau und auf lange Sicht an der Entstehung von „Tangles“ beteiligt (Rankin et al., 2007).

Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) ist in den vergangenen Jahren in den Fokus der Alzheimer-Forschung gerückt. Ein Wirkstoff, der mTOR inhibiert, ist Resveratrol (Vingtdeux et al., 2011). Dieses ist ein Polyphenol, das in großen Mengen in Rotwein vorkommt. Es dient als Modellsubstanz für zahlreiche Analoga, die der Aggregation von A β entgegen wirken und die Ausschüttung von TNF α und IL-6 hemmen (Zhong et al., 1999, Bi et al., 2005, Riviere et al., 2008).

Neben proinflammatorischen Effekten von IL-6 sind weitere beschrieben, die als positiv anzusehen sind. So ist das Zytokin wichtig für die Regeneration von Hirngewebe nach Hirntrauma (Swartz et al., 2001). In der Studie von Swartz et al. wurde die Ausheilung eines aseptischen Traumas bei IL-6 defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen verglichen. Die Geweberegeneration trat bei den Tieren vom Wildtyp früher ein. Eine weitere Gruppe beschreibt die Effekte einer IL-6 induzierten Gliose auf A β -Plaques im Hirngewebe von AD-Modelltieren (Chakrabarty et al., 2010). In diesen Arbeiten hatte eine erhöhte Aktivierung von Gliazellen zu einer erhöhten Phagozytose von A β -Plaques geführt.

Zusammenfassend ist IL-6 eine wichtige Schaltstelle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Neuroinflammation. Es hat eine sehr breite inflammatorische Wirkung und aktiviert desweiteren Stoffwechselwege, die Zelluntergang und die Entstehung von Tau-Tangles bewirken. Daher erscheint eine verminderte Ausschüttung des Zytokins wünschenswert. Andererseits sind auch positive Wirkungen von IL-6 auf die strukturelle Integrität des Hirngewebes beschrieben. Weitere Studien müssen zeigen, welche Auswirkungen IL-6 auf die Pathogenese der AD besitzt.

10.4.3 Vorbehandlung mit CNI-1493 führte zu einem Anstieg von IL-1 β

24-stündige Behandlung von Mikroglia mit A β 1-40 und A β 1-42 führte zu erhöhter Ausschüttung von IL-1 β . Wurden die Zellen mit CNI-1493 vorbehandelt, erfolgte, im Gegensatz zu TNF α und IL-6, ein weiterer Anstieg der IL-1 β -Sekretion.

Bei Interleukin-1 β handelt es sich um ein proinflammatorisches Zytokin, das vor allem von Monozyten gebildet wird. IL-1 wurde 1972 erstmals beschrieben (Gery and Waksman, 1972), 1985 wurden in einer cDNA-Bibliothek von Makrophagen DNA-Sequenzen gefunden, deren Translationsprodukte die Eigenschaften von Interleukin-1 aufwiesen. Bei den beiden Sequenzen handelte es sich um IL-1 α und IL-1 β .

Die aktive Form von IL-1 β ist ein 153 Aminosäuren langes Monomer, dessen Zielstruktur der ubiquitär auf Körperzellen vorkommende Interleukin-1-Rezeptor ist. Seine Aktivierung löst in unterschiedlichen Zellpopulationen spezifische Antworten aus. In Neuronen kommt es zur Induktion der Tau-Phosphorylierung und Synaptophysin-Synthese (Li et al., 2003). In Mikroglia wird eine NF κ B-vermittelte Synthese von TNF α , IL-6 sowie der Chemokine CXCL1 und CXCL2 beobachtet (Moynagh, 2005).

IL-1 β bindet an einen von zwei zellulären Rezeptoren: Interleukin-1 Rezeptor Typ 1 (IL-1RI) oder Typ 2 (IL-1RII) (Sims et al., 1993). Dabei leitet lediglich IL-1RI ein Signal ins Zellinnere. Bindung an IL-1RII führt zu keiner Signaltransduktion und unterbindet die Wirkung von IL-1 β (Sims et al., 1993). Der zur Ausschüttung von IL-1 β führende Mechanismus ist nicht abschließend geklärt. Die Besonderheit dieses Zytokins gegenüber anderen ist, dass es keine Signalsequenz besitzt, die es zum endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat leitet (Singer et al., 1988, Walter and Johnson, 1994). Stattdessen sind inaktive Vorstufen im Zytoplasma gelöst, wo sie von der Caspase-1 (früher: IL-1 β -Converting Enzyme) in die aktive Form überführt werden (Black et al., 1989). Die Ausschüttung des Zytokins wird anschließend durch extrazelluläres ATP ge-

triggert, das an den purinergen P2X7-Rezeptor (P2X7R) bindet (Mutini et al., 1999).

Die zelluläre Wirkung von IL-1 β umfasst unter anderem die Aktivierung von MAPK-Stoffwechselwegen mit nachfolgender Induktion von Inflammation, Zellproliferation sowie Apoptose (Srivastava et al., 2002). Im Zuge dessen kommt es auch zur Ausschüttung von IL-6 und TNF α (Lee et al., 1995). Aufgrund dieser Effekte stellt die Hemmung von IL-1 β ein Konzept zur Behandlung inflammatorischer Erkrankungen wie der systemischen juvenilen idiopathischen Arthritis dar (Dinarello, 2005). Der synthetische IL-1RI Antagonist Anakinra® ist in Kombination mit Methotrexat zur Therapie der rheumatoiden Arthritis zugelassen (Cohen et al., 2002). Studien aus den letzten Jahren suggerieren jedoch auch mögliche positive Aspekte von IL-1 β . So haben Mason et al. 2001 festgestellt, dass IL-1 β für die Heilung des ZNS-Gewebes wichtig ist (Mason et al., 2001). Bei dieser Studie wurden die Axone im ZNS von Wildtyp- bzw. IL-1 Knockout-Mäusen demyelinisiert. Mittels immunhistochemischer Methoden konnte gezeigt werden, dass eine Remyelinisierung bei Wildtyp- nicht jedoch bei den Knockout-Tieren erfolgte.

Im Hinblick auf AD haben Forscher eine IL-1 beta^{XAT} Maus erzeugt, die konstitutiv IL-1 β überexprimiert. Trotz chronisch erhöhter IL-1 β Konzentrationen konnte dabei keine Neurodegeneration festgestellt werden (Shaftel et al., 2007a). In einer Folgepublikation wurden IL-1 beta^{XAT} Tiere mit APP^{swe}/PS1^{dE9} Mäusen verpaart. Dadurch entstanden Modellmäuse mit einer Mutation des Amyloid Precursor Protein und Päsennin 1, die gleichzeitig IL-1 β überexprimierten (Shaftel et al., 2007b). Diese Tiere wiesen erhöhte Entzündungsparameter auf. Gleichzeitig waren weniger unlösliche A β -Plaques nachweisbar. In einer weiteren Publikation wurden schließlich kognitive Tests durchgeführt.

Dabei wurden IL-1 beta^{XAT} Mäuse mittels Morris Water Maze Tests auf Störungen des räumlichen Gedächtnis untersucht (Moore et al., 2009). In diesem Test schnitten transgene Mäuse schlechter ab als Kontrolltiere. Die Autoren deu-

teten das Nachlassen kognitiver Eigenschaften nicht als spezifische Wirkung von IL-1 β , sondern als Folge einer breiten neuroinflammatorischen Antwort auf das Zytokin. Ein ähnliches Nachlassen kognitiver Effekte wurden zuvor mittels LPS-induzierter Neuroinflammation gezeigt (Hauss-Wegrzyniak et al., 2000a). Jedoch bewirkte intraventrikuläre LPS-Instillation permanente Umstrukturierung und Zelluntergang im Hippokampus (Hauss-Wegrzyniak et al., 1998b, Hauss-Wegrzyniak et al., 2000b, Hauss-Wegrzyniak et al., 2002). IL-1 beta^{XAT} Tiere wiesen diese spezifischen hippokampalen Veränderungen jedoch nicht auf (Shaftel et al., 2007a).

Eine israelische Arbeitsgruppe hat die konstitutive Wirkung von IL-1 β auf die Gedächtniskonsolidierung gezeigt, indem sie transgene Mäuse mit einem Knockout des IL-1 Rezeptor Typ 1 erzeugten. Diese Tiere wiesen mnestiche Störungen auf (Avital et al., 2003). Goshen et al. setzten die positiven und negativen Effekten von IL-1 β in Beziehung zueinander, indem sie die Wirkung von IL-1 β auf Gedächtniskonsolidierung als glockenförmige Graphen darstellen (Goshen et al., 2007). Damit wird zum Ausdruck gebracht, dass es einen engen biologischen Bereich gibt, innerhalb dessen IL-1 β die Gedächtnis-Konsolidierung unterstützt. Ober- und unterhalb dieses Konzentrationsbereichs sind gestörte mnestiche Parameter feststellbar.

Eine weitere Arbeitsgruppe hat die Effekte von IL-1 auf Synapsen untersucht. Li et al. konnten dabei zeigen, dass von Mikroglia ausgeschüttetes IL-1 über den neuronalen p38-MAPK Stoffwechselweg die Synthese von Synaptophysin stört sowie die Tau-Phosphorylierung induziert (Li et al., 2003). Gehemmte Synaptophysin-Synthese führt zu gestörter Synapsen-Funktion. Zusätzlich ist hyperphosphoryliertes Tau unlöslich und behindert den axonalen Transport. Beides sind pathologische Merkmale der AD.

CNI-1493 könnte als p38-MAPK-Inhibitor in der Lage sein, schädigende Effekte von IL-1 β , wie die Induktion proinflammatorischer Zytokine sowie die Störung des axonalen Transports und der synaptischen Integrität, zu unterdrücken.

In Abwesenheit der negativen Effekte überwiegen möglicherweise positive Wirkungen des Zytokins. Einer dieser Effekte könnte die Induktion des purinergen P2Y2R sein, auf die später weiterführend eingegangen wird. Der genaue Mechanismus, über den die sequentielle Behandlung mit CNI-1493 und A β zur Ausschüttung von IL-1 β führt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschliessend geklärt werden.

