

Aus der Klinik für Neurologie
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. W.H. Oertel
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Marburg

Die Rolle der Kynureninsäure bei der Alzheimer Demenz



Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
(Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Levke Steiner (geb. Sörensen)
aus Berlin

Marburg an der Lahn 2014

**Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
an der Lahn am 27.08.2014**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Schäfer

Referent: Prof. Dr. med. Richard Dodel

Korreferent: Prof. Dr. Carsten Konrad

1	Einleitung	6
1.1	Alzheimer Demenz.....	6
1.1.1	Epidemiologie.....	6
1.1.2	Pathogenese	6
1.1.3	Klinik und Diagnostik.....	10
1.2	Neuroinflammation - die Rolle der Mikroglia bei AD.....	13
1.3	Der alpha-7-nikotinerge Acetylcholinrezeptor	16
1.4	Bedeutung des Kynureninstoffwechselweges bei AD	18
1.5	Ziele der vorliegenden Arbeit	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Material.....	22
2.1.1	Verwendete Geräte	22
2.1.2	Verbrauchsmaterial	23
2.1.3	Chemikalien.....	24
2.1.4	Kommerziell erworbene Kits und Lösungen	26
2.1.5	Liste der verwendeten Medien und Zusätze.....	26
2.1.6	Puffer und Lösungen	27
2.1.7	Antikörper für Westernblots	28
2.1.7.1	Primärantikörper.....	28
2.1.7.2	Sekundärantikörper	28
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Zellkultivierung	28
2.2.1.1	Zelllinie	28
2.2.1.2	Zellkulturmedium	29
2.2.1.3	Kultivierung von BV-2 Zellen.....	29
2.2.2	Herstellung von A β -Fibrillen und A β -Oligomeren.....	30
2.2.2.1	Oligomere des A β	30
2.2.2.2	Fibrillen des A β	31
2.2.3	Thioflavin T-Assay	31

2.2.4	Kynureninsäure	31
2.2.5	Proteinextraktion	32
2.2.5.1	M-Per-Puffer	32
2.2.5.2	RIPA-Puffer.....	32
2.2.6	Verfahren zur Proteinkonzentrationsbestimmung.....	33
2.2.6.1	NanoDrop	33
2.2.6.2	Bicinchoninsäure (BCA)-Test.....	33
2.2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.2.8	Westernblot	34
2.2.9	MemCode.....	35
2.2.10	MTT-Test	36
2.2.11	NO-Assay	37
2.2.12	ELISA	37
2.2.12.1	Zytokin-ELISA.....	37
2.2.12.2	Kynureninsäure-ELISA	38
2.2.13	Durchflusszytometrie.....	39
2.2.13.1	Phagozytose von A β	39
2.2.13.2	Apoptose der BV-2 Zellen.....	40
2.2.14	Statistische Auswertung.....	40
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Darstellung von A β ₁₋₄₀ -Fibrillen und A β ₁₋₄₀ -Oligomeren.....	42
3.2	Nachweis des α 7 nikotineren Acetylcholinrezeptors	43
3.3	Einfluss der KA auf die Toxizität von A β ₁₋₄₀	44
3.3.1	MTT-Assay	44
3.3.2	Apoptose	45
3.4	Wirkung der KA auf Zytokin- und NO-Sekretion.....	47
3.4.1	TNF- α und IL-6	47
3.4.2	NO-Sekretion der BV-2 Zellen	49
3.5	Einfluss auf die Phagozytose.....	50
3.6	Kynureninsäure-ELISA	52

4	Diskussion.....	53
5	Zusammenfassung.....	60
6	Abstract.....	62
7	Literaturverzeichnis.....	64
8	Anhang.....	78
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	78
8.2	Abkürzungsverzeichnis.....	79
8.3	Verzeichnis meiner akademischen Lehrer.....	82
8.4	Publikation.....	82
8.5	Danksagung.....	83

1 Einleitung

1.1 Alzheimer Demenz

1.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2007 lag die weltweite Prävalenz von neurodegenerativen Demenzerkrankungen bei 29 Millionen und soll sich Schätzungen zufolge bis zum Jahr 2050 auf rund 106 Millionen Patienten erhöhen (Brookmeyer et al. 2007). Den größten Anteil davon hat mit ca. 70 % die Alzheimer Demenz (AD). Allein in Deutschland leiden aktuell rund 1,3 Millionen Menschen unter einer Demenzerkrankung. Der Erkrankungsgipfel der AD liegt zwischen dem 75. und 85. Lebensjahr. Nicht nur auf Grund der starken Belastung für die Patienten und deren Angehörigen, sondern auch aus gesundheitsökonomischen und volkswirtschaftlichen Gründen wird die Erkrankung immer weiter an Bedeutung gewinnen.

1.1.2 Pathogenese

Erstmals beschrieb Alois Alzheimer (1864-1915) im Jahr 1907 die Symptome der AD. Der Begriff der AD wurde aber erst von Emil Kraepelin im Jahr 1910 geprägt. Bei der Patientin Auguste Deter beobachtete Alois Alzheimer einen progredienten Gedächtnisverlust vereint mit Desorientierung, Halluzinationen und einer gestörten Sprachfunktion (Cipriani et al. 2011). Durch die Autopsie des Gehirns nach dem Tod der Patientin konnte er neben einer stark atrophierten Hirnrinde zwei weitere histopathologische Merkmale der AD feststellen: Neurofibrillen und senile Plaques. Auch aktuell ist das Vorhandensein von extrazellulären neuritischen Plaques und intrazellulären Neurofibrillenbündel pathognomonisch für die AD (Braak und Braak 1997). Während die Neurofibrillenbündel aus Tau-Protein bestehen, setzen sich die Plaques in erster Linie aus Amyloid- β ($A\beta$)-Ablagerungen zusammen (van Groen et al. 2006).

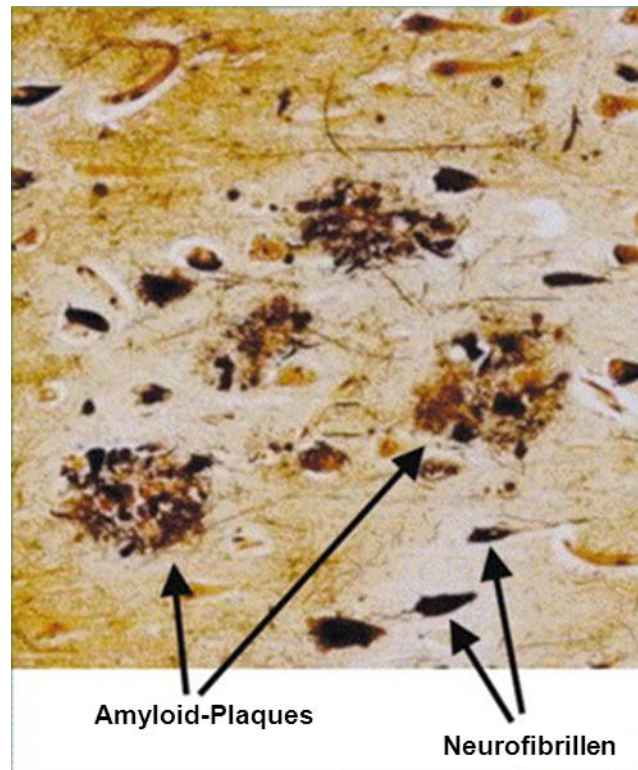


Abbildung 1: A β -Plaques und Neurofibrillen (Tangles)

Gezeigt sind die für AD pathognomonischen Korrelate: Extrazelluläre Amyloid-Plaques und die intrazellulären Neurofibrillen im Kortex eines AD Patientin [modifiziert nach (Blennow et al. 2006)].

Das Amyloid-Peptid entsteht aus einem Vorläuferprotein, dem Amyloid-Precursor-Protein (APP). Grundsätzlich kommen dabei zwei Möglichkeiten in Frage: der amyloidogene und der nicht-amyloidogene Weg (Abb. 2). Das APP zählt zu den Typ-I Transmembranproteinen, bei denen sich der Amino-Terminus an der Zellaußen- und der Carboxy-Terminus an der Zellinnenseite befinden (Bossy-Wetzel et al. 2004). In einem Zusammenspiel verschiedener Sekretasen wird APP in unterschiedliche Fragmente gespalten (Pietrzik und Behl 2005). Während der APP-Spaltung durch die α -Sekretase (nicht-amyloidogener Weg) entsteht zunächst sAPP α . In einem zweiten Schritt wird durch die γ -Sekretase das p3 und eine weitere intrazelluläre Domäne des APP (englisch: APP intracellular c-terminal domain, AICD) freigesetzt.

Im Rahmen des amyloidogenen Weges schneidet die β -Sekretase das sAPP β aus dem APP und anschließend setzt die γ -Sekretase ein 39 bis 42 Aminosäuren langes Peptid aus dem APP frei, das neurotoxische A β (Matsui et al. 2007). Auch bei diesem Weg wird AICD freigesetzt, dessen physiologische

Funktion noch ungeklärt ist. Kimberly et al. zeigen in *in vitro* Studien, dass AICD über die Rekrutierung der Histon-Deacetylase TIP60 einen Einfluss auf die Transkriptionsrate verschiedener, die Apoptose regulierende Gene hat (Kimberly et al. 2001). Des Weiteren kann AICD über die Komplexbildung mit Fe65 die Neurogenese hemmen (Zhou et al. 2011). sAPP α oder sAPP β sind kleine wasserlösliche Proteine mit bis zu 670 Aminosäureresten, deren Funktion einer endgültigen Klärung noch bedarf. Es existieren jedoch Daten, die dem sAPP α eine neuroprotektive und dem sAPP β über die Aktivierung von Caspase-6 eine neurotoxische Funktion zuweisen (Chow et al. 2010).

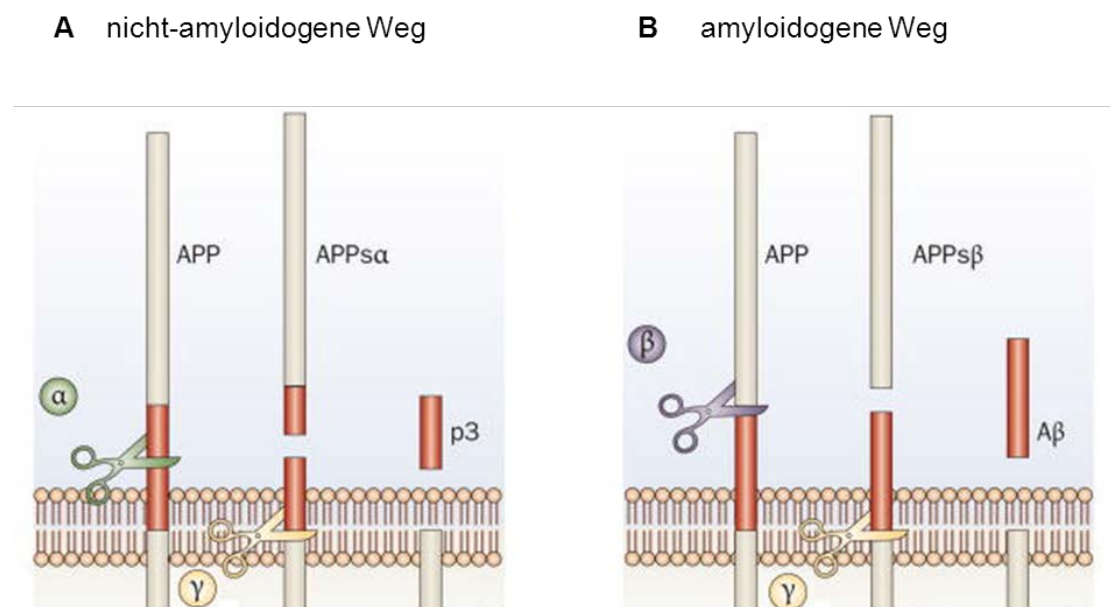


Abbildung 2: Der amyloidogene und nicht-amyloidogene Weg der APP-Spaltung [modifiziert nach (De Strooper et al. 2010)]

Der amyloidogene Weg beschreibt die Bildung von A β . Dabei wird das APP zunächst von der β -Sekretase und anschließend von der γ -Sekretase zu APPs β und zu A β gespalten. Beim nicht-amyloiden Weg spalten die α -Sekretase und danach die γ -Sekretase das APP. Resultat dieser Spaltung ist APPs α und p3. Bei beiden Wegen entsteht zusätzlich AICD.

Mutationen im APP-Gen (Zheng und Koo 2006) sowie in den Präsenilin-Genen 1 und 2, die Bestandteil des γ -Sekretase Komplexes sind (Hu et al. 2007), können ursächlich für eine familiäre AD sein. Nachweislich können diese Gene für Proteinprodukte der A β -Synthese codieren.

A β ist ein hydrophobes Peptid, welches über die Bildung von β -Faltblattstrukturen schnell aggregiert. Der Prozess der Aggregation geht dabei von Monomeren über kleinere zu größeren Oligomeren bis sich die A β -Peptide schließlich zu Fibrillen-Fasern zusammen lagern und die für die AD charakteristischen Plaques bilden (Aguzzi und O'Connor 2010).

Nach aktueller Studienlage sind vor allem die löslichen Oligomere neurotoxisch (Cleary et al. 2005; Mc Donald et al. 2010; O'Nuallain et al. 2011). Sie erzeugen eine Entzündungsreaktion, sind mitverantwortlich für vermehrten oxidativen Stress und für neuronalen Zelluntergang (Hardy und Selkoe 2002). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien unterstützen die These, dass nicht-fibrilläres A β , wie Di- und Trimere (niedere Oligomere), synaptotoxisch wirkt (Mc Donald et al. 2010). Durch die Bildung von Poren in die Zellplasmamembran kann A β in den Ca²⁺-Haushalt der Zellen eingreifen und somit ihr Gleichgewicht zerstören (Malchiodi-Albedi et al. 2011). Einen anderen Wirkmechanismus stellt die A β /Rezeptor-Bindung dar. Es ist bekannt, dass A β Affinität zu N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA-), Aminomethylphosphonsäure- (AMPA-) sowie zu nikotinergen Rezeptoren aufweist (Haass und Selkoe 2007). Diese Rezeptoren erlangen über Veränderungen im Ca²⁺- und Glutamatstoffwechsel eine Bedeutung bei der Langzeitpotenzierung von Gedächtnisinhalten. Außerdem übernehmen sie bei der Neuroinflammation eine bestimmende Rolle (siehe 1.3.). Des Weiteren wurde beschrieben, dass intrazelluläres A β über den p53/Bax vermittelten Apoptosesignalweg neurotoxisch wirkt (Culmsee et al. 2001; Zhang et al. 2002). Da das Tumorsuppressorgen p53 über Phosphorylierung aktiviert wird, wird angenommen, dass A β hier entweder eine Kinase induziert oder eine Phosphatase hemmt. Interessanterweise stellen in diesem Zusammenhang Zhang et al. die Hypothese auf, dass das intrazelluläre A β durch eine Kinaseaktivierung ebenfalls eine Rolle bei der Tau-Hyperphosphorylierung spielen könnte (Zhang et al. 2002).

Tau ist ein neuronales intrazelluläres Protein. Physiologisch bindet Tau durch seine positiv geladene Bindungsdomäne am Carboxy-Terminus negativ geladene Mikrotubuli (Mandelkow und Mandelkow 2012). Auf diese Weise

stabilisiert es das mikrotubuläre Netzwerk (Drubin und Kirschner 1986). Zudem spielt es eine Rolle beim axonalen Transport sowie bei der Funktionalität und Viabilität von Neuronen (Wang und Liu 2008).

Die Bindungsstärke des Tau-Proteins hängt vom jeweiligen Phosphorylierungsgrad ab. Dabei wird das Tau-Protein durch Kinasen (Cdk5, GSK3 β , MARK und ERK2) phosphoryliert. Dies kann zur Ablösung des Tau-Proteins und in dessen Folge zur Mikrotubuli-Depolymerisation führen. Demgegenüber stellt die Dephosphorylierung des Tau-Proteins, vermittelt durch verschiedenartige Phosphatasen (PP1, PP2A-C), die Bindungsfähigkeit zu Mikrotubuli wieder her (Duan et al. 2012). Pathologische Umstände wie Neuroinflammation, vermehrter oxidativer Stress, aber auch die A β -vermittelte Neurotoxizität führen zu einem Ungleichgewicht zwischen Kinasen- und Phosphatasenaktivität (Gotz et al. 2001). Auch im Rahmen der AD scheint das Verhältnis zu Gunsten der Kinasen verschoben zu sein (Zhang et al. 2002). Es kommt zu einer Hyperphosphorylierung der gepaarten helikalen Tau-Filamente (PHF) (Jameson et al. 1980). Die dadurch entstehenden veränderten Bindungseigenschaften können zu mikrotubulären Depolymerisation und somit zu Unterbrechungen des axonalen Transportes führen. Daraus resultieren neuronale Dysfunktionen und Degenerationen (Mandelkow und Mandelkow 2012). Als Folge dieser pathologischen Veränderungen werden die PHF-Ablagerungen als neurofibrilläre Läsionen in den Gehirnen von AD-Patienten beobachtet.

1.1.3 Klinik und Diagnostik

Charakteristisch für die AD ist die Entwicklung kognitiver Defizite. Beschwerden sind langsam progrediente Störungen der Merkleistung und der Wortfindung. Im Verlauf kommt es zusätzlich zu zeitlicher und örtlicher Desorientierung und zu Beeinträchtigungen weiterer kognitiver Bereiche wie dem Denkvermögen, der Aufmerksamkeit und auch dem Rechenvermögen. Alle diese Beeinträchtigungen der kognitiven Bereiche gemeinsam führen zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Aktivitäten des täglichen Lebens. Zusätzlich kann aus zunehmendem Krankheitsbewusstsein gerade zu Beginn der Erkrankung eine Depression resultieren. Die wohl meist zitierte Patientin ist

Auguste Deter. Als Alois Alzheimer die Patientin zum ersten Mal traf, saß diese hilflos auf ihrem Bett einer psychiatrischen Anstalt in Frankfurt. Sie zeigte sich verwirrt sowie örtlich und zeitlich nicht orientiert. Der Ehemann hatte schon seit einigen Monaten einen progressiven Gedächtnisverlust und Veränderungen in der Persönlichkeit seiner Frau festgestellt.