Nach der Beobachtung erhöhter IL-1 β Werte gingen wir zunächst davon aus, dass aus der sequenziellen CNI-1493 und A β -Behandlung entweder erhöhte ATP-Spiegel oder P2X7R-Expression resultieren. Um diese Frage zu klären, wurde extrazelluläres ATP gemessen. Die P2X7R-Expression wurde mit Hilfe der Immunoblot-Analyse untersucht. Leider scheiterten beide Versuche methodisch und ließen sich trotz intensiver Verbesserungsbemühungen und häufiger Wiederholungen nicht durchführen.

Zusätzlich zur Interaktion von ATP mit dem P2X7R konnte eine Studie zeigen, dass das antimikrobiell wirksame Peptid LL37 ebenfalls durch Wechselwirkung mit dem P2X7R die Prozessierung und Sekretion von IL-1 β steigert (Elssner et al., 2004). Eine kürzlich erschienene Publikation über eine mögliche Rolle von A β als antimikrobielles Peptid hatte zahlreiche Parallelen zwischen A β und LL37 aufgezeigt (Soscia et al., 2010). Möglicherweise induziert A β wie LL37 direkt über den P2X7R die Ausschüttung von IL-1 β .

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die sequenzielle Behandlung von Mikroglia mit CNI-1493 und A β zu einer erhöhten Ausschüttung von IL-1 β führt. Der genaue Mechanismus dieser gesteigerten Ausschüttung konnte nicht ermittelt werden.

10.4.4 A β hat keinen Einfluss auf die Ausschüttung von IL-10

Die Behandlung primärer Mikroglia mit A β hat keinen Effekt auf die Ausschüttung von IL-10. Behandlung mit CNI-1493 hat ebenfalls keinen Effekt.

IL-10 ist anti-inflammatorisch wirksam und begrenzt unter physiologischen Bedingungen potent Entzündungsreaktionen im gesamten Körper. Seine Ausschüttung erfolgt zeitversetzt mit proinflammatorischen Zytokinen (u.a. IL-1, IL-6, TNF α) und inhibiert autokrin Monozyten (de Waal Malefyt et al., 1991). Die mögliche Reduktion von IL-10 unter CNI-1493 Behandlung erfolgt möglicherweise indirekt durch Hemmung der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine.

10.5 SEQUENTIELLE BEHANDLUNG MIT CNI-1493 UND AMYLOID BETA FÜHRTE ZUR HOCHREGULATION DES PURINERGEN P2Y2-REZEPTORS

In unserer Arbeit konnten wir durch eine Präinkubation einer primären neuronalen Mischkultur mit CNI-1493 sowie anschließender A β -Behandlung eine erhöhte Expression des P2Y2R-Rezeptors (P2Y2R) nachweisen. Die wichtigste Bedeutung stellt der Rezeptor bei experimentellen Ansätzen in der Therapie der zystischen Fibrose dar – der in Europa häufigsten rezessiv vererbten Multisystem-Erkrankung mit einer Mutation im CFTR-Gen (Rowe et al., 2005). Bei dieser Erkrankung bewirken Agonisten am P2Y2R unter anderem eine Erhöhung der Chlorid-Leitfähigkeit sowie eine Verbesserung der ziliaren Clearance im pulmonalen Gewebe (Kellerman et al., 2002). Der noch nicht zugelassene inhalativ applizierte Wirkstoff Denufosol hat in mehreren Phase 3 klinischen Studien – siehe TIGER-1 und TIGER-2 Studie unter www.clinicaltrial.gov - zur verbesserten Lungenfunktion geführt (Accurso et al., 2011). Da der Rezeptor durch inflammatorische Prozesse reguliert ist und von Neuronen und Gliazellen im ZNS exprimiert wird, wird er zunehmend für Erkrankungen des ZNS erforscht.

Mehrere Arbeitsgruppen haben die Hochregulation des P2Y2R durch proinflammatorische Zytokine an neuronalen und nicht-neuronalen Zellen beschrieben (Koshiba et al., 1997, Hou et al., 2000, Kong et al., 2009). Im ZNS kommt der Rezeptor auf unterschiedlichen Zellentitäten vor und ist unter anderem an der Steuerung der Neurotransmission, Zellproliferation sowie des neuronalen Zellüberlebens und der Apoptose beteiligt (Arthur et al., 2005, Weisman et al., 2005, Arthur et al., 2006).

Kong et al. haben gezeigt, dass die Stimulation kortikaler Neurone mit IL-1 β zur Hochregulation von P2Y2R führt. Gleichzeitig steigt damit die Bereitschaft der Zellen, die α -Sekretase (siehe unten) zu aktivieren, sobald sie mit dem P2Y2R-Agonisten UTP behandelt werden (Kong et al., 2009). Erhöhte Prozessierung des Amyloid Precursor Protein (APP) durch die α -Sekretase reduziert die A β -Synthese und führt zur vermehrten Ausschüttung des neuroprotektiven sAPP α . Diese beiden Effekte werden im folgenden Kapitel erläutert und diskutiert. Schließlich hat eine Arbeitsgruppe die Gehirne von AD-Patienten post mortem auf die Expression des P2Y2R untersucht und eine verminderte Expression des Rezeptors festgestellt (Lai et al., 2008).

Die sequenzielle Behandlung primärer Zellen mit CNI-1493 und A β führte zu erhöhter Expression des purinergen P2Y2R. Diese Hochregulation lässt sich durch eine erhöhte Ausschüttung von IL-1 β erklären. Der P2Y2R hat anti-apoptotische Wirkung und führt indirekt zur Ausschüttung des neuroprotektiven sAPP α . Beides sind Effekte, die dem schädigenden Einfluss von A β im Rahmen der AD-Pathologie entgegen wirken können. Die von Lai et al. (Lai et al., 2008) beschriebene verminderte P2Y2R-Expression in post mortem AD-Hirnen ließ sich in dieser Arbeit nur unter A β 1-42 beobachten. Warum dieser Effekt nicht unter A β 1-40 Behandlung zu sehen war, ließ sich nicht klären.

10.6 AGONISTEN DES P2Y2-REZEPTORS STEIGERN DIE SEKRETION DES NEUROPROTEKTIVEN sAPPALPHA

Kong et al. haben gezeigt, dass Aktivierung des neuronale P2Y2-Rezeptors (P2Y2R) mit Uraciltriphosphat (UTP) zur gesteigerten Ausschüttung des löslichen Amyloid Precursor Proteins α (sAPP α) führt (Kong et al., 2009). UTP ist ein Agonist des P2Y2R. sAPP α ist ein neuroprotektives Spaltprodukt des Amyloid Precursor Proteins (APP), das durch Spaltung von APP durch die α -Sekretase entsteht (Lichtenthaler, 2011a). Die erhöhte Ausschüttung des sAPP α hat zahlreiche Implikationen für die AD-Pathologie.

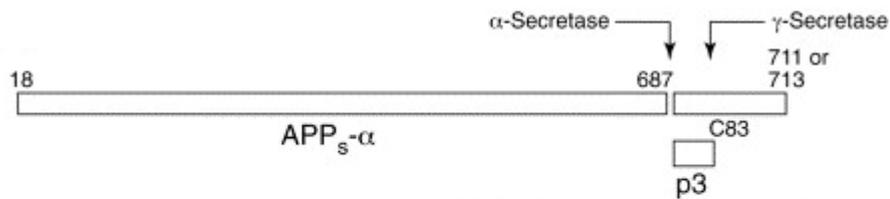


Abb. 29 Nicht-amyloidogene Kaskade des APP-Stoffwechsel. Zunächst proteolysiert die α -Sekretase N-Terminus von APP unter Freisetzung von sAPP α nach extrazellulär. Anschließend spaltet die γ -Sekretase und bildet das P3-Peptid. Quelle: modifiziert nach Selkoe, 1998

Zunächst einmal benötigt die α -Sekretase zur Synthese von sAPP α das gleiche Substrat wie die β -Sekretase für die Synthese von A β – nämlich APP. Der entscheidende Unterschied zwischen α - und β -Sekretase ist, dass erstere APP innerhalb der A β -Sequenz spaltet. Das dabei entstehende Fragment P3 (um 16 N-terminale Aminosäuren kürzer als A β), das nicht direkt an der Plauebildung beteiligt ist (Lichtenthaler, 2006). Sowohl α - als auch β -Sekretase sind an einem Vorgang beteiligt, der als „Ectodomain Shedding“ bezeichnet wird. Dieser Begriff beschreibt die Abspaltung der extrazellulären Domäne des Transmembranproteins APP. Dabei schneidet die α -Sekretase APP näher an der Zellmembran als die β -Sekretase. Damit verbleibt für die nachfolgende, innerhalb der Zellmembran statt findende, Spaltung durch die γ -Sekretase ein kürzeres, weniger toxisches Peptid (Lichtenthaler, 2006). Gleichzeitig bleibt die Synthese von sAPP β aus, das proapoptotische Eigenschaften haben soll (Nikolaev et al., 2009).

Durch Ectodomain Shedding wird der A β -Synthese Substrat entzogen. Abnehmende A β -Produktion wurde sowohl in genetischen Studien nachgewiesen, bei denen die α -Sekretase überexprimiert wurde (Postina et al., 2004), als auch in pharmakologischen, bei denen das Enzym mit Agonisten aktiviert wurde (Bandyopadhyay et al., 2007). In der Studie von Postina et al. wurde zusätzlich gezeigt, dass neben A β -Spiegeln auch das Ausmaß der Neuroinflammation zurückging und sich kognitive Parameter der Tiere verbesserten (Postina et al., 2004). Andere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe geben Hinweise darauf, dass

CNI-1493 *in vivo* an der α -Sekretase agonistisch wirkt (persönliche Kommunikation mit David Mengel, Doktorand der Arbeitsgruppe).

Neben der Senkung des neurotoxischen A β besteht in der Aktivierung der α -Sekretase ein direkter positiver Aspekt, nämlich erhöhte sAPP α Spiegel. Das Peptid hat unterschiedliche neuroprotektive Eigenschaften. So induziert es unter anderem die Expression von Transthyretin und Insuline-like Growth Factor 2 und schützt so Neurone vor A β -induzierter Toxizität (Stein et al., 2004). Desweiteren verbessert sAPP α die kognitiven und motorischen Leistungen von Tieren mit diffusen Hirntrauma (Thornton et al., 2006, Corrigan et al., 2011). Somit bieten die positiven Effekte, die eine erhöhte α -Sekretase Aktivierung im Rahmen der AD-Pathologie hat, eine interessante Erweiterung der bestehenden Forschungsansätze.