Sie begegnete ihm neuerdings mit Eifersucht, habe Ängste und Wahnvorstellungen. Der Zustand verschlechterte sich zunehmend. Aguste Deter verlor die Sprachfunktion und verbrachte die letzten Monate ihres Lebens apathisch meist liegend im Bett (Cipriani et al. 2011).

Nach den S3-Leitlinien erfolgt die Diagnosefindung eines demenziellen Syndroms nach den ICD-10 Kriterien (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme; (Jessen et al. 2009)). Maßgebend für die Diagnose ist einerseits ein progredienter Gedächtnisverlust im Sinne von Störungen in der Aufnahme, Speicherung und Wiedergabe neuer Informationen und andererseits die Abnahme kognitiver Leistungen, die eine Minderung des Ideenflusses und eine Beeinflussung des Urteilsvermögens erzeugen. Beides führt zu einer erheblichen Beeinträchtigung von Alltagsaktivitäten. Gemäß aktueller ICD-10 Kriterien müssen diese Symptome über mindestens sechs Monate bestehen bleiben. Ein wichtiges Ausschlusskriterium ist der Bewusstseinsverlust.

Die Alzheimer Demenz wird in den S3-Leitlinien weiter definiert als eine primär degenerative zerebrale Krankheit mit unbekannter Ursache und charakteristischen histopathologischen Merkmalen.

Im April 2011 veröffentlichten das „National Institute on Aging“ sowie die Alzheimer Association eine neue diagnostische Leitlinie. Im Vergleich zu den vorherigen Leitlinien wird heute das ganze Spektrum der Erkrankung berücksichtigt. Klinische und pathologische Veränderungen werden in drei Stadien eingeteilt: Präklinisches Stadium, Stadium milder kognitiver Beeinträchtigung und Stadium der Demenz (McKhann et al. 2011). Da Studien ergeben haben, dass pathologische Veränderungen nicht zwingend mit einer klinischen Symptomatik einhergehen (Tyas et al. 2007), wurde nunmehr die Notwendigkeit

einer Unterscheidung von pathologischen und klinischen Veränderungen berücksichtigt. Zur Differenzierung der Stadien können Biomarker wie A β und Tau-Protein im Liquor cerebrospinalis bestimmt werden.

Außerdem erweisen sich eine Positron-Emission-Tomographie (PET) mit FDG oder Amyloid-Tracern sowie eine Bildgebung durch eine Magnet-Resonanz-Therapie zur Diagnosestellung als hilfreich. Das präklinische Stadium definiert sich über eine Detektion von Biomarkern bei noch stummer Klinik. Die Arbeitsgruppe um Sperling et al. differenziert das präklinische Stadium der AD weiter in drei Phasen (Sperling et al. 2011). Zu Beginn steht die asymptomatische cerebrale Amyloidose mit erhöhter Amyloid-Tracer Retention in der PET und einer erniedrigten Konzentration des A β im Liquor. Die zusätzliche Neurodegeneration, welche z.B. mittels FDG oder MRT detektiert wird, bestimmt den Übergang zur zweiten Phase. Des Weiteren kann in diesem Stadium ein erhöhter Quotient aus Tau und phosphoryliertem Tau gemessen werden. Subtile kognitive Einschränkungen treten bei der dritten Phase hinzu, welche somit einen fließenden Übergang zur MCI darstellt. Treten klinisch kognitive Defizite auf, die jedoch die Aktivitäten des alltäglichen Lebens nicht beeinflussen, wird vom Stadium der milden kognitiven Beeinträchtigung (engl. Mild cognitive impairment, MCI) gesprochen (Dubois et al. 2010).

Vor allem dem präklinischen Stadium wird in der aktuellen Forschung große Bedeutung beigemessen (Morris 2005). Diese Phase bietet eine Gelegenheit für therapeutische Interventionen, wenn die Verbindung zwischen den pathophysiologischen Prozessen und der Entstehung der klinischen Symptomatik ausreichend geklärt ist (Sperling et al. 2011).

Bislang gibt es keine kausale Therapie. Es existieren allerdings einige Therapieansätze und eine Vielzahl klinischer Studien (Mangialasche et al. 2010). Nach aktuellen S3-Leitlinien stehen zur Therapie der AD die Acetylcholinesterase-Hemmer und der nichtkompetitive NMDA-Antagonist Memantin zur Verfügung (Jessen et al. 2009). Zur Verhinderung der mit AD assoziierten Neuroinflammation wurden AD-Patienten mit nicht-steroidalen Antirheumatika

behandelt. Dabei konnte kein positiver Effekt auf den Krankheitsverlauf festgestellt werden (Heneka et al. 2011). Als weitere Therapieoptionen werden die aktive und passive Immunisierung diskutiert und in Studien getestet (Dodel et al. 2010; Delrieu et al. 2012). Eine aktive Immunisierung zeigte zwar *in vivo* in transgenen Mäusen aussichtsreiche Effekte, jedoch kam es beim Menschen zu Meningoenzephalitiden (Gilman et al. 2005). Durch die humanisierten, monoklonalen Antikörper (Bapineuzumab und Solanezumab) konnte in einer klinischen Phase III Studie zwar eine Reduktion der A β -Plaques, aber keine signifikante Verbesserung der Kognition erreicht werden (Grundman et al. 2013).

1.2 Neuroinflammation - die Rolle der Mikroglia bei AD

Neben den oben beschriebenen histopathologischen Korrelaten spielt auch die Neuroinflammation eine bedeutende Rolle bei der AD. Neuroinflammation ist charakterisiert durch eine Gliazellaktivierung und die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (Zytokine) sowie von neurotoxischen freien Radikalen (NO). Ob die Neuroinflammation ein Auslöser oder eine Folge der Alzheimer Erkrankung darstellt, ist zum heutigen Zeitpunkt nicht endgültig geklärt (Solito und Sastre 2012). Jedoch konnte die Arbeitsgruppe um Herms et al. in einem transgenen Mausmodell zeigen, dass das Ausschalten eines mikroglialen Chemokinrezeptors vor neuronalem Zelluntergang schützt (Fuhrmann et al. 2010). Diesem Ergebnis folgt die These, dass die Neuroinflammation dem neuronalen Zelluntergang vorausgeht (Fuhrmann et al. 2010). Die Bedeutung der Neuroinflammation bei der AD wird allein durch die Lokalisation der Inflammation in Arealen mit hoher AD-Pathologie sichtbar. Diese zeigt sich besonders ausgeprägt im frontalen und im limbischen Cortex aber weniger deutlich im Kleinhirn (Krause und Muller 2010).

Mikrogliazellen sind residente Immuneffektorzellen des Zentralnervensystems (ZNS), die sich von Monozytenvorläuferzellen während der Embryogenese aus dem Mesoderm entwickeln (Lee und Landreth 2010). Aufgrund ihrer Fähigkeiten zur Phagozytose, zur Antigenpräsentation sowie zur amöboiden Fortbewegung zählen sie zum mononukleären phagozytären System. Sie sind für die initiale Immunantwort im ZNS verantwortlich

(Kreutzberg 1996). Ihre beachtliche Funktionsvarianz zeigt sich in ihrer Heterogenität. In Abhängigkeit der Umgebungssignale sind Mikrogliazellen in der Lage sich in verschiedene Aktivierungszustände zu transformieren (Aguzzi et al. 2013).

Vereinfacht dargestellt sind das die M1 und M2 Aktivierungszustände. Die M1-Mikroglia befinden sich im Zustand klassischer Aktivierung. Sie sind erkennbar durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und freier Radikale in Kombination mit einer verminderten Phagozytosefähigkeit. Daraus folgt die Induktion einer Entzündungsreaktion (Ravichandran 2003). Durch die Präsenz mikrobieller Reize, wie zum Beispiel das bakterielle Lipopolysaccharid (Sperling et al. 2011) wird über Toll-like Rezeptoren (TLRs) der M1-Subtyp angeregt (Sperling et al. 2011). Die M2-Mikroglia vereint hingegen verschiedene alternative Aktivierungszustände in sich. Induziert u.a. durch die Zytokine Interleukin-4 (IL), IL-10 und IL-13 wird die Endozytoseleistung der M2 Mikroglia gefördert (Martinez et al. 2008). Zudem ist die M2 in der Lage die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise des IL-1 β zu hemmen (Pelegriin und Surprenant 2009).

Die Rolle proinflammatorischer Zytokine bei der AD wird derzeit in der einschlägigen Literatur diskutiert. Es existieren Daten, die den proinflammatorischen Zytokinen sowohl neurotoxische als auch neuroprotektive Einflüsse zuschreiben (Cameron und Landreth 2010; Wee Yong 2010). Entscheidend ist wohl das Ausmaß der Produktion des jeweiligen Zytokins. Ein geringer Anstieg von Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) hat beispielsweise einen nützlichen Effekt (Sriram und O'Callaghan 2007). Diese neuroprotektive Wirkung scheint über die Akkumulation von Calcium und die Regulierung der Peroxidbildung vermittelt zu werden. Eine stark vermehrte Ausschüttung hingegen führt zu chronischer Neuroinflammation und Neurodegeneration.

In verschiedenen *in vitro* Experimenten wurde die Aktivierung von M1-Mikroglia durch A β -Fibrillen und A β -Oligomere untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass durch die Aktivierung der Mikroglia mit Fibrillen die TNF- α Produktion über den NF κ B Signalweg begünstigt wird (Combs et al. 2001).

Bianca et al zeigen, dass durch A β -Fibrillen stimulierte Mikroglia über die Aktivierung der Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) Oxidase vermehrt freie Sauerstoffradikale produzieren (Bianca et al. 1999). A β -Oligomere führen zu einer Erhöhung von Interleukin-6 (IL-6), NO und von Glutamat (Alberdi et al. 2010). Die vermehrte Freisetzung von Glutamat erzeugt wiederum eine stetige Aktivierung der NMDA-Rezeptoren (Pirttimaki et al. 2013). Dadurch entsteht ein andauernder Ca²⁺-Einstrom, der über mehrere Enzyme wie z.B. die Phospholipase zu einer Schädigung des Zytoskelettes sowie der DNS (Desoxyribonukleinsäure) und damit letztlich zur Apoptose führen kann. Carpenedo et al. konnten zeigen, dass ein Anstieg von Kynureninsäure (englisch: kynurenic acid, KA) über eine Hemmung der präsynaptischen alpha-7-nikotinergen-Acetylcholin-Rezeptoren (α 7nAChR) zu einem Abfall der extrazellulären Glutamatkonzentration führt (Carpenedo et al. 2001). Weiter konnte nachgewiesen werden, dass A β -Oligomere die Zellvitalität mikroglialer Zellen deutlich reduzieren (Bach et al. 2011).

Bei allen alternativen Aktivierungszuständen der M2-Mikroglia können sowohl die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen als auch eine gesteigerte Phagozytoseleistung nachgewiesen werden. So sind beispielsweise die M2-Mikrogliazellen, die das bei apoptotischen Zellen exponierte Phosphatidylserin mit ihren Phosphatidylserinrezeptoren erkennen, in der Lage, diese Zellen zu phagozytieren ohne dabei eine Entzündungsreaktion auszulösen (Ravichandran 2003). Diese „stille“ Phagozytose ist eine wichtige neuroprotektive Funktion der M2-Mikroglia (Neumann et al. 2009).

Ungefähr 80 % der Amyloid-Plaques sind unmittelbar von Mikroglia umgeben (Wisniewski et al. 1989). Diese Beobachtung wird in der Literatur durchaus kontrovers diskutiert: Aus neuroprotektiver Sicht ist die Mikroglia in der Lage, die vom A β ausgehende neurotoxische Wirkung zu mildern, indem sie A β phagozytiert. Auf der anderen Seite kann die stetige Präsenz von A β bei der AD zu einer permanenten M1-Mikrogliaaktivierung und in der Konsequenz zu einer chronischen Entzündung im ZNS führen (Cotman et al. 1996). In diesem Fall wäre das Gleichgewicht der verschiedenen Mikroglia-subtypen deutlich zum M1-Subtyp hin verschoben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Mikrogliazellen sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Funktionen erfüllen. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Abwehrfunktion und leiten Entzündungsprozesse ein. Diese Prozesse erzeugen über verschiedene Kaskaden eine Beseitigung mikrobieller Antigene und Zelldebris und führen zur Wiederherstellung der Homöostase im ZNS (Perry et al. 2010). Darüber hinaus können sie über verschiedene inflammatorische Zytokine und freie Radikale erhebliche Zellschäden und Neuronenverluste verursachen (Braak et al. 2006). Der Schlüssel einer funktionierenden Immunabwehr liegt sehr wahrscheinlich im gleichgewichtigen Zusammenspiel beider Funktionen.

1.3 Der alpha-7-nikotinerge Acetylcholinrezeptor

Bei der AD wird als ein weiteres Merkmal ein Nervenzelluntergang beschrieben. Die Intensität des Neuronenverlustes ist von dem zeitlichen Fortschreiten des Krankheitsgrades abhängig und differiert zudem erheblich zwischen den verschiedenen Gehirnregionen (Braak et al. 2006). Schädigungen der cholinergen Projektionen lassen sich im Hippocampus, im basalen Vorderhirn und vor allem im Nucleus basalis Meynert nachweisen (Whitehouse et al. 1982). In einem weit fortgeschrittenen Krankheitsstadium können bis zu 70 % der Neuronen im Nucleus basalis Meynert untergegangen sein (Arendt et al. 1983). Ein erheblicher Teil der cholinergen Innervation des Neokortex hat seine Ursprünge im basalen Vorderhirn und insbesondere im Nucleus basalis Meynert (Coyle et al. 1983). Darauf bezieht sich die cholinerge Hypothese der AD. Eine direkte Abhängigkeit zwischen den zentralen cholinergen Dysfunktionen und den kognitiven Störungen wird vermutet (Bartus et al. 1982).

Die Reduktion der nikotineren Acetylcholinrezeptoren als ein weiteres Merkmal der AD bekräftigt diese Hypothese (Kadir et al. 2006). Studien zeigen, dass der von peripheren Makrophagen exprimierte $\alpha 7nAChR$ eine entscheidende Rolle im sogenannten „cholinergic anti-inflammatory pathway“ einnimmt (Tracey 2007).

Der „cholinergic anti-inflammatory pathway“ reguliert systemische entzündliche Prozesse im peripheren Nervensystem (Wang et al. 2003). Dabei bildet der Nervus Vagus mit seinem Neurotransmitter Acetylcholin über den $\alpha 7$ nAChR den efferenten Arm des Signalweges (Tracey 2007).

In diesem Zusammenhang ist bedeutsam, dass der $\alpha 7$ nAChR physiologisch besonders in Gehirnregionen lokalisiert ist, die für das Lernen und die Gedächtnisinhalte zuständig sind, wie beispielsweise der Hippocampus und der Neokortex. Forschungsarbeiten belegen, dass die intrazelluläre Akkumulation von A β in Neuronen von AD-Patienten in einem Zusammenhang mit der Rezeptorexpression steht. Der $\alpha 7$ nAChR wird besonders von Neuronen exprimiert, die eine hohe intrazelluläre Akkumulation von A β aufweisen (Nagele et al. 2002).

Der $\alpha 7$ nAChR ist ein Pentamer, bestehend aus fünf $\alpha 7$ -Untereinheiten und ist als Ligandengesteuerter Ionenkanal selektiv permeabel für Natrium und Calcium (Seguela et al. 1993). Der Second Messenger Ca^{2+} führt bei erhöhtem Spiegel zu einer Hyperphosphorylation des Tau-Proteins. Neuronale *in vitro* Experimente zeigen, dass die A β - $\alpha 7$ nAChR-Komplexbildung eine intrazelluläre Erhöhung des Calciums hervorruft (Oddo et al. 2005). Wang et al. weisen nach, dass die A β - $\alpha 7$ nAChR-Interaktion einerseits über ERK MAPK- und JNK-1-MAPK-Aktivierung zu einer Tau-Phosphorylierung führt (Wang et al. 2003) und darüber hinaus den Zelltod über mehrere Signalkaskaden, beispielsweise über den ERK/MAPK-Signalweg und den JNK-Signalweg (Wang et al. 2004) induziert. Weitere *in vitro* Experimente ergaben, dass A β u.a. auch AKT aktiviert und die Aktivität apoptotischer Proteine, wie z.B. BAD, BAX und BCL2 kontrolliert (Buckingham et al. 2009). Andere Studien belegen, dass der $\alpha 7$ nAChR neben Neuronen und peripheren Makrophagen auch von Mikroglia exprimiert wird und an der Suppression neuroinflammatorischer Prozesse beteiligt ist (Shytle et al. 2004). Der $\alpha 7$ nAChR spielt bei der Modulation der verschiedenen mikroglialen Aktivierungszustände eine Rolle. Durch seine Aktivierung können überaktivierte und neuroinflammatorisch wirksame Mikroglia in neuroprotektiv wirksame Mikroglia transformiert werden (Suzuki et al. 2006). Wie bereits

weiter oben beschrieben, produzieren durch A β -Fibrillen stimulierte Mikrogliazellen über die Aktivierung der NADPH Oxidase vermehrt freie Sauerstoffradikale (ROS).

Die Arbeitsgruppe um Ju Hyun Moon präsentiert in einer Reihe von *in vitro* Experimenten, dass die mikrogliale Produktion von ROS durch die Stimulation mit Nikotin gehemmt werden kann (Moon et al. 2008). Interessanterweise wird dieser inhibitorische Effekt durch die Ko-Stimulation von α -Bungarotoxin, einem selektiven α 7nAChR-Antagonisten signifikant reduziert. Dieses Ergebnis und die Beobachtung, dass schon im Frühstadium der AD ein deutlicher Rückgang der nAChR erfolgt, heben die Bedeutung des α 7nAChR bei der AD hervor und könnten für einen therapeutischen Ansatz nützlich sein.

1.4 Bedeutung des Kynureninstoffwechselweges bei AD

Die Kynureninsäure (englisch: kynurenic acid, KA) entsteht im Kynureninstoffwechselweg (KS), der eine zentrale Rolle im Tryptophanabbauweg einnimmt. Dieser findet in Makrophagen, Mikroglia und zum Teil in Astrozyten statt (Guillemin et al. 2003). Zunächst wird Tryptophan über Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO) und über Deformylierung zu L-Kynurenin metabolisiert.

L-Kynurenin kann die Bluthirnschranke überwinden und bildet den Ursprung aller weiteren Metaboliten. So entsteht die KA irreversibel durch die Kynurenin-Aminotransferase I und II. Ein weiterer Abbauweg führt über Quinolinsäure (englisch: quinolinic acid, QA) zu NAD bzw. NADP. Wegen der Bildung von NAD bzw. NADP ist der KS an grundlegenden zellulären Prozessen beteiligt.

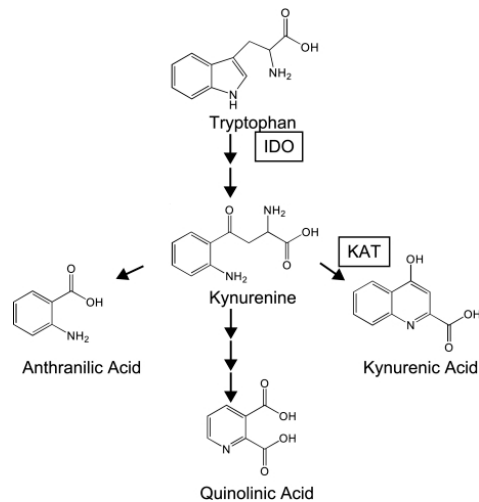


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Tryptophan-Abbauwegs

Tryptophan wird durch die IDO zu N-Formylkynurenin umgewandelt und anschließend zu Kynurenin deformyliert. Aus Kynurenin entsteht über die Aminotransferase I und II Kynureninsäure. Über alternative Abbauwege kann Kynurenin auch zu Quinolinsäure abgebaut werden, wobei Quinolinsäure eine NAD-Vorstufe darstellt (Barth et al. 2009).

Bei Neuroinflammation wird eine erhöhte IDO-Konzentration detektiert. Zytokine, wie $\text{TNF-}\alpha$, aktivieren den KS, indem sie die IDO stimulieren (Pemberton et al. 1997). Eine Überproduktion inflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise bei einer chronischen Entzündung, ist folglich mit einer vermehrten Bildung von QA assoziiert. Durch Stimulation humaner Mikrogliazellen mit A β verschiebt sich der KS ebenfalls in Richtung der QA-Synthese (Guillemin et al. 2003). Bei der AD wird QA von aktivierten Mikrogliazellen, Astrozyten und Makrophagen synthetisiert (Guillemin et al. 2005). Braidy et al. konnten neurotoxische Wirkungen der QA nachweisen: Durch eine Überstimulation des NMDA-Rezeptors kommt es zu Apoptose und Atrophien hippokampaler Neurone (Braidy et al. 2009). Mit der Förderung der Tau-Phosphorylierung in Neuronen durch hohe Konzentrationen der QA ist dieser Weg bei der AD von erheblicher Bedeutung (Rahman et al. 2009). Die KA wird zerebral von Astrozyten und Neuronen synthetisiert und ist in der Lage, die neurotoxischen Effekte der QA zu reduzieren (Vamos et al. 2009). Die KA gilt als Antagonist des $\alpha 7\text{nAChR}$ und hat als einziger endogener Antagonist des NMDA-Rezeptors eine besondere Stellung (Gulaj et al. 2010). Die neuroprotektiv wirkende KA schützt vor neuronalen Zellverlusten, indem sie beispielsweise die Glutamatfreisetzung über Inhibition des Rezeptors hemmt (Gulaj et al. 2010).

Dass bei der AD ein veränderter Kynureninsäurespiegel nachweisbar ist, konnte oft belegt werden. So wurde beispielsweise eine Ansammlung der KA im Nucleus caudatus und im Putamen beobachtet. Im Plasma, Serum sowie im Liquor fand man eine erniedrigte Konzentration im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen (Hartai et al. 2007; Gulaj et al. 2010). In einigen Studien wird eine Korrelation zwischen dem Aktivitätsniveau der IDO und kognitiven Defiziten beschrieben. Die IDO-Aktivität wird hier aus dem Verhältnis von Serumkynurenin zu Serumtryptophan errechnet. Bei der AD konnte ein erhöhter Quotient beobachtet werden: Dabei korreliert der Grad der Erhöhung mit dem Grad der kognitiven Beeinträchtigung (Gong et al. 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die KA-Konzentration im Plasma und der Quotient aus KA und Kynurenin positiv mit der kognitiven Funktion korreliert. Dabei wurde die kognitive Leistung mit Hilfe der Mini-Mental State Examination (MMSE) ermittelt (Gulaj et al. 2010). Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe nachweisen, dass die QA-Konzentration antiproportional zur Kognition korreliert. Hier wurde zur Testung der kognitiven Funktion der Uhrentest verwendet (Gulaj et al. 2010). Guillemin et al. stellen die These auf, dass je weiter fortgeschritten die Demenz ist, desto höher ist die QA-Konzentration in den senilen Plaques (Guillemin et al. 2007).

Diese signifikanten Veränderungen in Liquor, Plasma und Serum gemeinsam mit den oben genannten *in vitro* Beobachtungen lassen auf einen Zusammenhang des KS und AD schließen und bieten möglicherweise einen neuen therapeutischen Ansatz in der Therapie der AD.

1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit ist es anhand verschiedener *in vitro* Experimente an mikroglialen Zellen darzustellen, ob, beziehungsweise inwiefern die KA als endogener NMDA- und $\alpha 7$ nACh- Rezeptorantagonist Einfluss auf die Toxizität des A β ausübt.

Zu Beginn soll die Funktion der KA bei der Rezeptorexpression des $\alpha 7nAChR$ untersucht werden. Eine weitere Fragestellung bezieht sich auf die Wirkung der KA auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 und der chemischen Verbindung NO. Zur Beantwortung dieser Fragestellung dienen Zytokin-ELISAs und NO-Assays. Der Einfluss der KA auf die A β -induzierte Apoptose bzw. Viabilitätsreduktion soll anhand der Durchflusszytometrie und des MTTs detektiert werden. Des Weiteren sollen mit Hilfe der Durchflusszytometrie und der Immunoblot-Methode Versuche zur mikroglialen Phagozytose von A β durchgeführt werden. Auch bei diesen Experimenten steht der mögliche Einfluss der KA im Vordergrund. Im letzten Teil der Arbeit sollen mit Hilfe eines ELISAs mögliche Unterschiede der KA-Konzentration im Serum von AD-Patienten und einer Kontrollkohorte detektiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

Produktname /-beschreibung	Bezugsquelle / Hersteller
CO ₂ Inkubator CB210	Binder, Tuttlingen, Deutschland
ELISA-Reader Infinite® 200series	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Entwicklermaschine Optimax Typ TR	MS Laborgeräte, Heidelberg, Deutschland
Feinwaage ME 235S-OCE	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Flow Cytometer BD LSR II	Becton, Dickinson and Company, Franclin Lakes, USA
Gelektrophoresesystem XCell SureLock™ Mini Cell	Invitrogen™ Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
Geltransferkammer XCell II™ Blot Module CE Mark	Invitrogen™ Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
Heizblock PCH-2	Grant Instruments Ltd., Shepreth, England
Heizschüttler MKR 13	HLC BioTech, Bovenden, Deutschland
Magnetrührer MR Hei-Tec	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwalbach, Deutschland
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon, Tokio, Japan
Mikrozentrifuge Galaxy 16DH	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
Pipetten (Ein-/Mehrkanalmultipette)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetus accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Power Pac™ Universal power supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Röntgenkassette	Dupont, Bad Homburg, Deutschland
Scanner GS800 Calibrated Densitometer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Schüttler Unimax 1010	Heidolph, Kelheim, Deutschland

Sterilbank HERA safe®	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Ultraschallgerät Sonorex Super RK 31 H	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Vakuumpumpe Vario Air	Drägerwerk AG & Co. KG, Lübeck, Deutschland
Vortex-Schüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad SUB aqua	Grant Instrument Ltd., Cambridgeshire, Großbritannien
Zentrifuge Biofuge Stratos	Heraeus Instrument, Osterode, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Produktname /-beschreibung	Bezugsquelle / Hersteller
Cell scraper 25 cm	Sarstedt, Newton, USA
Cellstar® Zellkulturplatte 6, 12 und 24 Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Combitips plus 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
CryoPure Gefäß 1,8 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
ELISA-Platte Microlon, 96 Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
FACS Tubes Flow Cytometry 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falcon 15 und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Glasflaschen	Schott AG, Mainz, Deutschland
Latexhandschuhe Nobaglove®	Noba Verbandmittel Danz GmbH, Wetter, Deutschland
Low-bind Reagiergefäße 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Low-bind Reagiergefäße 0,5, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Microplatte FIA-Plate black, 96 Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
NuPage® 4-12% Bis-Tris Gel, Fertiggel	Invitrogen™ Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA

Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pipettenspitzen 10, 200 und 1000 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Protan® Nitrocellulose Transfer Membran, 0,2 µm	Whatman® GmbH (GE Healthcare), Dassel, Deutschland
Reagiergefäße 0,5, 1,5 und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röntgenfilm Clear Blue X-Ray	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
Rotilabo®-Blottingpapier	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Serologische Pipetten 5, 10 und 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Verbesserte Neubauer Zählkammer BLAUBRAND®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Zellkulturflasche 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

Produktname /-beschreibung	Bezugsquelle / Hersteller
Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Antioxidant NuPage®	Invitrogen™ Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
A β ₁₋₄₀	PSL, Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
Hoechst 33285	Invitrogen™ Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kynureninsäure	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
M-Per	Invitrogen™ Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
Thiazolyl blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Proteaseinhibitor Complete™	Roche Diagnostik, Mannheim, Deutschland
Reagent diluent Concentrate 2 (10x)	R & D Systems, Minneapolis, USA
Roti® Block	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure, 99,9 %	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
See Blue® 2 plus Protein Standard	Invitrogen™ Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), löslich	Calbiochem® (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
Thioflavin T	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
Trypsin EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Tween® 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Kommerziell erworbene Kits und Lösungen

Produktname /-beschreibung	Bezugsquelle / Hersteller
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit	eBioscience®, San Diego, USA
Entwicklerlösung	Agfa-Gevaert, Mortsch, BE
Human kynurenine ELISA Kit	Cusabio Biotech CO, Ltd, Newark, USA
Mem Code™ Reversible Protein Stain Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
mouse IL-6 ELISA DY 406	R & D Systems, Minneapolis, USA
mouse TNF-α ELISA DY 410	R & D Systems, Minneapolis, USA
NuPage® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen™ Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
NuPage® MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen™ Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
NuPage® Transfer Buffer (20x)	Invitrogen™ Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
Silver Express Staining Kit	Invitrogen™ Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
Super Block® Buffer in TBS	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate No. 34076	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA

2.1.5 Liste der verwendeten Medien und Zusätze

Produkt	Bezugsquelle / Hersteller
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high Glucose	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Fetal calf serum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
L-Glutamin	BioWhittaker®, Lonza, Veriers, Belgien
Penicillin/ Streptomycin	BioWhittaker®, Lonza, Veriers, Belgien

2.1.6 Puffer und Lösungen

FACS-Puffer

- PBS (1 L)
- FCS 0,1 % (1 ml/L)

Glycinpuffer ThT-Assay pH 9,2

- Glycin (50 mM)

Griess Reagenz 1

- Sulfanilamid (1 % in 5 % H₃PO₄)

Griess Reagenz 2

- N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid (0,1 %)

Kayed Puffer pH 7,4

- NaCl (100 mM)
- Tris (50 mM)

PBS, 10-fach pH 7,4

- NaCl (80,0 g/L)
- KCl (2,0 g/L)
- Na₂HPO₄ wasserfrei (14,4 g/L)
- KH₂PO₄ (2,4 g/L)

RIPA - Puffer

- Tris (10 mM)
- NaCl (150 mM)
- Triton X 100 (1 %)
- SDS (0,1 %)
- Deoxycholat (0,5 %)
- EDTA (5 mM)
- NaF (10 mM)

Stopplösung ELISA: 2N Schwefelsäure (5 %)

- H₂SO₄, rauchend (50 ml/L)

Waschlösung für den Westernblot

- PBS einfach (1 L)
- Tween (0,5 ml/L)

Für alle Puffer und Lösungen wurde deionisiertes Wasser (ddH₂O) verwendet.

2.1.7 Antikörper für Westernblots

2.1.7.1 Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle / Hersteller
β -Amyloid 6E10	1:2.000	Covance, Princeton ,USA
GAPDH	1:5.000	Novus-Biologicals, Littleton, USA
AChR α 7 sc5544	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
α -Tubulin	1:5.000	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland

2.1.7.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle/Hersteller
Goat-anti-mouse	1:10.000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Goat-anti-rabbit	1:7.000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

Alle Arbeiten fanden stets unter einer Sterilbank (Sterilbank HERA safe[®], Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland) statt. Zur Kultivierung wurden die Zellen in entsprechendem Medium in einer 75 cm² Zellkulturflasche bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Kontrolle der Morphologie, der Zelldichte, der Adhärenz und zum Ausschluss einer Kontamination wurden die Zellen mehrmals wöchentlich mikroskopisch begutachtet.

2.2.1.1 Zelllinie

Zelllinie	Zellart	Bezugsquelle
BV-2	immortalisierte murine mikrogliale Zellen	Prof. Jens Neumann, Magdeburg, Deutschland

2.2.1.2 Zellkulturmedium

Medium für BV-2 Zellen	Volumen
DMEM high Glucose	500 ml
FCS 10 %	50 ml
L-Glutamin 1 %	5 ml
Penicillin/ Streptomycin 1 %	5 ml
Endvolumen	560 ml

FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) muss vor der Verwendung im Medium im Wasserbad bei 56 °C für 30 Minuten inaktiviert werden. Das Medium wurde vor jeder Verwendung auf 37 °C erwärmt.

2.2.1.3 Kultivierung von BV-2 Zellen

Kryokonservierte BV-2 Zellen wurden im Wasserbad aufgetaut, mit 10 ml Medium in ein 50 ml Falcon überführt und anschließend bei 4 °C und bei 1000 rpm für vier Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 5 ml Medium vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit weiteren 13 ml Medium in einer Zellkulturflasche bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am darauffolgenden Tag fand ein Mediumwechsel statt.

Zunächst wurde der Überstand aus der Zellkulturflasche vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen, das anschließend ebenfalls abgesaugt wurde. Die Zellen wurden mit 1,5 ml Trypsin bei 37 °C für drei bis fünf Minuten inkubiert bis mikroskopisch eine Lösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu beobachten war. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 8,5 ml Medium verdünnt. Danach wurde die Flüssigkeit in ein 15 ml Falcon überführt und bei 1200 rpm bzw. 300 g für vier Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 7,5 ml Medium vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden zur Kultivierung in einer neuen Zellkulturflasche im Verhältnis 1:30 in 14 ml Medium verdünnt ausgesät und für Versuche in entsprechende Zellkulturplatten überführt. Dazu wurden zunächst 10 µl der Zellsuspension auf eine Neubauer Zählkammer

pipettiert, die Zellen mikroskopisch ausgezählt und anschließend entsprechend der Tabelle 11 Verdünnungen angefertigt. Um Verdunstungen zu vermeiden, wurden die Wells, die nicht für Versuche benötigt werden, mit PBS befüllt. Zudem wurden nach Möglichkeit nur die inneren Wells für Versuche verwendet. Nach einer Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ für 48 Stunden wurden die Zellen mit den entsprechenden Substanzen behandelt.

Zellkulturplatte	Anzahl der Zellen/Well	Volumen/Well
6-Well	100.000	2 ml
12-Well	70.000	1 ml
24-Well	40.000	0.5 ml

Zur Kryokonservierung von BV-2 Zellen werden diese mit Hilfe von Trypsin abgeerntet. Nach Verdünnung des Trypsins mit 8,5 ml Medium und Überführung der Zellsuspension in ein 15 ml Falcon wurden die Zellen bei 300 g für 4 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (FCS + 10 % DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen (CryoPure Gefäß 1,8 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert. Das Kryoröhrchen wird in einem Isopropanolring im -80 °C Gefrierschrank langsam (1 °C pro Minute) heruntergekühlt.

2.2.2 Herstellung von A β -Fibrillen und A β -Oligomeren

2.2.2.1 Oligomere des A β

Die Herstellung beruht auf dem Protokoll zur Oligomerisierung von A β nach Kaye (Kayed et al. 2003). Um eine Konzentration von 58 μ M zu erreichen, wurden 100 μ g A β ₁₋₄₀ in 30 μ l HFIP gelöst, mit 300 μ l Puffer und 70 μ l ddH₂O ergänzt und in einem Low-bind Reagiergefäß mit einem Rührfisch auf einem Magnetrührer (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwalbach, Deutschland) bei 1400 rpm für 48 Stunden inkubiert. Für eine langsame Evaporation des HFIPs wurde der Deckel des Reagiergefäßes zuvor mit fünf Löcher versehen. Um eine vollständige Entfernung des HFIPs zu erreichen, wurde das Reagiergefäß anschließend für 30 Minuten in einen Vakuumexsikator gestellt. Die entstandene Volumendifferenz wurde mit entsprechendem Puffer

ausgeglichen. Ein weiterer Ansatz ohne die Zugabe von A β ₁₋₄₀ diene als Negativkontrolle.