10.7 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass A β eine toxische Wirkung auf primäre neuronale und mikrogläre Zellen hat. Zusätzlich löste die Behandlung von primären Mikroglia mit dem Peptid eine erhöhte Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-6 und IL-1 β aus. Präinkubation der Zellen mit dem anti-inflammatorisch wirksamen p38 MAPK Inhibitor CNI-1493 reduzierte die Ausschüttung von TNF α und IL-6 auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle. Interessanterweise stieg die Sekretion von IL-1 β nach CNI-1493 Präinkubation weiter an. Dieser Anstieg stellt eine mögliche Erklärung für eine erhöhte Expression des P2Y2R in primären neuronalen Mischkulturen bei sequentieller CNI-1493 und A β -Behandlung dar. Die genauen Mechanismen dieser Regulationen ließen sich nicht klären. Jedoch bestätigt die Literatur mögliche positive Wirkungen eines erhöhten IL-1 β Spiegels und einer vermehrten Expression des P2Y2R. So ist das Zytokin unter anderem an der Konsolidierung von Gedächtnisinhalten beteiligt. Der P2Y2R aktiviert die nichtamyloidogene Kaskade der APP-Prozessierung und aktiviert den EGFR, was eine neuroprotektive Wirkung hat. Zur Veranschaulichung dieser Effekte dient Abb. 30.

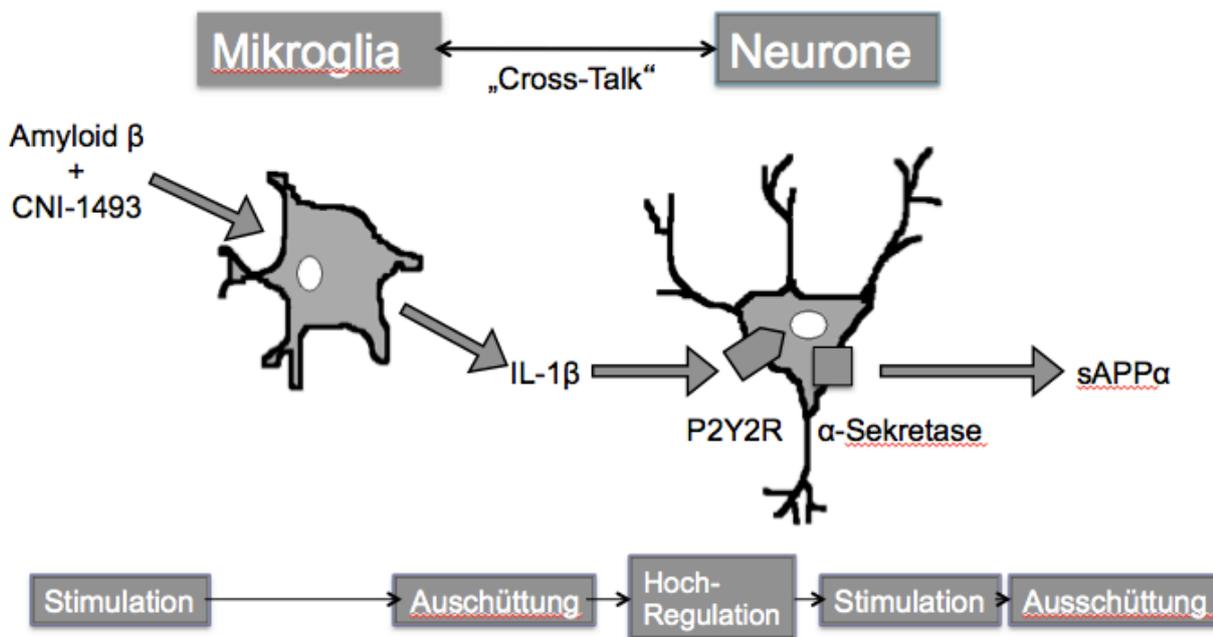


Abb. 30 Möglicher Mechanismus der CNI-1493 bedingten P2Y2R Hochregulation. Infolge einer Behandlung mit CNI-1493 und A β schütten primäre Mikroglia IL-1 β aus. Dieses führt an primären Neuronen zu einer gesteigerten Expression des P2Y2R, dessen Agonisten die α -Sekretase. Diese prozessiert APP unter Bildung von sAPP α .

Dargestellt sind die Wechselwirkung mikroglialer und neuronaler Zellen, die beide erhöhten A β -Spiegeln ausgesetzt sind. Hinzugefügtes CNI-1493 bewirkt eine gesteigerte IL-1 β Sekretion – möglicherweise durch eine Aktivierung des mikroglialen P2X7R. IL-1 β erhöht die Expression des neuronalen P2Y2R, dessen Agonisten über eine indirekte Aktivierung der α -Sekretase eine erhöhte Ausschüttung des neuroprotektiven sAPP α bewirkt. Dieses Peptid wirkt den toxischen Effekten von A β entgegen, was im Tierversuch der AD zur Verbesserung kognitiver Parameter führt. Desweiteren führt der P2Y2R zur Aktivierung des EGFR, der neuroprotektive Mechanismen aktiviert.

10.8 AUSBLICK FÜR DIE ALZHEIMER-FORSCHUNG

Die reaktive Aktivierung glialer Zellen im ZNS – genannt Neuroinflammation – kommt regelhaft bei AD-Patienten vor. In der Vergangenheit gab es unterschiedliche klinische Studien zur Therapie der AD. Darunter auch anti-

inflammatorische Ansätze mit NSAIDs. Die Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe waren minimal und die Therapie wurde als unwirksam verworfen (Etminan et al., 2003, Weggen et al., 2007, Vlad et al., 2008). Für das Scheitern unterschiedlicher Therapieansätze der AD gibt es mehrere wichtige Gründe.

Der Therapieerfolg bemisst meist an kognitiven Parametern, die schwierig zu reproduzieren sind. Das andere Problem ist nach wie vor das fehlende Verständnis wichtiger Punkte innerhalb der Pathogenese. Zwar sind sowohl A β als auch Tau integrale Bestandteile der Pathophysiologie, doch konnten die genauen pathologischen Vorgänge bislang nicht geklärt werden .

Ein weiterer Grund, warum sämtliche Therapieansätze bisher wenig wirksam waren, liegt auch in der Tatsache, dass die Erkrankung am Therapiebeginn bereits zu weit fortgeschritten sein könnte. Große Anstrengungen werden deswegen unternommen, um den Diagnosezeitpunkt in das vorklinische Stadium der Erkrankung vorzulegen. Die Darstellung von Amyloid im Gehirn mittels bildgebender Verfahren ist eine der Optionen. Allerdings gibt es weiterhin kein etabliertes Früherkennungsverfahren. Dieses bleibt Bestandteil intensiver Forschungsbemühungen.

Die vorliegende Arbeit konnte den P2Y₂R als ein mögliches therapeutisches Ziel im Kontext der AD identifizieren. Dieser Rezeptor wird durch sequentielle Behandlung mit CNI-1493 und A β hochreguliert. Er hat positive Effekte auf den A β -Metabolismus und aktiviert neuroprotektive Mechanismen. Über die Relevanz des Rezeptors *in vivo* im Rahmen der AD gibt es so gut wie keine Hinweise. Eine Gruppe hat zwar die selektive Abnahme von P2Y₂R in post mortem Hirnen bei AD-Patienten beschrieben. Doch dieser Publikation folgten keine weiteren, die die Ergebnisse reproduzierten. Sämtliche Aussagen zum Rezeptor stammen aus *in vitro* Experimenten. Mut macht die Tatsache, dass Agonisten des Rezeptors bei der Therapie zystischen Fibrose vor der klinischen Zulassung stehen und somit, nach den vorliegenden Daten zu urteilen, wirksam

und sicher sind. Ob ähnliche Präparate die negativen Seiten der Neuroinflammation verhindern können, ist nicht klar.

CNI-1493 senkt die A β -induzierte Ausschüttung von TNF α und IL-6. Zusätzlich steigert es die Sekretion von IL-1 β und die Expression des P2Y₂R. Die Tatsache, dass die Ausschüttung einzelner proinflammatorischer Zytokine selektiv gehemmt, die anderer dafür gesteigert wird, ist zunächst überraschend. Als Erklärungsansätze kommen unterschiedliche Trigger- und Sekretionsmechanismen der einzelnen Zytokine infrage. Klärungsversuche für diese Beobachtungen sind im Rahmen dieser Arbeit an den Methoden gescheitert und müssen in Folgearbeiten untersucht werden.

Insgesamt stellt der MAPK-Inhibitor CNI-1493 einen spannenden Wirkstoff zur Therapie der AD dar. Seine gleichzeitige Wirkung auf A β -Aggregate und auf neuroinflammatorische Stoffwechselwege in Verbindung mit positiven tierexperimentellen Ergebnissen stellt einen viel versprechenden Therapieansatz der AD dar. Deswegen erscheint den Autoren die weitere Charakterisierung von CNI-1493 sowie seiner Analoga interessant.