2.2.2.2 Fibrillen des A β

Zur Herstellung von Fibrillen wurde das Protokoll von Liu verwendet (Liu et al. 2011). Dabei wurden 100 μ g A β ₁₋₄₀ in 100 μ l dd H₂O in einem Low-bind Reagiergefäß gelöst und für sieben Tage bei 37 °C bei 650 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die Endkonzentration betrug 232 μ M.

2.2.3 Thioflavin T-Assay

Der Thioflavin T Assay (ThT) ist ein Verfahren zur Quantifizierung der Aggregation und Fibrillation von A β . Das Benzothiazol-Salz (4-(3,6-dimethyl-1,3-benzothiazol-3-ium-2-yl)-N,N-dimethylanilichlorid) ändert bei der Bindung an Amyloid-Fibrillen sein Fluoreszenzspektrum (LeVine 1993). Da die ThT-Moleküle spezifisch mit der cross- β Struktur der Fibrillen reagieren, ist dieses Nachweisverfahren nicht bei niedermolekularen Aggregationsformen (Monomere oder kleine Oligomere) anwendbar.

Die Durchführung beginnt mit der Überführung von 80 μ l Glycin-Puffer (50 nM, pH 9,2) je Well in eine schwarze 96 Well Platte. Anschließend wurden je 10 μ l der Probe und 10 μ l ThT-Lösung (Stockkonzentration: 2,5 mM, welche mit Glycinpuffer 1:125 verdünnt wird) in jedes Well pipettiert. Nach einer zweiminütigen Inkubationszeit konnte die Fluoreszenz bei einer Absorptionswellenlänge von 435 nm und einer Emissionswellenlänge von 485 nm mit dem Tecan-Reader (Infinite[®] 200series, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) gemessen werden. Die Verstärkung sollte so eingestellt werden, dass die negative Kontrolle ungefähr einen Wert von 100 hat.

2.2.4 Kynureninsäure

100 mg der Kynureninsäure (Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Deutschland) wurden in 2 ml DMSO verdünnt und in 50 μ l Aliquots (50 mg/ml) eingefroren. Die frisch aufgetaute Kynureninsäure (1 μ l) wurde zunächst wieder in DMSO (4 μ l) verdünnt, wohingegen alle weiteren Verdünnungsreihen mit PBS

durchgeführt wurden. Bei allen Versuchen wurde die Kynureninsäure stets eine halbe Stunde vor A β ₁₋₄₀ auf die Zellen gegeben.

2.2.5 Proteinextraktion

Zur Herstellung von Proteinlysaten fanden die beiden unten beschriebenen Methoden Verwendung. Beide Lysepuffer werden mit einem Proteaseinhibitor Complete™ (Roche Diagnostik, Mannheim, Deutschland) versetzt. Die Durchführung aller Vorgänge erfolgte auf Eis.

2.2.5.1 M-Per-Puffer

Dieser Puffer ermöglichte eine Proteinextraktion aus zytoplasmatischen und nuklearen Proteinen. Nachdem die Überstände abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen wurden, wurden die Zellen für vier Minuten mit 100 μ l M-Per (Invitrogen™ Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA) inkubiert und mittels Zell scraper vorsichtig gelöst. Anschließend wurden die jeweiligen Zellsuspensionen in Reagiergefäße überführt und bei 12000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurden die Überstände mit dem NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) gemessen (siehe 2.6.1).

2.2.5.2 RIPA-Puffer

Der RIPA-Puffer dient der Proteinextraktion von zytoplasmatischen, nuklearen und Membranproteinen. Nach Abnahme der Überstände wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde 100 μ l RIPA in jedes Well pipettiert und die Zellplatte zehn Minuten auf den Schüttler gestellt. Mit der Hilfe eines Zellkratzers (Sarstedt, Newton, USA) wurden die Zellen gelöst und die Zellsuspension in ein Reagiergefäß (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Die Reagiergefäße wurden für 30 Minuten auf Eis gestellt und alle fünf Minuten mit Hilfe des Vortex-Schüttler (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) gemischt. Anschließend wurde für zehn Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die entstandenen Überstände wurden in neue Reagiergefäße pipettiert und die Konzentrationen mit der BCA-Methode gemessen.

2.2.6 Verfahren zur Proteinkonzentrationsbestimmung

2.2.6.1 NanoDrop

Mithilfe des Spectrophotometers kann durch Lichtabsorptionsmessungen die Konzentration von Proteinen berechnet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden M-Per-Proteinlysate mit Hilfe des NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) bei 280 nm sowohl gemessen als auch ihre Konzentration berechnet. Bei allen anderen Proteinkonzentrationsbestimmungen wurde der unten beschriebene BCA-Test verwendet, da diese Methode nicht durch andere Detergenzien gestört wird.

2.2.6.2 Bicinchoninsäure (BCA)-Test

Grundlage dieses Tests ist die Biuret-Reaktion, der die Komplexbildung zwischen einem Protein und einem zweiwertigen Kupferion zugrunde liegt (Smith et al. 1985). Das Kupfer wird proportional zur Proteinkonzentration reduziert. In alkalischen Lösungen ist die Bicinchoninsäure in der Lage mit dem nun einwertigen Kupfer einen photometrisch detektierbaren intensiven violetten Farbkomplex zu bilden. Durch die Messung der Extinktion bei einer Absorption von 562 nm kann die Proteinkonzentration mittels einer Eichkurve berechnet werden. Die Testdurchführung mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit beginnt mit der Herstellung einer Standardreihe aus bovinem Serumalbumin und dem jeweiligem Lysepuffer. Je 25 µl von Standard bzw. Probe wurden in eine 96 Well Platte pipettiert und mit je 200 µl Arbeitslösung (aus Reagenz A und B aus dem Kit im Verhältnis 50:1) aufgefüllt. Die Platte wurde im Dunkeln 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend die Messung in einem Spektrophotometer (ELISA-Reader Infinite® 200series, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) bei 562 nm durchgeführt.

2.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine analytische Methode, bei der Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld getrennt werden (Laemmli 1970). Durch die Zugabe von SDS (Sodiumdodecylsulfat) und der Erhitzung der Proben auf 95 °C wurden die Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur aufgebrochen und das Protein denaturiert und entfaltet. Reduzierende Thiole wie das in dieser Arbeit verwendete Dithiothreitol (DTT)

sorgen für eine zusätzliche Spaltung der Disulfidbrücken. Das negativ geladene SDS bindet an die Proteine und bildet daher unabhängig von der Eigenladung der Proteine eine hohe negative Nettoladung des SDS-Proteinkomplexes, wobei ein gleiches „Ladung zu Masse Verhältnis“ hergestellt wird. Die Proteine werden also im elektrischen Feld unabhängig ihrer Ladung nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt.

In dieser Arbeit fanden die NuPage® Fertiggele (Invitogen™ Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA) Verwendung.

Die Proben wurden mit vierfach Probenpuffer (NuPage® LDS Sample Buffer) und DTT (10 % des Endvolumens) versetzt und fünf Minuten bei 95 °C gekocht, bevor sie in die jeweilige Geltaschen pipettiert wurden. Als Größensmarker wurden 5 µl des Sea Blue® 2 plus Protein Standard (Invitogen™ Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA) aufgetragen. Der Laufpuffer wurde aus NuPage® MES SDS Running Buffer (20 x) hergestellt und mit NuPage® Antioxidant (1:1.000) versetzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über 35 Minuten bei einer Spannung von 200 Volt. Zum Nachweis von Aβ-Oligomeren wurde die Oligomerlösung nicht gekocht (Zerstörung der Oligomerstruktur), sondern lediglich mit vierfachem Probenpuffer versetzt und direkt auf das Gel aufgetragen.

2.2.8 Westernblot

Bei der Immunoblot-Methode kommt es durch ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld zur Übertragung von den elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran (Burnette 1981). Zunächst wird 12,5 ml Transfer-Buffer (NuPage® Transfer Buffer (20x)) in 212,5 ml ddH₂O verdünnt und mit 25 ml Methanol und 250 µl NuPage® Antioxidant (1:1000) ergänzt. Zum Blotten wird die Geltransferkammer XCell II™ Blot Module CE Mark verwendet. Folgende Anordnung wurde beachtet:



Der Proteintransfer erfolgt bei 250 mA über eine Stunde.

Zur Verhinderung von unspezifischen Antikörperbindungen wurde die Membran in Rotiblock für eine Stunde auf einem Schüttler geschwenkt, bevor sie durch die Zugabe des ersten Antikörpers, verdünnt in 15 ml Rotiblock (siehe Antikörperliste), für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Im Anschluss folgten drei Waschschrirte á zehn Minuten mit PBST (=PBS versetzt mit 0,05 % Tween). Der für eine weitere Stunde auf die Membran gegebene Zweitantikörper, ebenfalls in 15 ml Rotiblock verdünnt, bindet an die Fc-Region des primären Antikörpers. Anschließend folgten wieder drei zehninütige Waschvorgänge mit PBST. Der sekundäre Antikörper ist an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt, die nach Zugabe des Luminols (Super Signal®, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) oxidiert und somit die Sichtbarkeit der Banden nach Auflage und Entwicklung (Entwicklermaschine Optimax Typ TR, MS Laborgeräte, Heidelberg, Deutschland) eines Röntgenfilms (Röntgenfilm Clear Blue X-Ray) ermöglicht.

2.2.9 MemCode

MemCode™ Reversible Protein Stain ist eine sensitive Methode, um Proteine auf einer Nitrozellulosemembran sichtbar zu machen. Dadurch kann ein effizienter Proteintransfer nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wird der MemCode™ Reversible Protein Stain Kit für Nitrozellulosemembran von Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford, USA) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.10 MTT-Test

Der MTT-Test diente zum Nachweis der Zellviabilität und beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids (MTT) in ein violettes, wasserunlösliches Formazan (Mosmann 1983). Mit einem Photometer kann die Absorption des entstandenen Formazan bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen werden. Dabei korreliert die gemessene Konzentration des Formazans mit dem Proliferationsverhalten der Zellen.

Nach der Stimulation und Inkubation der Zellen mit der Testsubstanz wurden die Überstände vorsichtig abgesaugt und neues Medium, das mit MTT in der Konzentration von 1 mg/ml versetzt wurde, auf die Zellen pipettiert und die Zellplatte lichtgeschützt für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Lyse erfolgt nach Abnahme der Überstände durch sofortige Zugabe von DMSO. Die Zellplatte wurde für ca. 30 Minuten unter Lichtschutz auf einen Schüttler gestellt, bis sich eine gleichmäßige blau-violette Färbung einstellte. Durch den Einsatz des Tecan-Readers (ELISA-Reader Infinite® 200series, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) wurde die Absorption bei 570 nm (Referenzfilter: 700 nm) gemessen. Bei der Auswertung wurden die unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt und die anderen in Relation in einem Balkendiagramm dargestellt.

2.2.11 NO-Assay

Die Bestimmung des Nitritgehaltes wurde spectrophotometrisch mit der Griess-Reaktion detektiert. Dies ist eine etablierte Methode (Green et al. 1982), die auf der Umsetzung von Griess-Reagenz mit Nitrit zu einem Diazofarbstoff beruht, dessen Absorption bei 550 nm gemessen werden kann.

Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit wurden je 50 µl der Überstände der Zellen in eine 96 Well Platte pipettiert. Anschließend wurden je 50 µl Sulfanilamid in 5 % H₂PO₄ hinzugefügt und für zehn Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurden 50 µl NED je Well dazugegeben. Nach zehnminütiger Inkubationszeit im Dunkeln wurden die Proben bei 550 nm gemessen. Als Standard wurde Nitrit verwendet.

2.2.12 ELISA

Ein Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren und beruht auf einer enzymatischen Farbreaktion. Zunächst wird eine 96 Well Mikrotiterplatte mit einem Antikörper (=capture antibody) beschichtet, der spezifisch an ein Epitop des Antigens der Probe bindet. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen wird die Mikrotiterplatte über Nacht mit SuperBlock inkubiert. Nach einer Inkubationszeit mit einem weiteren Antikörper (=detection antibody), der eine andere Stelle des Antigens erkennt, entsteht der für den Sandwich-ELISA namensgebende Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Zusätzlich ist dieser Antikörper an ein Enzym gekoppelt, das nach der Zugabe eines chromogenen Substrates für den photometrisch messbaren enzymatischen Farbumschlag sorgt.

2.2.12.1 Zytokin-ELISA

In dieser vorliegenden Arbeit wurden Sandwich-ELISAs zur Detektion von TNF- α und IL-6 verwendet. Die ELISA-Kits wurden alle von der Firma R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) bezogen. Auf jeden Schritt folgte, wenn nicht anders angegeben, ein dreimaliger Waschvorgang. Alle Vorgänge fanden bei Raumtemperatur statt. Der capture antibody wurde in steril filtriertem PBS verdünnt, so dass für TNF- α eine Konzentration von 0,8 µg/ml und für IL-6 von 2 µg/ml vorlag. Mit je 50 µl der entsprechenden Verdünnung

wurde eine 96 Well Platte (ELISA-Platte Microlon, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) beschichtet und bei Raumtemperatur 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Platte über Nacht mit 200 µl SuperBlock® (Thermo scientific, Waltham, MA, USA) je Well geblockt. Im Folgenden wurden 100 µl Probe als auch die Standardkurve aufgetragen und die Platte für zwei Stunden inkubiert. Um die für die Bestimmung von IL-6 und TNF-α notwendige Konzentration von 200 ng/ml des zweiten Antikörpers zu erhalten, wurde dieser in 1x Verdünnungslösung (Reagent Diluent von R&D) verdünnt und anschließend je 50 µl in die Wells gegeben. Nach zwei Stunden wurden 50 µl des Streptavidins hinzugefügt und 20 min unter Lichtschutz inkubiert. Im Folgenden werden 50 µl TMB (TMB, löslich, Calbiochem® (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland) in jedes Well pipettiert und die Platte 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 25 µl H₂SO₄ je Well gestoppt und die Absorption bei 450 nm (Referenz: 540 nm) mit dem ELISA-Reader (Infinite® 200series, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) gemessen.

2.2.12.2 Kynureninsäure-ELISA

Die Bestimmung der Serumkonzentrationen von KA erfolgte in Serumproben von 22 AD Patienten und 30 gesunden Kontrollen, die an der Klinik für Psychiatrie der Universität Bonn rekrutiert wurden. Dabei wurde die Diagnose einer wahrscheinlichen AD über die klinischen Kriterien des *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* und der *Alzheimer Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) (McKhann et al. 1984) sowie über die DSM-IV Kriterien des Alzheimer Typs erhoben. Gesunde Kontrollpersonen erreichten im Mini-Mental-State Examination (MMSE; (Folstein et al. 1975)) einen Wert von ≥ 27 Punkten. Des Weiteren wurden sie bei Fehlen neurodegenerativer und/oder anderer neurologischer Krankheitsbilder, schwerer Infektionskrankheiten, Immundefizits sowie nach Ausschluss einer malignen Tumorgenese als gesund deklariert. Ausschlusskriterien waren das Vorliegen von zerebralen vaskulären Läsionen, Alkoholabusus, symptomatischer Herz-, Lungen- und Nierenerkrankungen sowie eines insulinabhängigen Diabetes mellitus und unbehandelter Schild-

drüsenerkrankungen. Alle Studienteilnehmer gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Rekrutierung wurde von der humanen Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universitätsklinik Bonn genehmigt.

Für die Messung der Kynureninsäurekonzentration wurde das humane Kynureninsäure ELISAKit der Firma Cusabio Biotech co., Ltd., Newark, USA verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Die diesem Kit beigefügte Mikrotiterplatte ist bereits mit einem ersten Antikörper, der spezifisch gegen die Kynureninsäure ist, versehen. Pro Well wurden 100 µl Probe bzw. Standard hinzugefügt und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des mitgelieferten Biotin-Antikörpers dazugegeben und die Mikrotiterplatte für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 100 µl des HRP-Avidins (Horseradish Peroxidase) je Well pipettiert und die Platte erneut für eine Stunde in den Brutschrank gestellt. Vor der Zugabe von 90 µl TMB wurde der Waschvorgang fünfmal vollzogen. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion durch 50 µl Stopplösung beendet und die Absorption bei 450 nm (Referenz: 540 nm) mit dem ELISA-Reader (Infinite® 200series, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) gemessen.

2.2.13 Durchflusszytometrie

Mit der Methode der fluoreszenzmarkierten Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit zum einen die zelluläre Aufnahme von A β und zum anderen die Apoptose der BV-2 Zellen untersucht.

2.2.13.1 Phagozytose von A β

Nach der Stimulation der Zellen mit Fluorescein-Isothiocyanat markiertem A β (30 Min.) und KA (1 Std.) wurden die Zellen auf Eis gestellt und das Medium vorsichtig abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ wurde zur Loslösung der Zellen 700 µl PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ hinzugefügt. Nach fünf Minuten wurde die Zellsuspension in die FACS-Röhrchen überführt und mit kaltem FACS-Puffer aufgefüllt. Bei 1200 rpm und 4 °C wurden die Röhrchen fünf Minuten zentrifugiert, so dass sich die Zellen am Boden der Röhrchen sammelten. Der Überstand wurde vorsichtig

abgegossen und 100 µl eiskalter FACS-Puffer, der vorher mit HOECHST 33258 in einer Verdünnung von 1:400 versetzt wurde, hinzugegeben. Bevor die Proben mit einem Durchflusszytometer (Flow Cytometer BD LSR II, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) gemessen wurden, wurden diese kurz gevortext. Die Auswertung erfolgte mittels der FlowJo Software.

2.2.13.2 Apoptose der BV-2 Zellen

Auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle befindet sich Phosphatidylserin. Bei dem Vorgang der Apoptose wird das Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran transloziert, wo es von Annexin V erkannt und gebunden wird.

Für die Untersuchung der Apoptose der BV-2 Zellen nach der Stimulation mit Aβ und KA wird in dieser Arbeit das Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (eBioscience®, San Diego, USA) verwendet. Die Zellen wurden nach einer 24-stündigen Inkubationszeit auf Eis gestellt, einmal mit PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen und anschließend mit PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ für fünf Minuten inkubiert. Die Zellsuspension wurde in FACS-Röhrchen bei 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert, die Überstände vorsichtig verworfen und die Zellen in FACS-Puffer mit Fluorescein-Isothiocyanat markiertem Annexin (Verdünnung: 1:25) versehen. Die Proben wurden kurz gevortext und anschließend mit einem Durchflusszytometer (Flow Cytometer BD LSR II, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) gemessen. Die Auswertung erfolgt mittels der FlowJo Software.

2.2.14 Statistische Auswertung

Zur Detektion signifikanter Unterschiede von erhobenen Datensätzen fand der Student's *t*-Test Anwendung. Das Prinzip dieses Testverfahrens ist die Analyse von Unterschieden der empirisch gemessenen Mittelwerte zweier unabhängiger Variablen. Resultat ist der *p*-Wert, welcher als Maß für die Irrtumswahrscheinlichkeit gilt und mit steigender Signifikanz abnimmt. In dieser Arbeit wurden *p*-Werte < 0,05 als signifikant gewertet und mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Werte < 0,01 galten als sehr signifikant und wurden

mit zwei Sternen (**) hervorgehoben. Die erhobenen Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (englisch: standard deviation, SD) angegeben und fanden in Microsoft Excel Diagrammen (Microsoft Cooperation, Redmond, WA, USA) Darstellung.

3 Ergebnisse

3.1 Darstellung von A β ₁₋₄₀-Fibrillen und A β ₁₋₄₀-Oligomeren

Für alle Experimente wurde A β ₁₋₄₀ verwendet. Die Versuche zur Toxizität und zur Phagozytose wurden mit A β -Oligomeren nach dem Protokoll von Kaye durchgeführt (Kayed et al. 2003). Zum Nachweis des Oligomerisierungsprozesses wurde ein Western Blot verwendet (Abbildung 3).

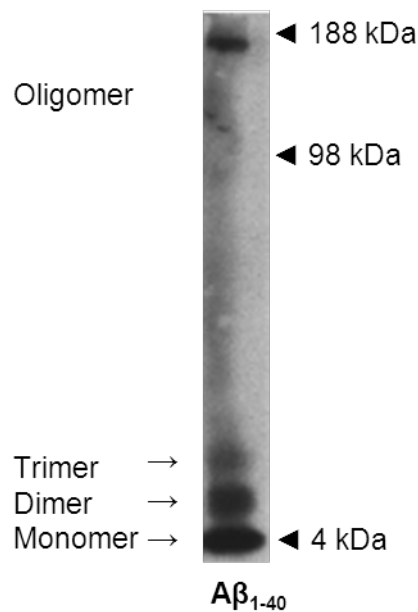


Abbildung 3: Darstellung von A β -Oligomeren durch die Western Blot Methode

Im abgebildeten Western Blot sind die verschiedenen Konformationen des A β dargestellt. Es wurde 0,25 μ g A β ₁₋₄₀ aufgetragen. Durch die Anwendung des Protokolls von Kaye konnten Oligomere hergestellt werden, die in der Mitte des Ausschnitts zu erkennen sind. Ganz unten sind Monomere, darüber die Fraktion der Di- und Trimere abgebildet.

Für die Experimente zur Untersuchung der Zytokinkonzentrationen und zur Messung der NO-Ausschüttung wurden die BV-2 Zellen mit A β -Fibrillen (Liu et al. 2011) behandelt. Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse im Thioflavin T-Assay. Deutlich zu erkennen ist, dass sich das nach dem Protokoll von Liu hergestellte A β ₁₋₄₀ zu Fibrillen aggregiert hat (linker Balken), wohingegen sich in der Negativkontrolle keine Fibrillen gebildet haben. Als Negativkontrolle wurde H₂O verwendet, welches ebenfalls für 7 Tage bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert wurde.

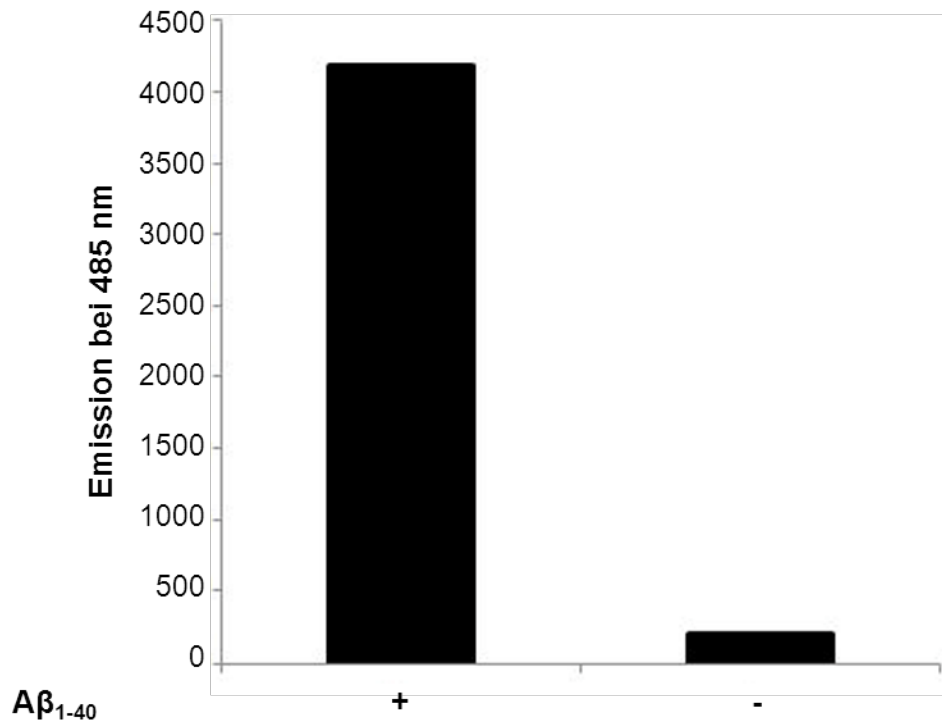


Abbildung 4: Thioflavin T Assay zur Darstellung von Aβ₁₋₄₀-Fibrillen.

Darstellung von Fibrillen des in Wasser gelösten Aβ₁₋₄₀ gegenüber der Wasserkontrolle. Beide wurden bei 37 °C und 650 rpm für 7 Tage auf einem Schüttler inkubiert.

3.2 Nachweis des α7 nikotinergen Acetylcholinrezeptors

Eine Fragestellung dieser Arbeit richtete sich auf die Regulierbarkeit der α7nACh Rezeptorexpression durch die KA. Dafür wurden BV-2 Zellen mit 5 μM Aβ₁₋₄₀ und verschiedenen Konzentrationen der KA inkubiert. Als Negativkontrolle wurde das Lysat von unbehandelten Zellen verwendet. Die Detektion des α7nACh Rezeptors erfolgte durch die Western Blot Methode über den polyklonalen Antikörper sc5544 gegen den C-Terminus des α7nACh Rezeptors. In der Abbildung 5 ist eine deutliche Bande bei 56 kDa zu erkennen. Resultierend kann festgehalten werden, dass der α7nACh Rezeptor von den BV-2 Zellen exprimiert wird. Allerdings zeigt sich in der Konzentrationsreihe keine Regulation des Rezeptors nach Gabe von KA und Aβ.

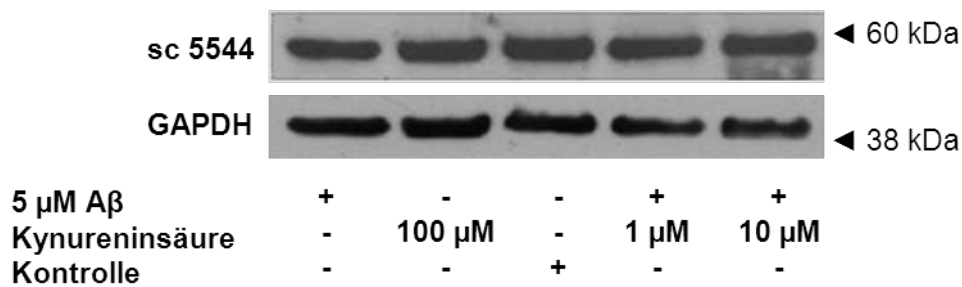


Abbildung 5: Expression von $\alpha 7nAChR$ in $A\beta_{1-40}$ und KA behandelten BV-2 Zellen

Die Lysate von BV-2 Zellen wurden nach deren Stimulation mit $A\beta_{1-40}$ und KA auf NuPage® Fertiggelen (Invitrogen™ Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA) aufgetrennt, geblottet und mit dem Antikörper sc5544 gegen den $\alpha 7nAChR$ Rezeptor inkubiert. Zur Größenbestimmung wurde 5 μl Sea Blue® 2 plus Protein Standard (Invitrogen™ Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA) aufgetragen.

3.3 Einfluss der KA auf die Toxizität von $A\beta_{1-40}$

Wie unter 1.2. und 1.3. detailliert beschrieben, spielt der $\alpha 7nAChR$ eine bedeutende Rolle im „cholinergic anti-inflammatory pathway“, übernimmt die aktivierte Mikroglia eine entscheidende Funktion bei der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und kann $A\beta_{1-40}$ über verschiedene Signalkaskaden am $\alpha 7nAChR$ den Zelltod induzieren. Die Tatsache, dass die KA ein endogener Antagonist dieses Rezeptors ist, lässt die Frage aufkommen, inwieweit die KA die Toxizität des $A\beta$ beeinflusst. Aufschluss darüber sollten ein MTT-Assay für die Detektion der Zellviabilität sowie eine fluoreszenzmarkierte Durchflusszytometrie zur Untersuchung des Apoptoseverhaltens geben.

3.3.1 MTT-Assay

Zur Durchführung des MTT-Assays wurden die BV-2 Zellen mit $A\beta_{1-40}$, hergestellt nach dem Protokoll von Kaye (Kaye et al. 2003), und KA behandelt und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. In dem in Abbildung 6 gezeigten Balkendiagramm ist als Maß für die Zellviabilität die prozentuale Absorption bei 570 nm (Referenzfilter: 700 nm) in Relation zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Es ist zwar eine um 50 % gesenkte Zellviabilität der mit 20 μM $A\beta_{1-40}$ stimulierten Zellen zu erkennen, jedoch ist keine signifikante Veränderung durch die Zugabe von 1 μM KA zu beobachten. Isolierte Stimulation mit 1 μM KA zeigte in diversen unabhängigen Experimenten keinen Effekt auf die Zellviabilität mikroglialer Zellen (Daten nicht gezeigt).

Vergleichbare Ergebnisse wurden nach Stimulation und 24-stündiger Inkubation bei 37 °C mit anderen Agonisten (10 µM Nikotin, 1 µM PNU-282987) und Antagonisten (10 µM α -Bungarotoxin, 1 µM Methyllycaconitine) des α 7nAChR erzielt (Daten nicht gezeigt). Es konnte bei keinem Versuch mit Agonist bzw. Antagonist des Rezeptors eine signifikante Veränderung der Zellviabilität festgestellt werden.

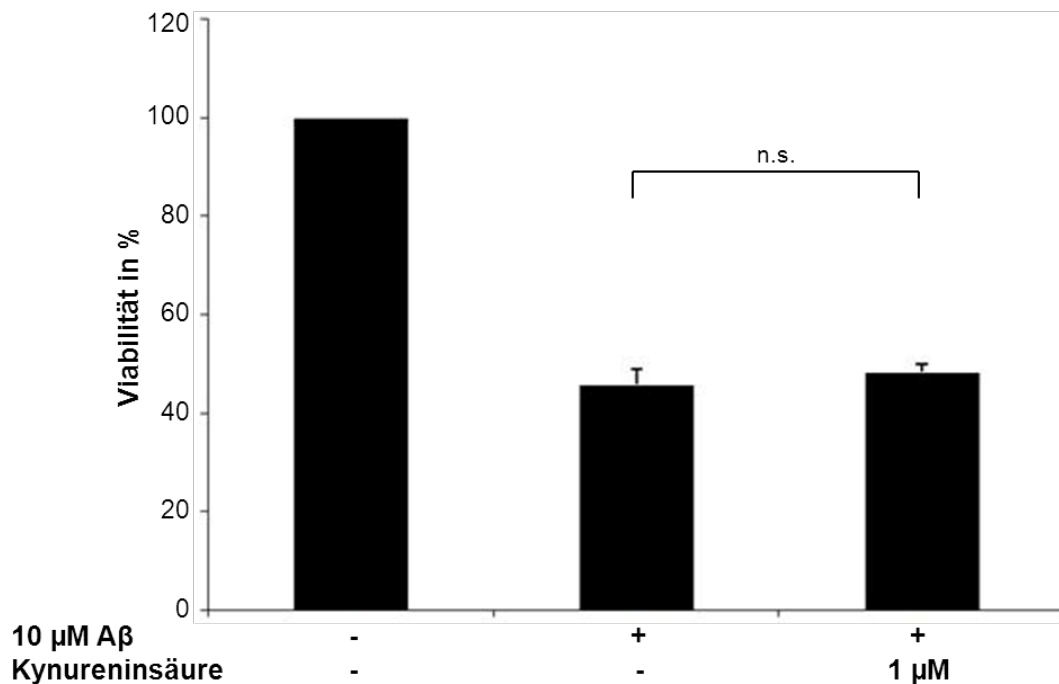


Abbildung 6: Zellviabilität von mit Aβ₁₋₄₀ und KA behandelten BV-2 Zellen

MTT-Test von BV-2 Zellen, die mit Aβ₁₋₄₀ und KA für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Im vorliegenden Balkendiagramm sind die unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt und die anderen in Relation zu diesen dargestellt. Abgebildet ist der Mittelwert aus drei Experimenten, die jeweils mit Doppelbestimmungen erfolgten. Als Fehler ist die Standardabweichung (\pm SD) angegeben.

3.3.2 Apoptose

Um den Einfluss von KA auf die von Aβ₁₋₄₀ verursachte Toxizität mit einer zweiten Methode zu untersuchen, wurde eine Apoptosedetektion mittels Annexin V-Markierung durchgeführt. Diese Methode erlaubt eine Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Zellen. Die Auswertung erfolgte mit der Flow Jo Software. In einem ersten Versuch sollte untersucht werden, ob eine konzentrationsabhängige Reduktion der Apoptoserate durch die KA beobachtet werden kann (Abbildung 7A).

Da die effektivste Senkung der durch A β_{1-40} verursachten Apoptose der BV-2 Zellen mit 1 μ M KA erreicht werden konnte, wurde der Versuch mit dieser Konzentration wiederholt. Das Ergebnis aus drei Versuchen ist in Abbildung 7B dargestellt. Es konnte eine signifikante Reduktion der Apoptoserate festgestellt werden.

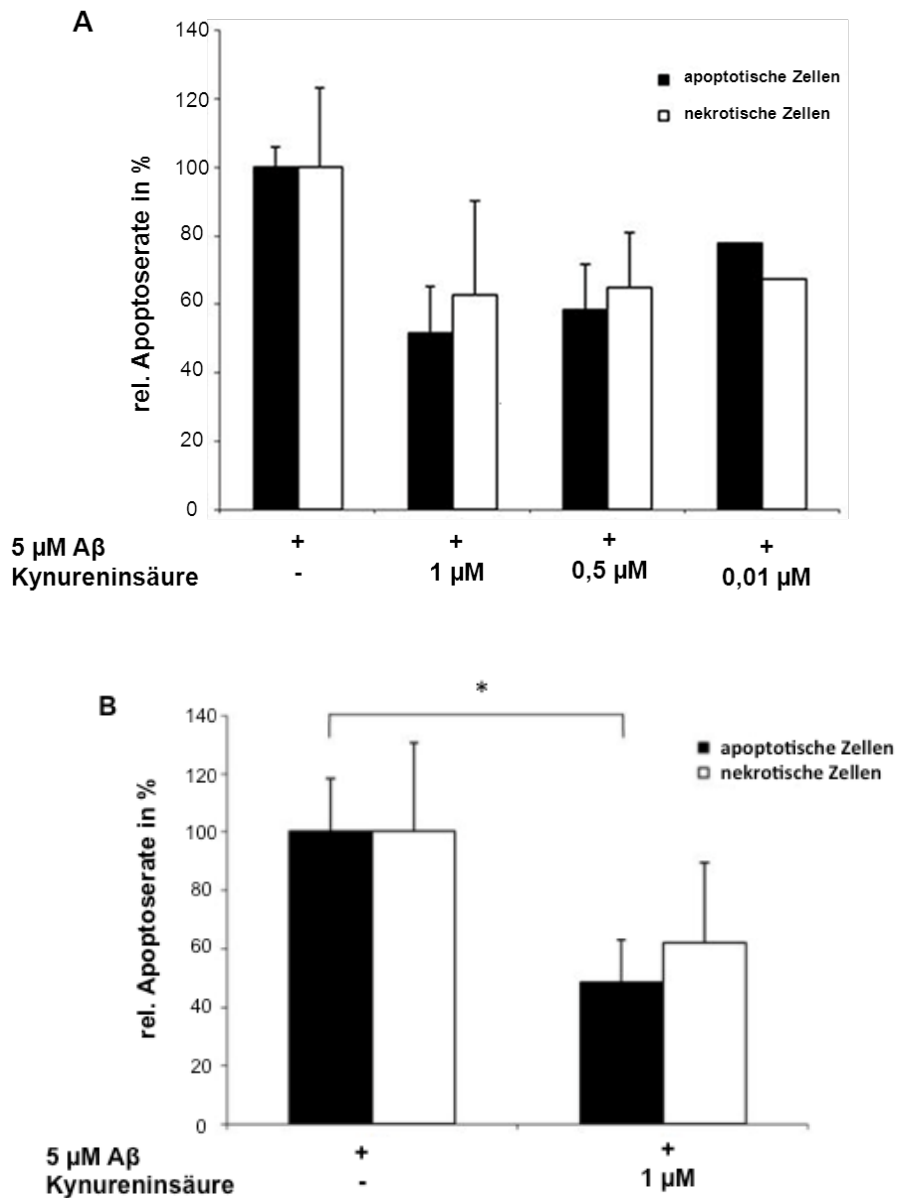


Abbildung 7: KA senkt signifikant die Apoptose

(A) BV-2 Zellen behandelt mit A β_{1-40} und KA für 24 Stunden bei 37 °C. Dargestellt ist die relative Apoptoserate, die abhängig von der Konzentration der KA (von 0,01 über 0,5 bis 1 μ M) immer stärker reduziert wird.