11 REFERENZEN

- Abell K, Bilancio A, Clarkson RW, Tiffen PG, Altaparmakov AI, Burdon TG, Asano T, Vanhaesebroeck B, Watson CJ, Stat3-induced apoptosis requires a molecular switch in PI(3)K subunit composition. *Nat Cell Biol* 7:392-398.2005.
- Accurso FJ, Moss RB, Wilmott RW, Anbar RD, Schaberg AE, Durham TA, Ramsey BW, Denufosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis and normal to mildly impaired lung function. *Am J Respir Crit Care Med* 183:627-634.2011.
- Acosta-Baena N, Sepulveda-Falla D, Lopera-Gomez CM, Jaramillo-Elorza MC, Moreno S, Aguirre-Acevedo DC, Saldarriaga A, Lopera F, Pre-dementia clinical stages in presenilin 1 E280A familial early-onset Alzheimer's disease: a retrospective cohort study. *Lancet Neurol* 10:213-220.2011.
- Akan P, Kizildag S, Ormen M, Genc S, Oktem MA, Fadiloglu M, Pregnenolone protects the PC-12 cell line against amyloid beta peptide toxicity but its sulfate ester does not. *Chem Biol Interact* 177:65-70.2009.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T, Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21:383-421.2000.
- Alvarez A, Cacabelos R, Sanpedro C, Garcia-Fantini M, Aleixandre M, Serum TNF-alpha levels are increased and correlate negatively with free IGF-I in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 28:533-536.2007.
- Alzheimer A, Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin* 146-148.1907.
- Ambroggio EE, Kim DH, Separovic F, Barrow CJ, Barnham KJ, Bagatolli LA, Fidelio GD, Surface behavior and lipid interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide 1-42: a membrane-disrupting peptide. *Biophys J* 88:2706-2713.2005.
- Anderson JJ, Holtz G, Baskin PP, Turner M, Rowe B, Wang B, Kounnas MZ, Lamb BT, Barten D, Felsenstein K, McDonald I, Srinivasan K, Munoz B, Wagner SL, Reductions in beta-amyloid concentrations in vivo by the gamma-secretase

- inhibitors BMS-289948 and BMS-299897. *Biochem Pharmacol* 69:689-698.2005.
- Annaert WG, Levesque L, Craessaerts K, Dierinck I, Snellings G, Westaway D, George-Hyslop PS, Cordell B, Fraser P, De Strooper B, Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons. *J Cell Biol* 147:277-294.1999.
- Araki W, Kitaguchi N, Tokushima Y, Ishii K, Aratake H, Shimohama S, Nakamura S, Kimura J, Trophic effect of beta-amyloid precursor protein on cerebral cortical neurons in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 181:265-271.1991.
- Arthur DB, Akassoglou K, Insel PA, P2Y2 receptor activates nerve growth factor/TrkA signaling to enhance neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19138-19143.2005.
- Arthur DB, Georgi S, Akassoglou K, Insel PA, Inhibition of apoptosis by P2Y2 receptor activation: novel pathways for neuronal survival. *J Neurosci* 26:3798-3804.2006.
- Avital A, Goshen I, Kamsler A, Segal M, Iverfeldt K, Richter-Levin G, Yirmiya R, Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity. *Hippocampus* 13:826-834.2003.
- Bacher M, Dodel R, Aljabari B, Keyvani K, Marambaud P, Kaye R, Glabe C, Goertz N, Hoppmann A, Sachser N, Klotsche J, Schnell S, Lewejohann L, Al-Abed Y, CNI-1493 inhibits Abeta production, plaque formation, and cognitive deterioration in an animal model of Alzheimer's disease. *J Exp Med* 205:1593-1599.2008.
- Bagchi S, Liao Z, Gonzalez FA, Chorna NE, Seye CI, Weisman GA, Erb L, The P2Y2 nucleotide receptor interacts with alpha5 integrins to activate Gq and induce cell migration. *J Biol Chem* 280:39050-39057.2005.
- Bamberger ME, Harris ME, McDonald DR, Husemann J, Landreth GE, A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J Neurosci* 23:2665-2674.2003.
- Bandyopadhyay S, Goldstein LE, Lahiri DK, Rogers JT, Role of the APP non-amyloidogenic signaling pathway and targeting alpha-secretase as an alternative drug target for treatment of Alzheimer's disease. *Curr Med Chem* 14:2848-2864.2007.

- Bartus RT, Dean RL, 3rd, Beer B, Lippa AS, The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217:408-414.1982.
- Beel AJ, Sanders CR, Substrate specificity of gamma-secretase and other intramembrane proteases. *Cell Mol Life Sci* 65:1311-1334.2008.
- Bell RD, Zlokovic BV, Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 118:103-113.2009.
- Bentahir M, Nyabi O, Verhamme J, Tolia A, Horre K, Wiltfang J, Esselmann H, De Strooper B, Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem* 96:732-742.2006.
- Bentham P, Gray R, Sellwood E, Hills R, Crome P, Raftery J, Aspirin in Alzheimer's disease (AD2000): a randomised open-label trial. *Lancet Neurol* 7:41-49.2008.
- Beutler B, Milsark IW, Cerami AC, Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229:869-871.1985.
- Bi XL, Yang JY, Dong YX, Wang JM, Cui YH, Ikeshima T, Zhao YQ, Wu CF, Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia. *Int Immunopharmacol* 5:185-193.2005.
- Bianchi M, Bloom O, Raabe T, Cohen PS, Chesney J, Sherry B, Schmidtmayerova H, Calandra T, Zhang X, Bukrinsky M, Ulrich P, Cerami A, Tracey KJ, Suppression of proinflammatory cytokines in monocytes by a tetravalent guanlylhydrazone. *J Exp Med* 183:927-936.1996.
- Bianchi M, Ulrich P, Bloom O, Meistrell M, 3rd, Zimmerman GA, Schmidtmayerova H, Bukrinsky M, Donnelley T, Bucala R, Sherry B, Manogue KR, Tortolani AJ, Cerami A, Tracey KJ, An inhibitor of macrophage arginine transport and nitric oxide production (CNI-1493) prevents acute inflammation and endotoxin lethality. *Mol Med* 1:254-266.1995.
- Bianchi ME, DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81:1-5.2007.
- Birks J, Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* CD005593.2006.
- Birks J, Harvey RJ, Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* CD001190.2006.
- Bjork L, Tracey KJ, Ulrich P, Bianchi M, Cohen PS, Akerlund K, Fehniger TE, Andersson U, Andersson J, Targeted suppression of cytokine production in

- monocytes but not in T lymphocytes by a tetravalent guanylylhydrazone (CNI-1493). *J Infect Dis* 176:1303-1312.1997.
- Black RA, Kronheim SR, Merriam JE, March CJ, Hopp TP, A pre-aspartate-specific protease from human leukocytes that cleaves pro-interleukin-1 beta. *J Biol Chem* 264:5323-5326.1989.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP, A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385:729-733.1997.
- Blacker D, Haines JL, Rodes L, Terwedow H, Go RC, Harrell LE, Perry RT, Bassett SS, Chase G, Meyers D, Albert MS, Tanzi R, ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease: the NIMH genetics initiative. *Neurology* 48:139-147.1997.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H, Alzheimer's disease. *Lancet* 368:387-403.2006.
- Bliss TV, Collingridge GL, A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.1993.
- Braak H, Braak E, Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-259.1991.
- Bu G, Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci* 10:333-344.2009.
- Burdick D, Kosmoski J, Knauer MF, Glabe CG, Preferential adsorption, internalization and resistance to degradation of the major isoform of the Alzheimer's amyloid peptide, A beta 1-42, in differentiated PC12 cells. *Brain Res* 746:275-284.1997.
- Burgos M, Neary JT, Gonzalez FA, P2Y2 nucleotide receptors inhibit trauma-induced death of astrocytic cells. *J Neurochem* 103:1785-1800.2007.
- Burnstock G, Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 7:575-590.2008.
- Burnstock G, Purinergic signalling: past, present and future. *Braz J Med Biol Res* 42:3-8.2009.
- Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A, Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* 40:668-688.1970.

- Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J, Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging* 23:655-664.2002.
- Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A, Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med* 7:548-554.2001.
- Cao X, Sudhof TC, A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293:115-120.2001.
- Castedo M, Ferri KF, Kroemer G, Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic. *Cell Death Differ* 9:99-100.2002.
- Chakrabarty P, Jansen-West K, Beccard A, Ceballos-Diaz C, Levites Y, Verbeeck C, Zubair AC, Dickson D, Golde TE, Das P, Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses Abeta deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. *FASEB J* 24:548-559.2010.
- Chakrabarty P, Jansen-West K, Beccard A, Ceballos-Diaz C, Levites Y, Verbeeck C, Zubair AC, Dickson D, Golde TE, Das P, Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses Abeta deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. *FASEB J* 24:548-559.2010.
- Chang KA, Suh YH, Possible roles of amyloid intracellular domain of amyloid precursor protein. *BMB Rep* 43:656-663.2010.
- Chen HS, Pellegrini JW, Aggarwal SK, Lei SZ, Warach S, Jensen FE, Lipton SA, Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J Neurosci* 12:4427-4436.1992.
- Chyung JH, Selkoe DJ, Inhibition of receptor-mediated endocytosis demonstrates generation of amyloid beta-protein at the cell surface. *J Biol Chem* 278:51035-51043.2003.
- Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, St George Hyslop P, Selkoe DJ, Mutant presenilins of Alzheimer's disease

- increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 3:67-72.1997.
- Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH, Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8:79-84.2005.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW, Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116:207-225.1977.
- Cohen PS, Nakshatri H, Dennis J, Caragine T, Bianchi M, Cerami A, Tracey KJ, CNI-1493 inhibits monocyte/macrophage tumor necrosis factor by suppression of translation efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3967-3971.1996.
- Cohen PS, Schmidtmayerova H, Dennis J, Dubrovsky L, Sherry B, Wang H, Bukrinsky M, Tracey KJ, The critical role of p38 MAP kinase in T cell HIV-1 replication. *Mol Med* 3:339-346.1997.
- Cohen S, Hurd E, Cush J, Schiff M, Weinblatt ME, Moreland LW, Kremer J, Bear MB, Rich WJ, McCabe D, Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 46:614-624.2002.
- Comalada M, Xaus J, Valledor AF, Lopez-Lopez C, Pennington DJ, Celada A, PKC epsilon is involved in JNK activation that mediates LPS-induced TNF-alpha, which induces apoptosis in macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C1235-1245.2003.
- Conde JR, Streit WJ, Microglia in the aging brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:199-203.2006.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA, Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-923.1993.
- Corrigan F, Pham CL, Vink R, Blumbergs PC, Masters CL, van den Heuvel C, Cappai R, The neuroprotective domains of the amyloid precursor protein, in traumatic brain injury, are located in the two growth factor domains. *Brain Res* 1378:137-143.2011.