(B) Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils mit Doppelbestimmungen erfolgten. Behandlung und Durchführung genau wie in (A) beschrieben. Zur besseren Darstellung wurden in beiden Abbildungen die ausschließlich mit A β_{1-40} stimulierten Zellen gleich 100 % und die anderen jeweils in Relation zu diesen gesetzt.

Zusammenfassend kann zur Toxizität die Aussage getroffen werden, dass die KA nicht protektiv auf die Zellvitalität wirkt, aber die Apoptoserate signifikant senken kann.

3.4 Wirkung der KA auf Zytokin- und NO-Sekretion

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit stellt die Untersuchung der Neuroinflammation in Verbindung mit der Überexpression von proinflammatorischen Zytokinen dar. Daher sollen im Folgenden die Auswirkungen von KA zum einen auf die von A β ₁₋₄₀ induzierte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 und zum anderen auf die NO-Produktion der BV-2 Zellen demonstriert werden.

3.4.1 TNF- α und IL-6

Zur Messung der Konzentrationen von TNF- α und IL-6 in den Überständen der behandelten BV-2 wurden Sandwich-ELISAs verwendet. Zur Stimulation wurde A β ₁₋₄₀ nach dem Protokoll von Liu (Liu et al. 2011) hergestellt. Die BV-2 Zellen wurden jeweils 30 Minuten mit KA vorinkubiert. In den Abbildungen 8 und 9 wurden zur besseren Übersicht die Konzentrationen der unbehandelten Zellen gleich eins und die anderen jeweils in deren Bezug gesetzt. Die Ergebnisse der Zytokin-ELISA sind in der Abbildung 8 dargestellt. Die Konzentration von TNF- α zeigt einen deutlichen Anstieg bei mit 20 μ M A β ₁₋₄₀ stimulierten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten BV-2 Zellen (Abbildung 8A). Die Ko-Stimulation von 20 μ M A β ₁₋₄₀ und 10 μ M KA erreichte fast wieder das Niveau der kontrollbehandelten Zellen (Abbildung 8A). In Bezug auf die Sekretion von IL-6 konnte bei der Ko-Behandlung mit 20 μ M A β ₁₋₄₀ und 10 μ M KA zwar ebenfalls eine Tendenz zur Reduktion aufgezeigt, aber keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden (Abbildung 8B).

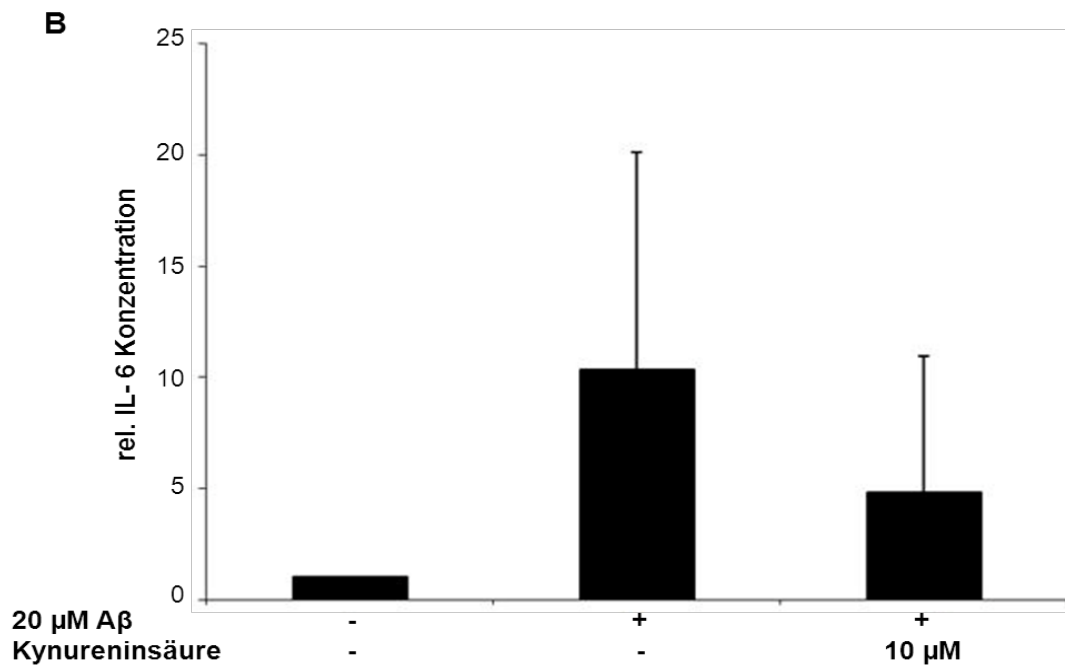
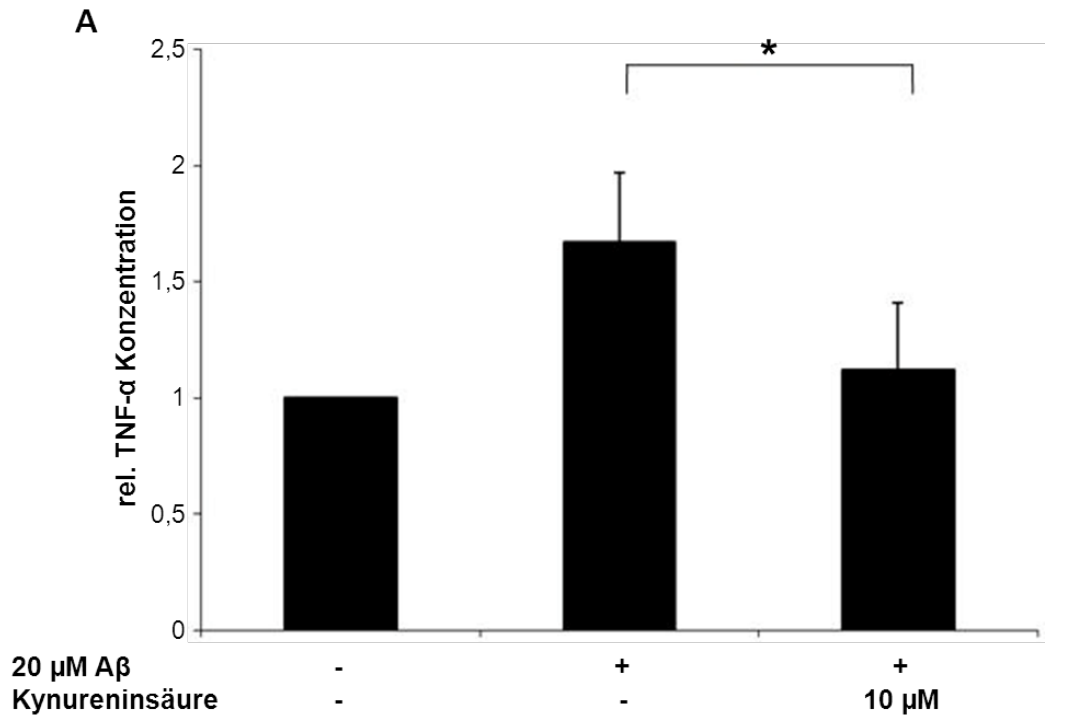


Abbildung 8: Messung von TNF- α - und IL-6-Konzentrationen durch Zytokin-ELISA

Zytokin-ELISA mit Überständen von mit A β_{1-40} und KA stimulierten BV-2 Zellen unter Verwendung von ELISA-Kits der Firma R&D.

(A) Balkendiagramm mit Darstellung der TNF- α Konzentrationen von unbehandelten zu mit A β_{1-40} \pm KA behandelten BV-2 Zellen. Ergebnisse aus 5 unabhängigen Experimenten, die jeweils mind. mit Doppelbestimmungen erfolgten. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD). Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt. $p=0,0183$

(B) Gezeigt ist hier die relative Freisetzung von IL-6. Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchen, die jeweils mit Doppelbestimmungen erfolgten. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD.

3.4.2 NO-Sekretion der BV-2 Zellen

Auch eine Hochregulation der NO-Synthase 2 und der damit verbundene schädliche oxidative Stress durch einen erhöhten NO-Spiegel ist als eine charakteristische Komponente der Alzheimer Erkrankung in der Literatur beschrieben (Glass et al. 2010; Kummer et al. 2012). Durch den NO-Assay sollte herausgearbeitet werden, inwieweit sich $A\beta_{1-40}$ auf die NO-Produktion der BV-2 Zellen auswirkt und inwiefern die KA diese beeinflusst. Aus dem Balkendiagramm in Abbildung 9 lassen sich aufgrund der hohen Standardabweichungen zwar keine signifikanten Ergebnisse ablesen, es sind aber zwei Tendenzen zu erkennen: die NO-Synthese kann durch $A\beta_{1-40}$ -Behandlung angeregt und durch die Zugabe von KA wieder gesenkt werden.

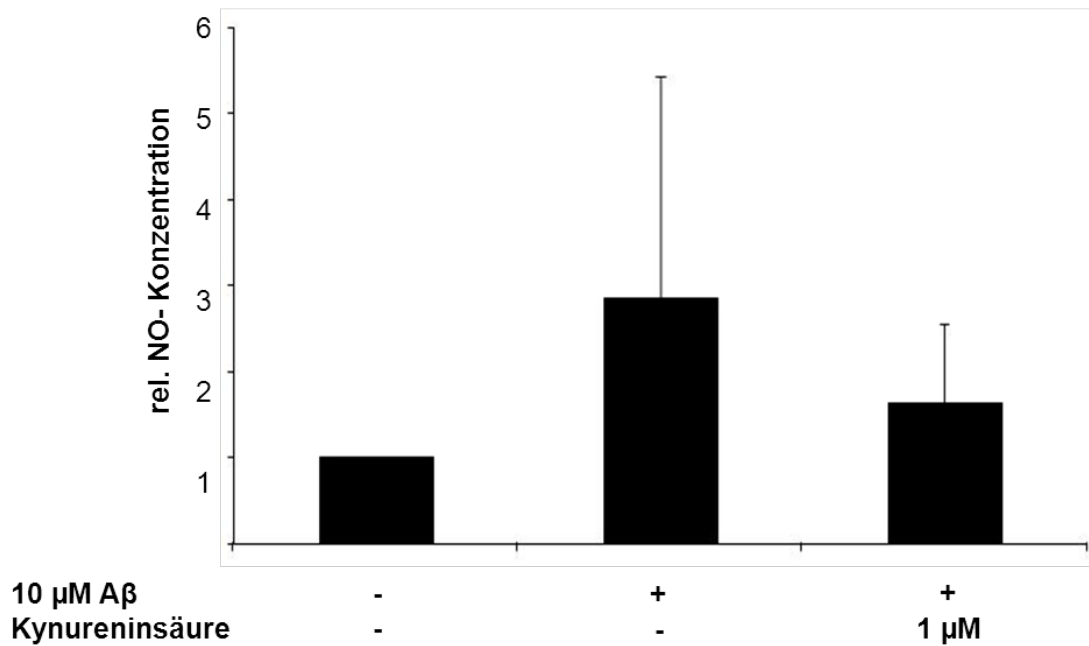


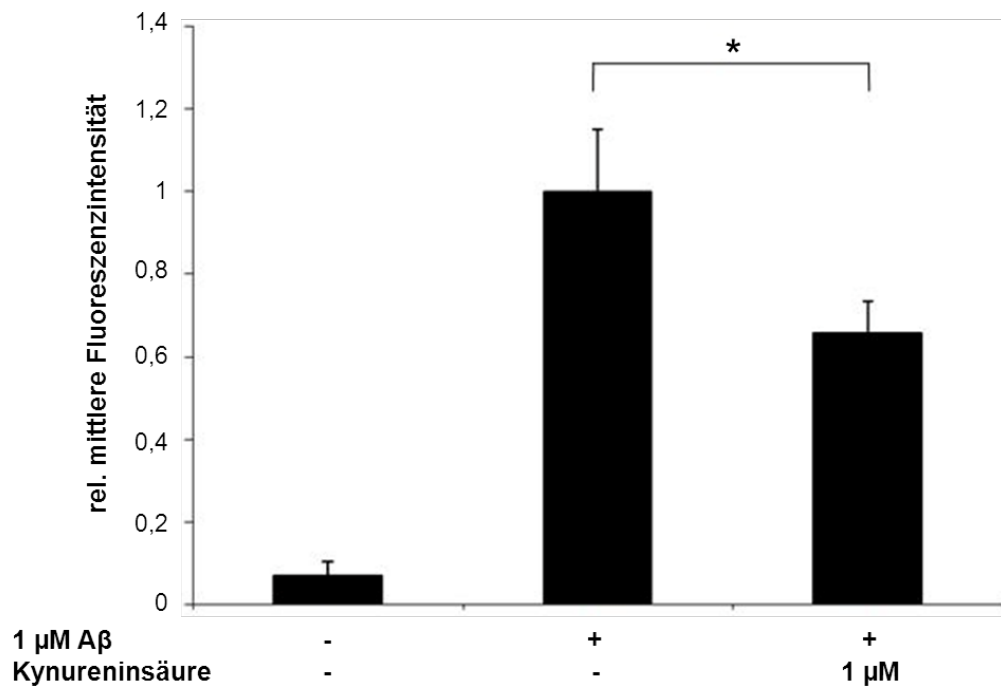
Abbildung 9: Einfluss der KA auf die NO-Sekretion von BV-2 Zellen

NO-Assay aus Überständen von mit $A\beta_{1-40}$ stimulierten BV-2 Zellen. Als Negativkontrolle ist die Ladungskontrolle mit aufgeführt. Ergebnis aus zwei Experimenten, die jeweils mit Doppelbestimmungen erfolgten.

3.5 Einfluss auf die Phagozytose

Mikrogliazellen sind in der Lage, A β aufzunehmen. Im Folgenden wurde der Einfluss von KA auf die Phagozytose von A β ₁₋₄₀ bei BV-2 Zellen untersucht. Dazu wurden die BV-2 Zellen für 30 Minuten mit FITC- A β ₁₋₄₀ in Ab- und Anwesenheit von KA behandelt und die Phagozytose mittels fluoreszenzmarkierter Durchflusszytometrie bestimmt. Berücksichtigt wurden allein die lebenden, HOECHST 33258 negativen Zellen. In Abbildung 10A ist der Einfluss der KA auf die A β -Aufnahme dargestellt. Durch die zusätzliche Behandlung mit 1 μ M KA konnte die A β -Aufnahme signifikant um ein Drittel reduziert werden. Zusätzlich wurde das Ergebnis mit einem Western Blot verifiziert. Dafür wurden Lysate, von den wie oben behandelten BV-2 Zellen, einer SDS Gelelektrophorese unterzogen und geblottet. Anschließend konnte A β ₁₋₄₀ mit einem monoklonalen Antikörper gegen A β (6E10) nachgewiesen werden. Im abgebildeten Blot ist eine deutliche Abnahme der Intensität der A β -Bande bei vorausgegangener Behandlung mit KA zu erkennen (Abbildung 10B). Als Ladekontrolle wurde der Blot mit α -Tubulin gefärbt (Abbildung

A



10B).

B

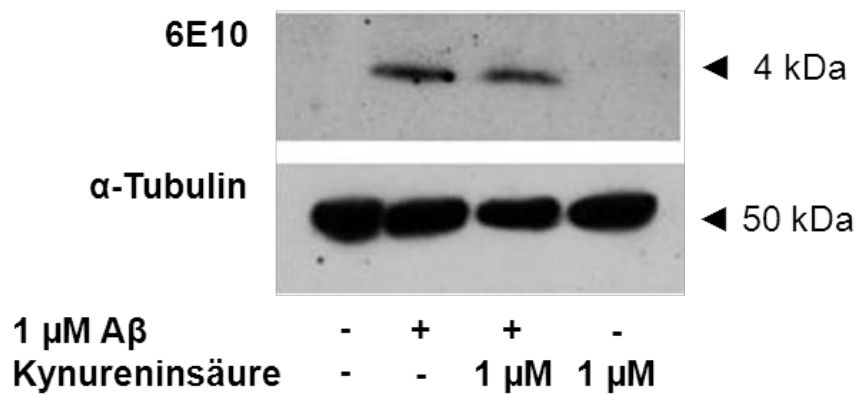


Abbildung 10: KA reduziert die Aufnahme von Aβ₁₋₄₀ in BV-2 Zellen

(A) BV-2 Zellen wurden mit FITC-Aβ alleine oder zusätzlich mit 1 μM KA für 30 Minuten behandelt und die Aufnahme von Aβ₁₋₄₀ mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von drei unabhängigen Experimenten die jeweils mit Triplikaten erfolgten.