- Craft JM, Watterson DM, Van Eldik LJ, Human amyloid beta-induced neuroinflammation is an early event in neurodegeneration. *Glia* 53:484-490.2006.
- Danysz W, Parsons CG, The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *Int J Geriatr Psychiatry* 18:S23-32.2003.
- Davies P, Maloney AJ, Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2:1403.1976.
- de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE, Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174:1209-1220.1991.
- Dheen ST, Kaur C, Ling EA, Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem* 14:1189-1197.2007
- Dinarello CA, Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 201:1355-1359.2005.
- Dotan I, Rachmilewitz D, Schreiber S, Eliakim R, van der Woude CJ, Kornbluth A, Buchman AL, Bar-Meir S, Bokemeyer B, Goldin E, Maaser C, Mahadevan U, Seidler U, Hoffman JC, Homoky D, Plasse T, Powers B, Rutgeerts P, Hommes D, A randomised placebo-controlled multicentre trial of intravenous semapimod HCl for moderate to severe Crohn's disease. *Gut* 59:760-766.2010.
- Dovey HF, John V, Anderson JP, Chen LZ, de Saint Andrieu P, Fang LY, Freedman SB, Folmer B, Goldbach E, Holsztynska EJ, Hu KL, Johnson-Wood KL, Kennedy SL, Kholodenko D, Knops JE, Latimer LH, Lee M, Liao Z, Lieberburg IM, Motter RN, Mutter LC, Nietz J, Quinn KP, Sacchi KL, Seubert PA, Shopp GM, Thorsett ED, Tung JS, Wu J, Yang S, Yin CT, Schenk DB, May PC, Altstiel LD, Bender MH, Boggs LN, Britton TC, Clemens JC, Czilli DL, Dieckman-McGinty DK, Droste JJ, Fuson KS, Gitter BD, Hyslop PA, Johnstone EM, Li WY, Little SP, Mabry TE, Miller FD, Audia JE, Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem* 76:173-181.2001.
- Drachman DA, Leavitt J, Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch Neurol* 30:113-121.1974.

- Drewes G, Ebner A, Mandelkow EM, MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem Sci* 23:307-311.1998.
- Elssner A, Duncan M, Gavrilin M, Wewers MD, A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. *J Immunol* 172:4987-4994.2004.
- Erdo SL, Schafer M, Memantine is highly potent in protecting cortical cultures against excitotoxic cell death evoked by glutamate and N-methyl-D-aspartate. *Eur J Pharmacol* 198:215-217.1991.
- Erlejman AG, Jaggars G, Fraga CG, Oteiza PI, TNFalpha-induced NF-kappaB activation and cell oxidant production are modulated by hexameric procyanidins in Caco-2 cells. *Arch Biochem Biophys* 476:186-195.2008.
- Esiri MM, Wilcock GK, Cerebral amyloid angiopathy in dementia and old age. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 49:1221-1226.1986.
- Etminan M, Gill S, Samii A, Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 327:128.2003.
- Fassbender K, Walter S, Kuhl S, Landmann R, Ishii K, Bertsch T, Stalder AK, Muehlhauser F, Liu Y, Ulmer AJ, Rivest S, Lentschat A, Gulbins E, Jucker M, Staufenbiel M, Brechtel K, Walter J, Multhaup G, Penke B, Adachi Y, Hartmann T, Beyreuther K, The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J* 18:203-205.2004.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M, Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112-2117.2005.
- Fiala M, Lin J, Ringman J, Kermani-Arab V, Tsao G, Patel A, Lossinsky AS, Graves MC, Gustavson A, Sayre J, Sofroni E, Suarez T, Chiappelli F, Bernard G, Ineffective phagocytosis of amyloid-beta by macrophages of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis* 7:221-232; discussion 255-262.2005.
- Fischer O, Miliare Nekrosen mit drusigen Wucherungen der Neurofibrillen, eine regelmässige Veränderung der Hirnrinde bei seniler Demenz. *Monatsschr Psychiat Neurol* 361-372.1907.

- Floden AM, Li S, Combs CK, Beta-amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor alpha and NMDA receptors. *J Neurosci* 25:2566-2575.2005.
- Forloni G, Mangiarotti F, Angeretti N, Lucca E, De Simoni MG, Beta-amyloid fragment potentiates IL-6 and TNF-alpha secretion by LPS in astrocytes but not in microglia. *Cytokine* 9:759-762.1997.
- Foster NL, Wilhelmsen K, Sima AA, Jones MZ, D'Amato CJ, Gilman S, Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. Conference Participants. *Ann Neurol* 41:706-715.1997.
- Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK, The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:137-147.1999.
- Fuller AD, Van Eldik LJ, MFG-E8 regulates microglial phagocytosis of apoptotic neurons. *J Neuroimmune Pharmacol* 3:246-256.2008.
- Fulop T, Larbi A, Hirokawa K, Mocchegiani E, Lesourds B, Castle S, Wikby A, Franceschi C, Pawelec G, Immunosupportive therapies in aging. *Clin Interv Aging* 2:33-54.2007.
- Gaur U, Aggarwal BB, Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 66:1403-1408.2003.
- Gery I, Waksman BH, Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s). *J Exp Med* 136:143-155.1972.
- Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, Eisner L, Kirby L, Rovira MB, Forette F, Orgogozo JM, Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 64:1553-1562.2005.
- Glenner GG, Wong CW, Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885-890.1984.
- Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA, Tau proteins and neurofibrillary degeneration. *Brain Pathol* 1:279-286.1991.
- Goshen I, Kreisel T, Ounallah-Saad H, Renbaum P, Zalstein Y, Ben-Hur T, Levy-Lahad E, Yirmiya R, A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology* 32:1106-1115.2007.

- Gozes I, Stewart A, Morimoto B, Fox A, Sutherland K, Schmechel D, Addressing Alzheimer's disease tangles: from NAP to AL-108. *Curr Alzheimer Res* 6:455-460.2009.
- Grathwohl SA, Kalin RE, Bolmont T, Prokop S, Winkelmann G, Kaeser SA, Odenthal J, Radde R, Eldh T, Gandy S, Aguzzi A, Staufenbiel M, Mathews PM, Wolburg H, Heppner FL, Jucker M, Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia. *Nat Neurosci* 12:1361-1363.2009.
- Green PS, Perez EJ, Calloway T, Simpkins JW, Estradiol attenuation of beta-amyloid-induced toxicity: a comparison o. *J Neurocytol* 29:419-423.2000.
- Greenamyre JT, Penney JB, D'Amato CJ, Young AB, Dementia of the Alzheimer's type: changes in hippocampal L-[3H]glutamate binding. *J Neurochem* 48:543-551.1987.
- Grethe S, Ares MP, Andersson T, Porn-Ares MI, p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-x(L). *Exp Cell Res* 298:632-642.2004.
- Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL, 3rd, Araoz C, Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7611-7615.1989.
- Griffiths M, Neal JW, Gasque P, Innate immunity and protective neuroinflammation: new emphasis on the role of neuroimmune regulatory proteins. *Int Rev Neurobiol* 82:29-55.2007.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI, Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4913-4917.1986.
- Gura T, Hope in Alzheimer's fight emerges from unexpected places. *Nat Med* 14:894.2008.
- Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ, Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 357:500-503.1992.
- Haass C, Selkoe DJ, Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101-112.2007.

- Hanger DP, Brion JP, Gallo JM, Cairns NJ, Luthert PJ, Anderton BH, Tau in Alzheimer's disease and Down's syndrome is insoluble and abnormally phosphorylated. *Biochem J* 275 (Pt 1):99-104.1991.
- Hardy J, Allsop D, Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12:383-388.1991.
- Hardy J, Selkoe DJ, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.2002.
- Haslam G, Wyatt D, Kitos PA, Estimating the number of viable animal cells in multi-well cultures based on their lactate dehydrogenase activities. *Cytotechnology* 32:63-75.2000.
- Hauss-Wegrzyniak B, Dobrzanski P, Stoehr JD, Wenk GL, Chronic neuroinflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer's disease. *Brain Res* 780:294-303.1998a.
- Hauss-Wegrzyniak B, Lukovic L, Bigaud M, Stoeckel ME, Brain inflammatory response induced by intracerebroventricular infusion of lipopolysaccharide: an immunohistochemical study. *Brain Res* 794:211-224.1998b.
- Hauss-Wegrzyniak B, Lynch MA, Vraniak PD, Wenk GL, Chronic brain inflammation results in cell loss in the entorhinal cortex and impaired LTP in perforant path-granule cell synapses. *Exp Neurol* 176:336-341.2002.
- Hauss-Wegrzyniak B, Vannucchi MG, Wenk GL, Behavioral and ultrastructural changes induced by chronic neuroinflammation in young rats. *Brain Res* 859:157-166.2000a.
- Hauss-Wegrzyniak B, Vraniak PD, Wenk GL, LPS-induced neuroinflammatory effects do not recover with time. *Neuroreport* 11:1759-1763.2000b.
- Henley DB, May PC, Dean RA, Siemers ER, Development of semagacestat (LY450139), a functional gamma-secretase inhibitor, for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother* 10:1657-1664.2009.
- Heutink P, Untangling tau-related dementia. *Hum Mol Gen* 9:979-986.2000.
- Hickey WF, Kimura H, Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239:290-292.1988.
- Higgins LS, Murphy GM, Jr., Forno LS, Catalano R, Cordell B, P3 beta-amyloid peptide has a unique and potentially pathogenic immunohistochemical profile in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* 149:585-596.1996.

- Hilbich C, Kisters-Woike B, Reed J, Masters CL, Beyreuther K, Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease. *J Mol Biol* 218:149-163.1991.
- Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, et al., Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324:73-76.1986.
- Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL, The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* 41:2502-2512.2005.
- Hou M, Moller S, Edvinsson L, Erlinge D, Cytokines induce upregulation of vascular P2Y(2) receptors and increased mitogenic responses to UTP and ATP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2064-2069.2000.
- Hunt AE, Lali FV, Lord JD, Nelson BH, Miyazaki T, Tracey KJ, Foxwell BM, Role of interleukin (IL)-2 receptor beta-chain subdomains and Shc in p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase and p54 MAP kinase (stress-activated protein Kinase/c-Jun N-terminal kinase) activation. IL-2-driven proliferation is independent of p38 and p54 MAP kinase activation. *J Biol Chem* 274:7591-7597.1999.
- Imbimbo BP, Giardina GA, gamma-secretase inhibitors and modulators for the treatment of Alzheimer's disease: disappointments and hopes. *Curr Top Med Chem* 11:1555-1570.2011.
- Itoh Y, Yamada M, Hayakawa M, Otomo E, Miyatake T, Cerebral amyloid angiopathy: a significant cause of cerebellar as well as lobar cerebral hemorrhage in the elderly. *J Neurol Sci* 116:135-141.1993.
- Iversen LL, Mortishire-Smith RJ, Pollack SJ, Shearman MS, The toxicity in vitro of beta-amyloid protein. *Biochem J* 311 (Pt 1):1-16.1995.
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y, Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13:45-53.1994.
- Jan A, Hartley DM, Lashuel HA, Preparation and characterization of toxic Abeta aggregates for structural and functional studies in Alzheimer's disease research. *Nat Protoc* 5:1186-1209.2010.

- Jiang Y, Mullaney KA, Peterhoff CM, Che S, Schmidt SD, Boyer-Boiteau A, Ginsberg SD, Cataldo AM, Mathews PM, Nixon RA, Alzheimer's-related endosome dysfunction in Down syndrome is Abeta-independent but requires APP and is reversed by BACE-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1630-1635.2010.
- Jin Z, El-Deiry WS, Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4:139-163.2005.
- Jones SA, Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 175:3463-3468.2005.
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R, APP processing and synaptic function. *Neuron* 37:925-937.2003.
- Kamer AR, Dasanayake AP, Craig RG, Glodzik-Sobanska L, Bry M, de Leon MJ Alzheimer's disease and peripheral infections: the possible contribution from periodontal infections, model and hypothesis. *J Alzheimers Dis* 13:437-449.2008.
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG, Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300:486-489.2003.
- Kayed R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE, Glabe CG, Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J Biol Chem* 279:46363-46366.2004.
- Kellerman D, Evans R, Mathews D, Shaffer C, Inhaled P2Y2 receptor agonists as a treatment for patients with Cystic Fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev* 54:1463-1474.2002.
- Kidd M, Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197:192-193.1963.
- Kinoshita A, Fukumoto H, Shah T, Whelan CM, Irizarry MC, Hyman BT, Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *J Cell Sci* 116:3339-3346.2003.
- Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Joshi BV, Jacobson KA, Kohsaka S, Inoue K, UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446:1091-1095.2007.

- Kong Q, Peterson TS, Baker O, Stanley E, Camden J, Seye CI, Erb L, Simonyi A, Wood WG, Sun GY, Weisman GA, Interleukin-1beta enhances nucleotide-induced and alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing in rat primary cortical neurons via up-regulation of the P2Y(2) receptor. *J Neurochem* 109:1300-1310.2009.
- Koshiba M, Apasov S, Sverdlov V, Chen P, Erb L, Turner JT, Weisman GA, Sitkovsky MV, Transient up-regulation of P2Y2 nucleotide receptor mRNA expression is an immediate early gene response in activated thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:831-836.1997.
- Kosik KS, Alzheimer's disease: a cell biological perspective. *Science* 256:780-783.1992.
- Kosik KS, A notable cleavage: winding up with beta-amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2574-2576.1999.
- Kosik KS, Duffy LK, Dowling MM, Abraham C, McCluskey A, Selkoe DJ, Microtubule-associated protein 2: monoclonal antibodies demonstrate the selective incorporation of certain epitopes into Alzheimer neurofibrillary tangles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:7941-7945.1984.
- Kowall NW, Beal MF, Glutamate-, glutaminase-, and taurine-immunoreactive neurons develop neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 29:162-167.1991.
- Kumar S, Boehm J, Lee JC, p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2:717-726.2003.
- Kurz A, Van Baelen B, Ginkgo biloba compared with cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia: a review based on meta-analyses by the cochrane collaboration. *Dement Geriatr Cogn Disord* 18:217-226.2004.
- Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.1970.
- LaFerla FM, Tinkle BT, Bieberich CJ, Haudenschield CC, Jay G, The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nat Genet* 9:21-30.1995.
- Lai MK, Tan MG, Kirvell S, Hobbs C, Lee J, Esiri MM, Chen CP, Francis PT, Selective loss of P2Y2 nucleotide receptor immunoreactivity is associated with Alzheimer's disease neuropathology. *J Neural Transm* 115:1165-1172.2008.

- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL, Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6448-6453.1998.
- Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenaabeele P, Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 14:44-55.2007.
- Last NB, Rhoades E, Miranker AD, Islet amyloid polypeptide demonstrates a persistent capacity to disrupt membrane integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:9460-9465.2011.
- Lawson LJ, Perry VH, Gordon S, Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 48:405-415.1992.
- Lee DH, Wang HY, Differential physiologic responses of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors to beta-amyloid1-40 and beta-amyloid1-42. *J Neurobiol* 55:25-30.2003.
- Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM, Nixon RA, Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141:1146-1158.2010.
- Lee SC, Dickson DW, Brosnan CF, Interleukin-1, nitric oxide and reactive astrocytes. *Brain Behav Immun* 9:345-354.1995.
- Lesne S, Kotilinek L, Ashe KH, Plaque-bearing mice with reduced levels of oligomeric amyloid-beta assemblies have intact memory function. *Neuroscience* 151:745-749.2008.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, Crowley AC,, Fu YH, Guenette SY, Galas D, Nemens E, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD, Tanzi RE, Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269:973-977.1995a.
- Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD, A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269:970-973.1995b.

- Li Y, Liu L, Barger SW, Griffin WS, Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *J Neurosci* 23:1605-1611.2003.
- Lichtenthaler SF, Ectodomain shedding of the amyloid precursor protein: cellular control mechanisms and novel modifiers. *Neurodegener Dis* 3:262-269.2006.
- Lichtenthaler SF, Alpha-Secretase Cleavage of the Amyloid Precursor Protein: Proteolysis Regulated by Signaling Pathways and Protein Trafficking. *Curr Alzheimer Res.*2011a.
- Lichtenthaler SF, Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem* 116:10-21.2011b.
- Lietzau G, Kowianski P, Karwacki Z, Dziewiatkowski J, Witkowska M, Sidor-Kaczmarek J, Morys J, The molecular mechanisms of cell death in the course of transient ischemia are differentiated in evolutionary distinguished brain structures. *Metab Brain Dis* 24:507-523.2009.
- Lin MT, Beal MF, Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787-795.2006.
- Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M, Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87:565-576.1996.
- Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, Jagger C, Martinez-Lage J, Soininen H, Hofman A, Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology* 54:S4-9.2000.
- Lopera F, Ardilla A, Martinez A, Madrigal L, Arango-Viana JC, Lemere CA, Arango-Lasprilla JC, Hincapie L, Arcos-Burgos M, Ossa JE, Behrens IM, Norton J, Lendon C, Goate AM, Ruiz-Linares A, Rosselli M, Kosik KS, Clinical features of early-onset Alzheimer disease in a large kindred with an E280A presenilin-1 mutation. *JAMA* 277:793-799.1997.
- Lorenzo A, Yankner BA, Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12243-12247.1994.
- Lowenberg M, Verhaar A, van den Blink B, ten Kate F, van Deventer S, Peppelenbosch M, Hommes D, Specific inhibition of c-Raf activity by

- semapimod induces clinical remission in severe Crohn's disease. *J Immunol* 175:2293-2300.2005.
- Lucas DR, Newhouse JP, The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 58:193-201.1957.
- Lynch G, Baudry M, The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science* 224:1057-1063.1984.
- Majno G, Joris I, Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146:3-15.1995.
- Mandelkow EM, Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol Aging* 24:1079-1085.2003.
- Maragos WF, Greenamyre JT, Penney Jr JB, Young AB, Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis. *Trends Neurosci* 10:65-68.1987.
- Martiney JA, Rajan AJ, Charles PC, Cerami A, Ulrich PC, Macphail S, Tracey KJ, Brosnan CF, Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by CNI-1493, a macrophage-deactivating agent. *J Immunol* 160:5588-5595.1998.
- Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK, Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci* 21:7046-7052.2001.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K, Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4245-4249.1985.
- Matsui T, Ingelsson M, Fukumoto H, Ramasamy K, Kowa H, Frosch MP, Irizarry MC, Hyman BT. Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1161:116-123.2007.
- Matsuyama S, Teraoka R, Mori H, Tomiyama T, Inverse correlation between amyloid precursor protein and synaptic plasticity in transgenic mice. *Neuroreport* 18:1083-1087.2007.
- Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ, Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 330:1774.2010.
- McGeer PL, McGeer EG, NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging* 28:639-647.2007.

- Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, Ungerer A, Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12683-12688.1998.
- Minano-Molina AJ, Espana J, Martin E, Barneda-Zahonero B, Fado R, Sole M, Trullas R, Saura CA, Rodriguez-Alvarez J, Soluble oligomers of amyloid-beta peptide disrupt membrane trafficking of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor contributing to early synapse dysfunction. *J Biol Chem* 286:27311-27321.2011.
- Mishra S, Mishra JP, Kumar A, Activation of JNK-dependent pathway is required for HIV viral protein R-induced apoptosis in human monocytic cells: involvement of antiapoptotic BCL2 and c-IAP1 genes. *J Biol Chem* 282:4288-4300.2007.
- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW, The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29:365-402.1989.
- Moore AH, Wu M, Shafteel SS, Graham KA, O'Banion MK, Sustained expression of interleukin-1beta in mouse hippocampus impairs spatial memory. *Neuroscience* 164:1484-1495.2009.
- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW, A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:982-985.2000.
- Morris M, Maeda S, Vessel K, Mucke L, The many faces of tau. *Neuron* 70:410-426.2011.
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M, Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-776.1986.
- Morrison SJ, Kimble J, Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441:1068-1074.2006.
- Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.1983.
- Mosser DM, Edwards JP, Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958-969.2008.
- Moynagh PN, The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain. *J Anat* 207:265-269.2005.