(B) Western Blot von Proteinlysaten von Aβ₁₋₄₀ und Aβ₁₋₄₀ + KA behandelten BV-2 Zellen, gefärbt mit einem monoklonalen Antikörper gegen Aβ (6E10) und α-Tubulin.

3.6 Kynureninsäure-ELISA

Mit Hilfe eines Kynureninsäure-ELISAs (Cusabio Biotech CO, Ltd, Newark, USA) wurden in dieser Arbeit Serum von 22 Patienten mit AD und Serum von 30 gesunden Kontrollen untersucht. Ziel war es zu untersuchen, ob Unterschiede in der Serumkonzentration von KA zu detektieren sind. In Seren beider Gruppen konnten KA-Konzentrationen im pikomolaren Bereich gemessen werden. Ein Unterschied ließ sich jedoch nicht feststellen.

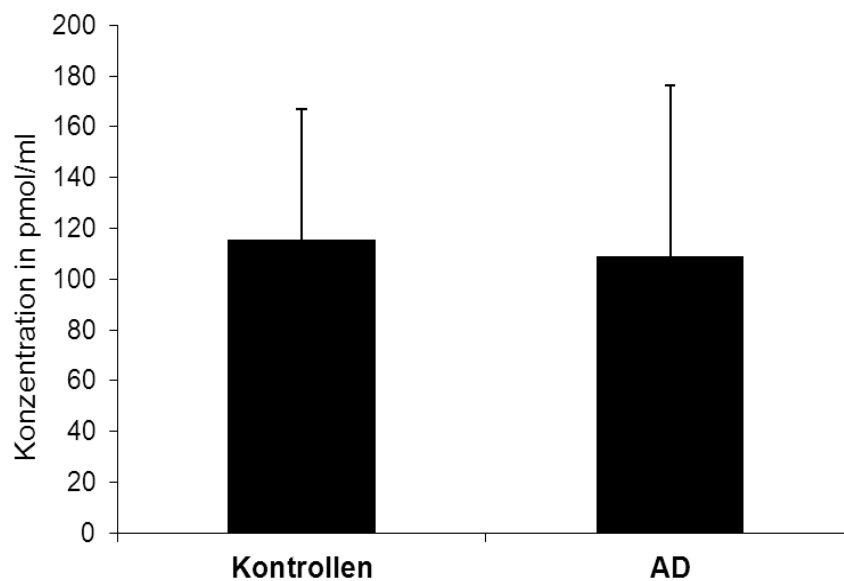


Abbildung 11: Kynureninsäure-ELISA mit Serum von AD und Kontrollen

Messung der KA-Konzentration in Patientenserum mittels Kynureninsäure-ELISA (Cusabio Biotech CO, Ltd, Newark, USA). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus der Messung von 30 Kontrollseren und 22 Seren von Patienten mit AD.

4 Diskussion

Es ist bekannt, dass aktivierte Mikrogliazellen über die Inflammation einen Einfluss auf die Entstehung und den Progress der AD ausüben. Die mikrogliale Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und NO wird durch A β -Stimulation induziert (Heneka et al. 2010). Des Weiteren konnte bereits in mehreren *in vitro* Studien gezeigt werden, dass A β für den Zelluntergang von Neuronen verantwortlich ist und auch die mikrogliale Zellviabilität signifikant reduziert (Bach et al. 2011). Als ein weiteres Charakteristikum der AD gilt die Tau-Hyperphosphorylierung. In neuronalen *in vitro* Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die A β - α 7nAChR-Komplexbildung zu einer vermehrten Tau-Phosphorylierung führt (Wang et al. 2003).

In der Literatur wird der KA eine neuroprotektive Wirkweise zugewiesen. Zwilling et al. konnten in transgenen Mausmodellen zeigen, dass ein erhöhter KA-Spiegel im Gehirn die neurodegenerativen Veränderungen bei AD signifikant reduziert (Zwilling et al. 2011). Des Weiteren wurde *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen, dass ein zwei- bis dreifacher Anstieg des KA-Niveaus postischämische Hirnschäden bei ischämischen Infarkten signifikant senken kann. Studien über die Affinität von KA zeigten zudem, dass die KA als Antagonist des NMDA- und des α 7nACh-Rezeptors im Vergleich zum NMDA-Rezeptor mit einer etwa doppelt so starken Affinität an den α 7nAChR bindet (Hilmas et al. 2001).

Als Mitglied des „cholinergic anti-inflammatory Pathways“ spielt der α 7nAChR eine wichtige Rolle bei der Regulation entzündlicher Prozesse in der Peripherie und im Gehirn (Wang et al. 2003). Bekannt ist, dass es bei der AD zu einer Reduktion der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren kommt (Kadir et al. 2006).

Die Grundfrage dieser Arbeit lautet, ob und inwieweit die KA als endogener α 7nAChR-Antagonist in der Lage ist, die toxische Wirkung des A β positiv zu beeinflussen. Zur Beantwortung dieser Frage dienten verschiedene *in vitro* Experimente. Neben der α 7nACh-Rezeptorexpression wurde zur Untersuchung der Toxizität sowohl das Apoptoseverhalten der BV-2 Zellen mittels

MTT und FACS-Analyse als auch die Wirkung von KA auf die Zytokin- und NO-Produktion untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde speziell die $\alpha 7$ nAChR-Expression von BV-2 Zellen untersucht. Dabei konnte weder durch A β noch durch KA eine Modulation der Rezeptordichte in unserer Versuchsanordnung erreicht werden. Ballester et. al konnten *in vitro* eine Hochregulierung des $\alpha 7$ nAChR durch das Protein gp120 (Glykoprotein auf der Oberfläche des HI-Virus, Molekülmasse 120 kDa) auf Neuronen zeigen (Ballester et al. 2012). Auch die Arbeitsgruppe um Counts et al. diskutiert eine Hochregulation des $\alpha 7$ nAChR als kompensatorische Antwort zur Aufrechterhaltung der cholinergen Aktivität bei der AD (Counts et al. 2007). Ein Grund für die fehlende Modulation der KA in den vorliegenden Experimenten könnte in der Wahl der Zelllinie bestehen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der murinen Mikrogliazelllinie BV-2 gearbeitet. Als Vorteile dieser Zelllinie gelten die leichte Verfügbarkeit, die hohe Zellproliferation und die Ähnlichkeit zu primären Mikrogliazellen. Es ist jedoch bekannt, dass die Hochregulation von Genen in BV-2 Zellen generell weniger stark ausgeprägt ist als in primären Zellen (Henn et al. 2009). Diese verminderte Genregulation könnte die ausbleibende Modulation begründen. Als Ausblick wäre es daher interessant, die Rezeptorexpression bei KA-stimulierten primären Mikrogliazellen und in einem nächsten Schritt auf Neuronen in einer Mikroglia-Neuronen-Ko-Kultur zu untersuchen. Ein weiterer Grund der mangelnden Modulation der Rezeptordichte durch die KA könnte auch ihr Einfluss auf die Phagozytose von A β sein. Interessanterweise wird der Rezeptor besonders von Neuronen exprimiert, die eine hohe intrazelluläre Akkumulation von A β vorweisen (Nagele et al. 2002). Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigen eine signifikante Reduktion der Phagozytose durch eine Ko-Stimulation mit KA (siehe 3.5.). Demnach könnte auch in der geringeren intrazellulären A β -Konzentration der fehlende Stimulus für die Rezeptorexpression liegen.

Wie bereits erwähnt, ist ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit die *in vitro* Untersuchung der mikroglialen Phagozytose von A β . Es konnte gezeigt werden, dass Mikrogliazellen an der Phagozytose von A β beteiligt sind

(Neumann et al. 2009). Sowohl mit Hilfe der FACS-Analyse als auch über die Western Blot Methode konnte eine signifikante Reduktion der Phagozytose durch eine Ko-Stimulation mit KA erzielt werden. In anderen Arbeiten konnte die neuronale A β -Aufnahme ebenfalls durch α 7nAChR-Antagonisten, wie beispielsweise das α -Bungarotoxin gehemmt werden (Dineley 2007). Ein möglicher Grund der geringeren Phagozytose könnte ein Schutzmechanismus der Mikroglia vor Apoptose sein. Studien von Wang et al. und Nagele et al. postulieren eine intrazelluläre A β -Akkumulation in Neuronen des AD-Gehirns, wobei die Akkumulation in besonderer Ausprägung bei Neuronen mit einer hohen α 7nAChR-Expression beobachtet wurde (Nagele et al. 2002; Wang et al. 2003). Nagele und Kollegen stellen sogar die Hypothese auf, dass α 7nAChR-A β -Interaktion mit der Folge der A β -Aufnahme dann zu der für die AD-Erkrankung typischen Plaquebildung führt, wenn die Wirtszelle stirbt und die A β -Akkumulationen im Hirnparenchym freierwerden (Nagele et al. 2002). Das Ergebnis der FACS-Apoptose-Detektion würde den Erklärungsansatz des Schutzmechanismus untermauern. Durch die Ko-Stimulierung mit KA konnte eine signifikante Reduktion der Apoptose erzielt werden. Demgegenüber steht die in der einschlägigen Literatur geltende Hypothese, dass Mikroglia vor neuronalem Zelltod schützen, indem sie A β phagozytieren. Für den Nachweis wäre interessant, die Versuche in einer Mikroglia-Neuronen-Ko-Kultur zu wiederholen. Einen weiteren Erklärungsansatz bietet die Neuroinflammation. Wie unter 1.2. bereits erläutert, induziert A β den M1 Zustand der Mikroglia und somit auch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. In der Folge würde eine erhöhte A β -Aufnahme demnach den Aktivierungszustand der Mikroglia in Richtung des M1-Zustands verschieben und somit konsekutiv die Entwicklung einer chronischen Entzündung begünstigen (Cotman et al. 1996). Weiterführend wären hier Versuche, die zeigen, ob KA die Mikroglia in den M1 oder M2 Zustand transformiert.

In Bezug auf die Toxizität konnte durch den Einsatz der KA in der FACS-Analyse eine signifikante Reduktion der durch A β verursachten mikroglialen Apoptose erzielt werden (siehe 3.3.2.). Dieses Ergebnis konnte durch einen MTT-Assay nicht bestätigt werden. Die KA beeinflusst die durch A β reduzierte

Zellviabilität nicht (siehe 3.3.1.). Um die Bedeutung des vorliegenden Ergebnisses des MTTs weiter zu untersuchen, wurden ebenfalls MTT-Assays nach Stimulation mit anderen Agonisten (Nikotin, PNU-282987) und Antagonisten (α -Bungarotoxin, Methyllycaconitine) des α 7nAChR durchgeführt (Daten nicht gezeigt), da für diese in der Literatur bereits Einflüsse auf die Zellviabilität beschrieben worden sind (Li und Wang 2006; Wang et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte bei keinem Versuch in Anwesenheit eines Agonisten bzw. Antagonisten des Rezeptors eine signifikante Veränderung der Zellviabilität im MTT-Assay festgestellt werden. Gründe hierfür können u.a. in der gewählten Zelllinie und im MTT-Assay an sich liegen. In einer Arbeit von Rönicke et al. wird der MTT-Assay im Zusammenhang mit A β kritisch diskutiert (Rönicke et al. 2008). Dort wird vermutet, dass A β Veränderungen in der Formazan-Bildungsrate verursacht. Auch aus diesem Grund wird der MTT-Assay in der Literatur nicht als valider Test im Bereich der Wirkstoffforschung bei der AD angesehen. Bereits 1997 zeigte die Arbeitsgruppe um Liu et al. in einer Studie, dass zytotoxische A β -Peptide eine vermehrte Exozytose des Formazan verursachen und somit die Reduktion der Viabilität im MTT hemmen (Liu und Schubert 1997). Darüber hinaus sollte bei Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit berücksichtigt werden, dass mit einer Zelllinie gearbeitet wurde, die einer ständigen Proliferation unterliegt. Bei einem MTT-Assay werden lediglich die Zellen detektiert, die eine metabolische Aktivität aufweisen. Innerhalb der vierundzwanzigstündigen Inkubationszeit findet eine stetige Proliferation der Zellen statt. Dies kann das Gesamtergebnis beeinflussen. Eine eventuelle Inhibierung der Proliferation als ein Effekt der KA könnte diskutiert und mit Hilfe immunhistochemischer Experimente untersucht werden. Interessant wäre ebenfalls eine Versuchsreihe mit primären Mikrogliazellen. Auf Grund der o.g. Diskussion ist dem Ergebnis der FACS-Analyse mehr Bedeutung und der KA somit eine anti-apoptische Wirkweise zuzuschreiben. Um die Gründe der Inhibierung genau zu erfassen, wäre als ein Ausblick die Untersuchung der Spaltung verschiedener Caspasen z.B. mittels Western-Blotting von Bedeutung.

Eine weitere wichtige Komponente der AD stellt die Neuroinflammation dar. Im Rahmen der AD wird in der einschlägigen Literatur häufig die Rolle des

proinflammatorischen TNF- α und IL-6 beschrieben und auch die Bedeutsamkeit des oxidativen Stresses betont. Durch die Durchführung von Zytokin-ELISA und NO-Assay konnte die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine als auch die NO-Konzentration in den Zellüberständen *in vitro* bestimmt werden. Eine Untersuchung der Zytokinausschüttung ergab, dass durch Vorinkubation mit KA die für A β -typische verstärkte Ausschüttung gehemmt wird. Dabei konnte für TNF- α ein signifikantes Ergebnis und für IL-6 zumindest eine Tendenz erzielt werden. Die hohen Standardabweichungen könnten als Ausdruck der variablen Zellproduktion von IL-6 gedeutet werden. Für die Versuche zur Zytokinausschüttung wurden A β -Fibrillen nach dem Protokoll von Liu et al. verwendet (Liu et al. 2011). Aufgrund der immensen Heterogenität der in der Literatur beschriebenen A β -Protokolle, sind Vergleiche der verschiedenen Arbeiten erschwert. Um relativ nah an die Realität zu gelangen und somit eine größtmögliche Vergleichbarkeit *in vitro* zu erreichen, wäre es am sinnvollsten A β direkt aus dem Gehirn von Maus oder Mensch zu gewinnen.

Auch IL-1 β spielt in der Pathogenese der AD eine Rolle (Shaftel et al. 2008). Da BV-2 Zellen zwar IL-1 β induzieren, jedoch nicht fähig sind, dieses freizusetzen, wurde folglich in dieser Arbeit auf die Untersuchung der KA auf IL-1 β -Sekretion verzichtet (Stansley et al. 2012). Um herauszufinden, ob die Induktion von IL-1 β durch die KA moduliert wird, wäre eine Real-time-PCR zur Messung des mRNA-Levels von IL-1 β notwendig.

Zur Bestimmung der NO-Produktion der mit KA und A β stimulierten BV-2 Zellen erfolgten NO-Assays. Aufgrund einer durchgeführten Konzentrationsreihe (Daten nicht gezeigt) und der Tatsache, dass die physiologische Konzentration von KA im nanomolaren Bereich liegt, wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer KA-Konzentration von 1 μ M gearbeitet. Bei der NO-Produktion ist ebenfalls eine neuroprotektive Tendenz der KA zu erkennen (siehe 3.4.2.). Eine Arbeit von Lugo-Huitron et al. zeigt, dass die KA in hoher Konzentration (100-300 μ M) in der Lage ist, oxidativen Stress signifikant zu reduzieren (Lugo-Huitron et al. 2011). Inwiefern der Einsatz einer derart hohen und unphysiologischen Konzentration im Hinblick auf mögliche

therapeutische Interventionen sinnvoll ist, ist jedoch fragwürdig. Eine Studie zur LPS-induzierten NO-Sekretion zeigte auf, dass im Vergleich zu primärer Mikroglia die BV-2 Zellen weniger NO sekretieren (Horvath et al. 2008). Eine Versuchsreihe mit primärer Mikroglia wäre daher aufschlussreich.

Als abschließendes Experiment sollten in der vorliegenden Arbeit Seren von 22 AD Patienten und 30 Kontrollen anhand eines Kynureninsäure-ELISAs (Cusabio Biotech CO, Ltd, Newark, USA) auf den Konzentrationsgehalt der KA untersucht werden. Wie unter 3.6. bereits erörtert, konnten dabei keine Unterschiede detektiert werden. In der Literatur ist jedoch für Patienten mit AD eine erniedrigte KA-Konzentration im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen im Plasma, im Serum und in Erythrozyten sowie im Liquor beschrieben (Hartai et al. 2007; Gulaj et al. 2010). In einer Arbeit von Schwarz et al. konnte zwar eine erhöhte Serumkonzentration von 3-Hydroxykynurenin festgestellt werden, jedoch keine Unterschiede der KA-Konzentrationen. Sowohl Schwarz et al. als auch die Arbeitsgruppe um Hartai et al., die eine erniedrigte KA-Konzentration in Seren von AD Patienten beschreiben, verwendeten zur Detektion der KA-Konzentration keinen ELISA sondern die Methode der Hochleistungschromatographie. Neben der Wahl der Methodik muss auch die Probenrekrutierung diskutiert werden. Eine definitive Diagnosestellung der AD kann zum Beispiel erst post mortem gestellt werden, wohingegen zu Lebzeiten anhand klinischer Kriterien gewisse Wahrscheinlichkeiten ermittelt werden (Ballard et al. 2011). Des Weiteren bedingen das Alter der Proben, die Art und Weise der Lagerung, deren Transportverfahren, die Verarbeitung, das Analyseverfahren und auch die Häufigkeit des wiederholten Einfrierens und Auftauens erhebliche Unterschiede von Messergebnissen.