- Mudher A, Lovestone S, Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? Trends in neurosciences 25:22-26.2002.
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L, A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. Nat Genet 1:345-347.1992a.
- Mullan M, Houlden H, Windelspecht M, Fidani L, Lombardi C, Diaz P, Rossor M, Crook R, Hardy J, Duff K, Crawford F, A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1-antichymotrypsin gene. Nat Genet 2:340-342.1992b.
- Muller U, Winter P, Graeber MB, Alois Alzheimer's case, Auguste D., did not carry the N141I mutation in PSEN2 characteristic of Alzheimer disease in Volga Germans. Arch Neurol 68:1210-1211, author reply 1211.2011.
- Mutini C, Falzoni S, Ferrari D, Chiozzi P, Morelli A, Baricordi OR, Collo G, Ricciardi-Castagnoli P, Di Virgilio F, Mouse dendritic cells express the P2X7 purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation. J Immunol 163:1958-1965.1999.
- Nadler JV, Perry BW, Cotman CW, Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. Nature 271:676-677.1978.
- Neely KM, Green KN, Laferla FM, Presenilin Is Necessary for Efficient Proteolysis through the Autophagy-Lysosome System in a {gamma}-Secretase-Independent Manner. J Neurosci 31:2781-2791.2011.
- Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO, Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. Nat Med 9:448-452.2003.
- Nikisch G, Hertel A, Kiessling B, Wagner T, Krasz D, Hofmann E, Wiedemann G, Three-year follow-up of a patient with early-onset Alzheimer's disease with presenilin-2 N141I mutation - case report and review of the literature. Eur J Med Res 13:579-584.2008.
- Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DD, Tessier-Lavigne M, APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. Nature 457:981-989.2009.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F, Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science 308:1314-1318.2005.

- Nixon RA, Niemann-Pick Type C disease and Alzheimer's disease: the APP-endosome connection fattens up. *Am J Pathol* 164:757-761.2004.
- O'Shea JJ, Murray PJ, Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 28:477-487.2008.
- O'Sullivan AW, Wang JH, Redmond HP, The role of P38 MAPK and PKC in BLP induced TNF-alpha release, apoptosis, and NFkappaB activation in THP-1 monocyte cells. *J Surg Res* 151:138-144.2009.
- Ohsawa I, Takamura C, Kohsaka S, The amino-terminal region of amyloid precursor protein is responsible for neurite outgrowth in rat neocortical explant culture. *Biochem Biophys Res Commun* 236:59-65.1997.
- Oliver C, Holland AJ, Down's syndrome and Alzheimer's disease: a review. *Psychol Med* 16:307-322.1986.
- Olney JW, Sharpe LG, Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 166:386-388.1969.
- Opal SM, Endotoxins and other sepsis triggers. *Contrib Nephrol* 167:14-24.2010.
- Ott A, Breteler MM, van Harskamp F, Claus JJ, van der Cammen TJ, Grobbee DE, Hofman A, Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *BMJ* 310:970-973.1995.
- Palmada M, Centelles JJ, Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain. *Front Biosci* 3:d701-718.1998,.
- Palop JJ, Chin J, Mucke L, A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature* 443:768-773.2006.
- Park E, Velumian AA, Fehlings MG, The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *J Neurotrauma* 21:754-774.2004.
- Patel NS, Paris D, Mathura V, Quadros AN, Crawford FC, Mullan MJ, Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2:9.2005.
- Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV, Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312:724-729.1984.

- Perry EK, Gibson PH, Blessed G, Perry RH, Tomlinson BE, Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J Neurol Sci* 34:247-265.1977.
- Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E, Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 56:303-308.1999.
- Peterson TS, Camden JM, Wang Y, Seye CI, Wood WG, Sun GY, Erb L, Petris MJ, Weisman GA P2Y2 nucleotide receptor-mediated responses in brain cells. *Mol Neurobiol* 41:356-366.2010.
- Pfeifer M, Boncristiano S, Bondolfi L, Stalder A, Deller T, Staufenbiel M, Mathews PM, Jucker M, Cerebral hemorrhage after passive anti-Abeta immunotherapy. *Science* 298:1379.2002.
- Phinney AL, Calhoun ME, Wolfer DP, Lipp HP, Zheng H, Jucker M, No hippocampal neuron or synaptic bouton loss in learning-impaired aged beta-amyloid precursor protein-null mice. *Neuroscience* 90:1207-1216.1999.
- Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW, Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* 13:1676-1687.1993.
- Plant LD, Boyle JP, Smith IF, Peers C, Pearson HA, The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci* 23:5531-5535.2003.
- Ponte P, Gonzalez-DeWhitt P, Schilling J, Miller J, Hsu D, Greenberg B, Davis K, Wallace W, Lieberburg I, Fuller F, A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* 331:525-527.1988.
- Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, Flamez P, Dequenne A, Godaux E, van Leuven F, Fahrenholz F, A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113:1456-1464.2004.
- Price DL, Sisodia SS, Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu Rev Neurosci* 21:479-505.1998.

- Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J, Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 26:7212-7221.2006.
- Rankin CA, Sun Q, Gamblin TC, Tau phosphorylation by GSK-3beta promotes tangle-like filament morphology. *Mol Neurodegener* 2:12.2007.
- Ransohoff RM, Perry VH, Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119-145.2009.
- Reddy PH, Amyloid beta, mitochondrial structural and functional dynamics in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 218:286-292.2009.
- Revesz T, Holton JL, Lashley T, Plant G, Rostagno A, Ghiso J, Frangione B, Sporadic and familial cerebral amyloid angiopathies. *Brain Pathol* 12:343-357.2002.
- Rezaie P, Dean A, Male D, Ulfing N, Microglia in the cerebral wall of the human telencephalon at second trimester. *Cereb Cortex* 15:938-949.2005.
- Rio-Hortega, P., Penfield. W.. Cerebral cicatrix: the reaction of neuroglia and microglia to brain wounds, *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 41:278-303.1927.
- Riviere C, Richard T, Vitrac X, Merillon JM, Valls J, Monti JP, New polyphenols active on beta-amyloid aggregation. *Bioorg Med Chem Lett* 18:828-831.2008.
- Roch JM, Masliah E, Roch-Levecq AC, Sundsmo MP, Otero DA, Veinbergs I, Saitoh T, Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7450-7454.1994.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, Mar L, Sorbi S, Nacmias B, Piacentini S, Amaducci L, Chumakov I, Cohen D, Lannfelt L, Fraser PE, Rommens JM, ST George-Hyslop PH, Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376:775-778.1995.
- Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, Mohs R, Friedhoff LT, A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology* 50:136-145.1998.
- Roskam S, Neff F, Schwarting R, Bacher M, Dodel R, APP transgenic mice: the effect of active and passive immunotherapy in cognitive tasks. *Neurosci Biobehav Rev* 34:487-499.2010.

- Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ, Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 352:1992-2001.2005.
- Salminen A, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T, Inflammation in Alzheimer's disease: amyloid-beta oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors. *Prog Neurobiol* 87:181-194.2009.
- Sasaki H, Muramoto O, Kanazawa I, Arai H, Kosaka K, Iizuka R Regional distribution of amino acid transmitters in postmortem brains of presenile and senile dementia of Alzheimer type. *Ann Neurol* 19:263-269.1986.
- Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, Potter H, Heston LL, Martin GM, Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258:668-671.1992.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandever C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P, Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173-177.1999.
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S, Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2:864-870.1996.
- Schmitz C, Rutten BP, Pielen A, Schafer S, Wirths O, Tremp G, Czech C, Blanchard V, Multhaup G, Rezaie P, Korr H, Steinbusch HW, Pradier L, Bayer TA, Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 164:1495-1502.2004.
- Schneider LS, Dagerman KS, Higgins JP, McShane R, Lack of evidence for the efficacy of memantine in mild Alzheimer disease. *Arch Neurol* 68:991-998.2011.
- Sebire G, Emilie D, Wallon C, Hery C, Devergne O, Delfraissy JF, Galanaud P, Tardieu M, In vitro production of IL-6, IL-1 beta, and tumor necrosis factor-alpha by human embryonic microglial and neural cells. *J Immunol* 150:1517-1523.1993.

- Selkoe D, Kopan R, Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26:565-597.2003.
- Selkoe DJ, Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789-791.2002a.
- Selkoe DJ, Deciphering the genesis and fate of amyloid beta-protein yields novel therapies for Alzheimer disease. *J Clin Invest* 110:1375-1381.2002b.
- Selkoe DJ, Ihara Y, Salazar FJ, Alzheimer's disease: insolubility of partially purified paired helical filaments in sodium dodecyl sulfate and urea. *Science* 215:1243-1245.1982.
- Semmler A, Frisch C, Debeir T, Ramanathan M, Okulla T, Klockgether T, Heneka MT, Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol* 204:733-740.2007.
- Shaftel SS, Carlson TJ, Olschowka JA, Kyrkanides S, Matousek SB, O'Banion MK, Chronic interleukin-1beta expression in mouse brain leads to leukocyte infiltration and neutrophil-independent blood brain barrier permeability without overt neurodegeneration. *J Neurosci* 27:9301-9309.2007a.
- Shaftel SS, Kyrkanides S, Olschowka JA, Miller JN, Johnson RE, O'Banion MK, Sustained hippocampal IL-1 beta overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *J Clin Invest* 117:1595-1604.2007b.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH, Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754-760.1995.
- Shinozaki H, Konishi S, Actions of several anthelmintics and insecticides on rat cortical neurones. *Brain Res* 24:368-371.1970.
- Siemers ER, Quinn JF, Kaye J, Farlow MR, Porsteinsson A, Tariot P, Zoulnouni P, Galvin JE, Holtzman DM, Knopman DS, Satterwhite J, Gonzales C, Dean RA, May PC, Effects of a gamma-secretase inhibitor in a randomized study of patients with Alzheimer disease. *Neurology* 66:602-604.2006.

- Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S, Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 49:489-502.2006.
- Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K, Grabstein KH, Dower SK, Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6155-6159.1993.
- Singer, II, Scott S, Hall GL, Limjuco G, Chin J, Schmidt JA, Interleukin 1 beta is localized in the cytoplasmic ground substance but is largely absent from the Golgi apparatus and plasma membranes of stimulated human monocytes. *J Exp Med* 167:389-407.1988.
- Snyder SW, Lador US, Wade WS, Wang GT, Barrett LW, Matayoshi ED, Huffaker HJ, Krafft GA, Holzman TF, Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths. *Biophys J* 67:1216-1228.1994.
- Soehnlein O, Lindbom L, Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 10:427-439.2010.
- Solomon B Alzheimer's disease and immunotherapy. *Curr Alzheimer Res* 1:149-163.2004.
- Sondag CM, Dhawan G, Combs CK, Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia. *J Neuroinflammation* 6:1.2009.
- Sonntag KC, MicroRNAs and deregulated gene expression networks in neurodegeneration. *Brain Res* 1338:48-57.2010.
- Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE, Moir RD, The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One* 5:e9505.2010.
- Squire LR, Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99:195-231.1992.
- Srivastava KD, Rom WN, Jagirdar J, Yie TA, Gordon T, Tchou-Wong KM, Crucial role of interleukin-1beta and nitric oxide synthase in silica-induced inflammation and apoptosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 165:527-533.2002.

- Stein TD, Anders NJ, DeCarli C, Chan SL, Mattson MP, Johnson JA, Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. *J Neurosci* 24:7707-7717.2004.
- Stine WB, Jr., Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ, In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem* 278:11612-11622.2003.
- Streit WJ, Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci* 29:506-510.2006.
- Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS, Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation* 1:14.2004.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD, Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1977-1981.1993.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Jr., Eckman C, Golde TE, Younkin SG, An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264:1336-1340.1994a.
- Suzuki N, Iwatsubo T, Odaka A, Ishibashi Y, Kitada C, Ihara Y, High tissue content of soluble beta 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy. *Am J Pathol* 145:452-460.1994b.
- Swardfager W, Lanctot K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N, A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 68:930-941.2010.
- Swartz KR, Liu F, Sewell D, Schochet T, Campbell I, Sandor M, Fabry Z, Interleukin-6 promotes post-traumatic healing in the central nervous system. *Brain Res* 896:86-95.2001.
- Tamagno E, Bardini P, Guglielmotto M, Danni O, Tabaton M, The various aggregation states of beta-amyloid 1-42 mediate different effects on oxidative stress, neurodegeneration, and BACE-1 expression. *Free Radic Biol Med* 41:202-212.2006.
- Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL, Amyloid beta protein gene: cDNA,

- mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235:880-884.1987.
- Tariot PN, Solomon PR, Morris JC, Kershaw P, Lilienfeld S, Ding C, A 5-month, randomized, placebo-controlled trial of galantamine in AD. The Galantamine USA-10 Study Group. *Neurology* 54:2269-2276.2000.
- Tedde A, Nacmias B, Ciantelli M, Forleo P, Cellini E, Bagnoli S, Piccini C, Caffarra P, Ghidoni E, Paganini M, Bracco L, Sorbi S, Identification of new presenilin gene mutations in early-onset familial Alzheimer disease. *Arch Neurol* 60:1541-1544.2003.
- Thakker DR, Weatherspoon MR, Harrison J, Keene TE, Lane DS, Kaemmerer WF, Stewart GR, Shafer LL, Intracerebroventricular amyloid-beta antibodies reduce cerebral amyloid angiopathy and associated micro-hemorrhages in aged Tg2576 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4501-4506.2009.
- Thornton E, Vink R, Blumbergs PC, Van Den Heuvel C, Soluble amyloid precursor protein alpha reduces neuronal injury and improves functional outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Brain Res* 1094:38-46.2006.
- Tiraboschi P, Hansen LA, Thal LJ, Corey-Bloom J, The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology* 62:1984-1989.2004.
- Tobinick E, Gross H, Weinberger A, Cohen H, TNF-alpha modulation for treatment of Alzheimer's disease: a 6-month pilot study. *MedGenMed* 8:25.2006.
- Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC, Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* 70:1-32.2003.
- Udan ML, Ajit D, Crouse NR, Nichols MR, Toll-like receptors 2 and 4 mediate Abeta(1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line. *J Neurochem* 104:524-533.2008.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M, Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735-741.1999.

- Vaz AR, Silva SL, Barateiro A, Falcao AS, Fernandes A, Brito MA, Brites D, Selective vulnerability of rat brain regions to unconjugated bilirubin. *Mol Cell Neurosci* 48:82-93.2011.
- Vingtdeux V, Chandakkar P, Zhao H, d'Abramo C, Davies P, Marambaud P, Novel synthetic small-molecule activators of AMPK as enhancers of autophagy and amyloid-beta peptide degradation. *FASEB J* 25:219-231.2011.
- Vlad SC, Miller DR, Kowall NW, Felson DT, Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology* 70:1672-1677.2008.
- von Bernhardt R, Ramirez G, Toro R, Eugenin J, Pro-inflammatory conditions promote neuronal damage mediated by Amyloid Precursor Protein and decrease its phagocytosis and degradation by microglial cells in culture. *Neurobiol Dis* 26:153-164.2007.
- Wagner B, Natarajan A, Grunau S, Kroismayr R, Wagner EF, Sibilica M, Neuronal survival depends on EGFR signaling in cortical but not midbrain astrocytes. *EMBO J* 25:752-762.2006.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P, Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10:45-65.2003.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ, Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535-539.2002.
- Walter P, Johnson AE, Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 10:87-119.1994.
- Waragai M, Yamada T, Matsuda H, Evaluation of brain perfusion SPECT using an easy Z-score imaging system (eZIS) as an adjunct to early-diagnosis of neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* 260:57-64.2007.
- Washburn KB, Neary JT, P2 purinergic receptors signal to STAT3 in astrocytes: Difference in STAT3 responses to P2Y and P2X receptor activation. *Neuroscience* 142:411-423.2006.
- Weggen S, Rogers M, Eriksen J, NSAIDs: small molecules for prevention of Alzheimer's disease or precursors for future drug development? *Trends Pharmacol Sci* 28:536-543.2007.
- Wei W, Norton DD, Wang X, Kusiak JW, Abeta 17-42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis. *Brain* 125:2036-2043.2002.

- Weisman GA, Garrad RC, Erb LJ, Santos-Berrios C, Gonzalez FA, P2Y receptors in the nervous system: molecular studies of a P2Y2 receptor subtype from NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells. *Prog Brain Res* 120:33-43.1999.
- Weisman GA, Wang M, Kong Q, Chorna NE, Neary JT, Sun GY, Gonzalez FA, Seye CI, Erb L, Molecular determinants of P2Y2 nucleotide receptor function: implications for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes. *Mol Neurobiol* 31:169-183.2005.
- Wilkinson BL, Landreth GE, The microglial NADPH oxidase complex as a source of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 3:30.2006.
- Wisniewski KE, Wisniewski HM, Wen GY, Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann Neurol* 17:278-282.1985.
- Wolterbeek HT, van der Meer AJ, Optimization, application, and interpretation of lactate dehydrogenase measurements in microwell determination of cell number and toxicity. *Assay Drug Dev Technol* 3:675-682.2005.
- Wong CW, Quaranta V, Glenner GG, Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer disease are antigenically related. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:8729-8732.1985.
- Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI, Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4040-4043.1986.
- Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK, IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 101:311-320.1998.
- Yu CE, Marchani E, Nikisch G, Muller U, Nolte D, Hertel A, Wijsman EM, Bird TD, The N141I mutation in PSEN2: implications for the quintessential case of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 67:631-633.2010.
- Zhang C, Wu B, Beglopoulos V, Wines-Samuelson M, Zhang D, Dragatsis I, Sudhof TC, Shen J, Presenilins are essential for regulating neurotransmitter release. *Nature* 460:632-636.2009.
- Zhong M, Cheng GF, Wang WJ, Guo Y, Zhu XY, Zhang JT, Inhibitory effect of resveratrol on interleukin 6 release by stimulated peritoneal macrophages of mice. *Phytomedicine* 6:79-84.1999.

Zhu X, Rottkamp CA, Boux H, Takeda A, Perry G, Smith MA, Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:880-888.2000.

12 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Prof. Dr. Gerhard Aumüller; Prof. Dr. Peter Barth; Prof. Dr. Detlef Bartsch; Prof. Dr. Erika Baum; Prof. Dr. Thomas Behr; Prof. Dr. Roswitha Berger; Prof. Dr. Siegfried Bien; Prof. Dr. Frank Czubayko; Prof. Dr. Jürgen Daut; Prof. Dr. Richard Dodel; Prof. Dr. Rita Engenhardt-Cabillic; Prof. Dr. S. Fuchs-Winkelmann; Prof. Dr. Christian Görg; Prof. Dr. Michael Hertl; Prof. Dr. Rainer Hofmann; Prof. Dr. Joachim Hoyer; Prof. Dr. Volker Klingmüller; Prof. Dr. Klaus Jochen Klose; Prof. Dr. Jan Koolman; Prof. Dr. Roland Lill; Prof. Dr. Michael Lohoff; Prof. Dr. Rolf Felix Maier; Prof. Dr. Bernhard Maisch; Prof. Dr. Roland Moll; Prof. Dr. Rainer Moosdorf; Prof. Dr. Ulrich Müller; Prof. Dr. Andreas Neubauer; Prof. Dr. Wolfgang Hermann Oertel; Prof. Dr. Axel Frieder Pagenstecher; Prof. Dr. Harald Renz; Prof. Dr. Gerd Richter; Prof. Dr. Frank Rose; Prof. Dr. Matthias Rothmund; Prof. Dr. Steffen Ruchholtz; Prof. Dr. Helmut Schäfer; Prof. Dr. Stephan Schmidt; Prof. Dr. Andreas Sesterhenn; Prof. Dr. Walter Sekundo; Prof. Dr. Afshin Teymoortash; Prof. Dr. Claus Vogelmeier; Prof. Dr. Uwe Wagner; Prof. Dr. Eberhard Weihe; Prof. Dr. Jochen Werner; Prof. Dr. Hinnerk Wulf

13 DANKSAGUNG

Herzlich danken möchte ich Frau Dr. med. Carmen Nölker für die Überlassung des Themas sowie für ihre menschlich und wissenschaftlich stets hervorragende Betreuung und Förderung, alles Gute für eure Zeit zu dritt!

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Richard Dodel für die Bereitstellung eines guten und inspirierenden Umfeldes in der Arbeitsgruppe Neurologische Therapieforschung an der Klinik für Neurologie der Philipps-Universität Marburg,

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Michael Bacher für seine Unterstützung und Förderung in der Arbeitsgruppe Neurologische Therapieforschung,

Der gesamten Arbeitsgruppe Neurologische Therapieforschung für die anstrengende, lustige und inspirierende Zeit sowie alle dort entstandenen Freundschaften,

Meinen Eltern Elvira und Josef Sankowski für ihre große Liebe und Vertrauen, ihre Förderung in jeglicher Hinsicht und ihre Geduld. Auch wenn ich dachte, ich hätte etwas alleine geschafft, habt ihr mich doch dabei getragen.

Meiner Oma Elisa Schock, die immer Zeit für mich hat,

Meiner Schwester Olga, die Vorbild und Motivation für mich war,

Meinen Freunden von nah und fern und der „Baguette Runde“.