In der Zusammenschau aller *in vitro* erhobenen Ergebnisse kann für die KA als endogener $\alpha7nACh$ Rezeptorantagonist ein protektiver Effekt in Bezug auf die toxische Wirkweise des A β s bei BV-2 Zellen postuliert werden. Durch die Ko-Stimulation mit KA konnte die Apoptoserate signifikant gesenkt und die mikrogliale A β -Phagozytose sogar um ein Drittel reduziert werden. Bedeutend ist ebenfalls die reduzierte Zytokinausschüttung durch KA. Eine Inhibierung der Zytokinkonzentration führt zu einer geringeren Neuroinflammation und

konsekutiv zu weniger neurodegenerativen Prozessen. Da sowohl die Neuroinflammation als auch die Neurodegeneration entscheidend am Pathomechanismus der AD beteiligt sind, wird die Rolle der KA bei AD durch ihren o.g. Einfluss besonders deutlich.

Bei Betrachtung der Versuchsergebnisse sollte beachtet werden, dass es sich um eine immortalisierte Zelllinie und somit um ein artifizielles System handelt. Eine Übertragung der *in vitro* erzielten Ergebnisse auf *in vivo* Modelle ist deshalb nicht möglich. In einem weiteren Forschungsvorhaben könnten die verschiedenen Signaltransduktionswege des $\alpha 7$ nAChR im Hinblick auf eine mögliche Beeinflussung durch die KA untersucht werden. Zusätzlich gäben Neuronen-Mikroglia-Ko-Kulturen sowie primäre Kultursysteme und auch *in vivo* Versuchsreihen weitere aufschlussreiche Einblicke in die Rolle der KA bei der AD.

5 Zusammenfassung

Die Alzheimer-Erkrankung ist eine neurodegenerative Demenzerkrankung, für die bisher keine kurative Therapie entwickelt werden konnte. Im Jahr 2007 lag die weltweite Prävalenz bei 29 Millionen (Brookmeyer et al. 2007). In der Pathogenese der Erkrankung stehen die Bildung von A β Plaques sowie intrazelluläre Neurofibrillenbündel im Vordergrund. Neben diesen histopathologischen Korrelaten spielt vor allem die Neuroinflammation eine bedeutende Rolle (Krause und Muller 2010).

Kynureninsäure entsteht im Kynureninstoffwechselweg, welcher eine zentrale Stellung im Tryptophanabbauweg einnimmt. Die Kynureninsäure gilt als endogener Antagonist des α 7nAChR. Ihr wird in der Literatur eine neuroprotektive Rolle zugewiesen (Gulaj et al. 2010).

Zielsetzung dieser Arbeit war es anhand verschiedener *in vitro* Experimente darzustellen, ob bzw. inwiefern die Kynureninsäure einen Einfluss A β -stimulierte Mikrogliazellen ausübt.

Zu Beginn der Arbeit wurde eine mögliche Regulierbarkeit der α 7nACh Rezeptorexpression durch die Kynureninsäure mit der Western-Blot-Methodik untersucht. Das angewandte Methodenspektrum umfasste zusätzlich MTT-Assays und fluoreszenzmarkierte Durchflusszytometrie zur Untersuchung der Zellviabilität und des Apoptoseverhaltens sowie Zytokin-ELISAs und NO-Assays zur Detektion freigesetzter proinflammatorischer Zytokine und NO. Zudem wurde die mikrogliale Phagozytose von A β mit einer fluoreszenzmarkierten Durchflusszytometrie untersucht und mittels Western-Blotting verifiziert. Des Weiteren wurde die Konzentration der Kynureninsäure in Serumproben von Patienten mit AD und von einer Kontrollgruppe mit einem Kynureninsäure-ELISA bestimmt.

Bei der Auswertung der Ergebnisse konnte *in vitro* ein protektiver Einfluss der Kynureninsäure auf A β -stimulierte Mikrogliazellen detektiert werden. In Bezug auf die Toxizität konnte die Apoptoserate durch Ko-Inkubation mit KA signifikant reduziert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die KA in der Lage ist, die A β -induzierte Freisetzung von TNF- α signifikant und von IL-6 und NO in der Tendenz zu senken. Die mikrogliale Phagozytose von A β konnte durch die Ko-Stimulation mit KA signifikant um ein Drittel reduziert werden. Im Kynureninsäure-ELISA konnten keine Unterschiede der KA-Konzentration in den Seren von AD und Kontrollen gesehen werden. Durch die Senkung proinflammatorischer Zytokine und die Reduktion mikroglialer A β -Aufnahme greift die KA jedoch wesentlich in den Zellstoffwechsel ein, bedingt somit eine geringere Neuroinflammation und senkt konsekutiv den mikroglialen Zelluntergang. Im Ausblick wäre es interessant die Wirkung der KA auf A β -stimulierte primäre Mikrogliazellen zu untersuchen.

6 Abstract

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder, for which no curative treatment has been developed yet. In 2007 the global prevalence was 29 million (Brookmeyer et al. 2007). The major contributors in the pathogenesis of the disease are the formation of A β plaques and neurofibrillary tangles. In addition neuroinflammation plays a significant role (Krause und Muller 2010). Kynurenic acid is produced in the kynurenine pathway, which has a central position in tryptophan catabolism. Kynurenic acid is an endogenous antagonist of the α 7nAChR. In the literature a neuroprotective role for kynurenic acid has been described (Gulaj et al. 2010).

Objective of this thesis was to investigate the effect of kynurenic acid and A β on microglial cells using various *in vitro* experiments.

At first the modulation of α 7nACh receptor expression by kynurenic acid was examined with Western blot. Furthermore the range of methods included MTT-assays and flow cytometry to study cell viability and apoptosis. For the detection of proinflammatory cytokines and NO in cell culture supernatants, cytokine-ELISAs and NO-assays were performed. In addition, the microglial phagocytosis of A β was examined using FITC-labeled A β and flow cytometry and verified using Western blots. The concentration of kynurenic acid in serum samples from patients with AD and healthy controls was determined with an ELISA.

Neither A β nor kynurenic acid showed an effect on the expression of α 7nACh receptor. In terms of toxicity no change in cell viability was detected. However, a significant reduction in the rate of apoptosis after co-incubation with kynurenic acid could be achieved. Moreover it could be shown that kynurenic acid reduces A β -induced release of TNF- α significantly and of IL-6 and NO by trend. Microglial phagocytosis of A β could be reduced significantly by co-stimulation with kynurenic acid. In the ELISA no differences of kynurenic acid concentration in the sera of AD patients compared with healthy controls could be seen.

Taken together a protective effect of the endogenous $\alpha 7$ nAChR antagonist kynurenic acid on A β -treated microglial cells could be detected *in vitro* and should be subjected to *in vivo* experiments using AD transgenic mice.

7 Literaturverzeichnis

- Aguzzi, A., B. A. Barres und M. L. Bennett (2013). Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science* 339(6116): 156-61.
- Aguzzi, A. und T. O'Connor (2010). Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 9(3): 237-48.
- Alberdi, E., Sánchez-Gómez, M.V., Cavaliere F., Pérez-Samartín A., Zugaza J.L., Trullas R., Domercq M. und Matute C. (2010). Amyloid beta oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium*, 47: 264-272
- Arendt, T., V. Bigl, A. Arendt und A. Tennstedt (1983). Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's Disease. *Acta Neuropathol* 61(2): 101-8.
- Bach, J. P., D. Mengel, T. Wahle, A. Kautz, M. Balzer-Geldsetzer, Y. Al-Abed, R. Dodel und M. Bacher (2011). The role of CNI-1493 in the function of primary microglia with respect to amyloid-beta. *J Alzheimers Dis* 26(1): 69-80.
- Ballard, C., S. Gauthier, A. Corbett, C. Brayne, D. Aarsland und E. Jones (2011). Alzheimer's disease. *Lancet* 377(9770): 1019-31.
- Ballester, L. Y., C. M. Capo-Velez, W. F. Garcia-Beltran, F. M. Ramos, E. Vazquez-Rosa, R. Rios, J. R. Mercado, R. I. Melendez und J. A. Lasalde-Dominicci (2012). Up-regulation of the neuronal nicotinic receptor alpha7 by HIV glycoprotein 120: potential implications for HIV-associated neurocognitive disorder. *J Biol Chem* 287(5): 3079-86.
- Barth, M. C., N. Ahluwalia, T. J. Anderson, G. J. Hardy, S. Sinha, J. A. Alvarez-Cardona, I. E. Pruitt, E. P. Rhee, R. A. Colvin und R. E. Gerszten (2009). Kynurenic acid triggers firm arrest of leukocytes to vascular endothelium under flow conditions. *J Biol Chem* 284(29): 19189-95.
- Bartus, R. T., R. L. Dean, 3rd, B. Beer und A. S. Lippa (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217(4558): 408-14.

- Bianca, V. D., S. Dusi, E. Bianchini, I. Dal Pra und F. Rossi (1999). beta-amyloid activates the O-2 forming NADPH oxidase in microglia, monocytes, and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 274(22): 15493-9.
- Blennow, K., M. J. de Leon und H. Zetterberg (2006). Alzheimer's disease. *Lancet* 368(9533): 387-403.
- Bossy-Wetzell, E., R. Schwarzenbacher und S. A. Lipton (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 10 Suppl: S2-9.
- Braak, E. und H. Braak (1997). Alzheimer's disease: transiently developing dendritic changes in pyramidal cells of sector CA1 of the Ammon's horn. *Acta Neuropathol* 93(4): 323-5.
- Braak, H., U. Rub, C. Schultz und K. Del Tredici (2006). Vulnerability of cortical neurons to Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Alzheimers Dis* 9(3 Suppl): 35-44.
- Braidy, N., R. Grant, S. Adams, B. J. Brew und G. J. Guillemin (2009). Mechanism for quinolinic acid cytotoxicity in human astrocytes and neurons. *Neurotox Res* 16(1): 77-86.
- Brookmeyer, R., E. Johnson, K. Ziegler-Graham und H. M. Arrighi (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 3(3): 186-91.
- Buckingham, S. D., A. K. Jones, L. A. Brown und D. B. Sattelle (2009). Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. *Pharmacol Rev* 61(1): 39-61.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112(2): 195-203.
- Cameron, B. und G. E. Landreth (2010). Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 37(3): 503-9.

- Carpeneo, R., A. Pittaluga, A. Cozzi, S. Attucci, A. Galli, M. Raiteri und F. Moroni (2001). Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release. *Eur J Neurosci* 13(11): 2141-7.
- Chow, V. W., M. P. Mattson, P. C. Wong und M. Gleichmann (2010). An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med* 12(1): 1-12.
- Cipriani, G., C. Dolciotti, L. Picchi und U. Bonuccelli (2011). Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurol Sci* 32(2): 275-9.
- Cleary, J. P., D. M. Walsh, J. J. Hofmeister, G. M. Shankar, M. A. Kuskowski, D. J. Selkoe und K. H. Ashe (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8(1): 79-84.
- Combs, C. K., J. C. Karlo, S. C. Kao und G. E. Landreth (2001). beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 21(4): 1179-88.
- Cotman, C. W., A. J. Tenner und B. J. Cummings (1996). beta-Amyloid converts an acute phase injury response to chronic injury responses. *Neurobiol Aging* 17(5): 723-31.
- Counts, S. E., B. He, S. Che, M. D. Ikonovic, S. T. DeKosky, S. D. Ginsberg und E. J. Mufson (2007). Alpha7 nicotinic receptor up-regulation in cholinergic basal forebrain neurons in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 64(12): 1771-6.
- Coyle, J. T., D. L. Price und M. R. DeLong (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219(4589): 1184-90.
- Culmsee, C., X. Zhu, Q. S. Yu, S. L. Chan, S. Camandola, Z. Guo, N. H. Greig und M. P. Mattson (2001). A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 77(1): 220-8.
- De Strooper, B., R. Vassar und T. Golde (2010). The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6(2): 99-107.

- Delrieu, J., P. J. Ousset, C. Caillaud und B. Vellas (2012). 'Clinical trials in Alzheimer's disease': immunotherapy approaches. *J Neurochem* 120 Suppl 1: 186-93.
- Dineley, K. T. (2007). Beta-amyloid peptide--nicotinic acetylcholine receptor interaction: the two faces of health and disease. *Front Biosci* 12: 5030-8.
- Dodel, R., A. Rominger, P. Bartenstein, F. Barkhof, K. Blennow, S. Forster, Y. Winter, J. P. Bach, J. Popp, J. Alferink, J. Wiltfang, K. Buerger, M. Otto, P. Antuono, M. Jacoby, R. Richter, J. Stevens, I. Melamed, J. Goldstein, S. Haag, S. Wietek, M. Farlow und F. Jessen (2010). Intravenous immunoglobulin for treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial. *Lancet Neurol* 12(3): 233-43.
- Drubin, D. G. und M. W. Kirschner (1986). Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* 103(6 Pt 2): 2739-46.
- Duan, Y., S. Dong, F. Gu, Y. Hu und Z. Zhao (2012). Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: focusing on tau-mediated neurodegeneration. *Transl Neurodegener* 1(1): 24.
- Dubois, B., H. H. Feldman, C. Jacova, J. L. Cummings, S. T. Dekosky, P. Barberger-Gateau, A. Delacourte, G. Frisoni, N. C. Fox, D. Galasko, S. Gauthier, H. Hampel, G. A. Jicha, K. Meguro, J. O'Brien, F. Pasquier, P. Robert, M. Rossor, S. Salloway, M. Sarazin, L. C. de Souza, Y. Stern, P. J. Visser und P. Scheltens (2010). Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol* 9(11): 1118-27.
- Folstein, M. F., S. E. Folstein und P. R. McHugh (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12(3): 189-98.
- Fuhrmann, M., T. Bittner, C. K. Jung, S. Burgold, R. M. Page, G. Mitteregger, C. Haass, F. M. LaFerla, H. Kretschmar und J. Herms (2010). Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 13(4): 411-3.

- Gilman, S., M. Koller, R. S. Black, L. Jenkins, S. G. Griffith, N. C. Fox, L. Eisner, L. Kirby, M. B. Rovira, F. Forette und J. M. Orgogozo (2005). Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 64(9): 1553-62.
- Gislefoss, R. E., T. K. Grimsrud und L. Morkrid (2008). Long-term stability of serum components in the Janus Serum Bank. *Scand J Clin Lab Invest* 68(5): 402-9.
- Glass, C. K., K. Saijo, B. Winner, M. C. Marchetto und F. H. Gage (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140(6): 918-34.
- Gong, C. Y., Z. Li, H. M. Wang, J. Liu, L. Chen, H. W. Zhang, X. Wang und J. Yang (2011). Targeting the kynurenine pathway as a potential strategy to prevent and treat Alzheimer's disease. *Med Hypotheses* 77(3): 383-5.
- Gotz, J., F. Chen, J. van Dorpe und R. M. Nitsch (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 293(5534): 1491-5.
- Green, L. C., D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok und S. R. Tannenbaum (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126(1): 131-8.
- Grundman, M., A. DiBernardo, N. Raghavan, M. Krams und E. Yuen (2013). 2012: A watershed year for Alzheimer's disease research. *J Nutr Health Aging* 17(1): 51-3.
- Guillemin, G. J., B. J. Brew, C. E. Noonan, T. G. Knight, G. A. Smythe und K. M. Cullen (2007). Mass spectrometric detection of quinolinic acid in microdissected Alzheimer's disease plaques. *International Congress Series* 1304(0): 404-408.
- Guillemin, G. J., B. J. Brew, C. E. Noonan, O. Takikawa und K. M. Cullen (2005). Indoleamine 2,3 dioxygenase and quinolinic acid immunoreactivity in Alzheimer's disease hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31(4): 395-404.

- Guillemin, G. J., D. G. Smith, G. A. Smythe, P. J. Armati und B. J. Brew (2003). Expression of the kynurenine pathway enzymes in human microglia and macrophages. *Adv Exp Med Biol* 527: 105-12.
- Gulaj, E., K. Pawlak, B. Bien und D. Pawlak (2010). Kynurenine and its metabolites in Alzheimer's disease patients. *Adv Med Sci* 55(2): 204-11.
- Haass, C. und D. J. Selkoe (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(2): 101-12.
- Hardy, J. und D. J. Selkoe (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297(5580): 353-6.
- Hartai, Z., A. Juhasz, A. Rimanoczy, T. Janaky, T. Donko, L. Dux, B. Penke, G. K. Toth, Z. Janka und J. Kalman (2007). Decreased serum and red blood cell kynurenic acid levels in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 50(2): 308-13.
- Heneka, M. T., M. P. Kummer, S. Weggen, B. Bulic, G. Multhaup, L. Munter, M. Hull, T. Pflanzner und C. U. Pietrzik (2011). Molecular mechanisms and therapeutic application of NSAIDs and derived compounds in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 8(2): 115-31.
- Heneka, M. T., M. K. O'Banion, D. Terwel und M. P. Kummer (2010). Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 117(8): 919-47.
- Henn, A., S. Lund, M. Hedtjarn, A. Schratzenholz, P. Porzgen und M. Leist (2009). The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *Altx* 26(2): 83-94.
- Hilmas, C., E. F. Pereira, M. Alkondon, A. Rassoulpour, R. Schwarcz und E. X. Albuquerque (2001). The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J Neurosci* 21(19): 7463-73.

- Horvath, R. J., N. Natile-McMenemy, M. S. Alkaitis und J. A. Deleo (2008). Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. *J Neurochem* 107(2): 557-69.
- Hu, M., M. E. Schurdak, P. S. Puttfarcken, R. El Kouhen, M. Gopalakrishnan und J. Li (2007). High content screen microscopy analysis of A beta 1-42-induced neurite outgrowth reduction in rat primary cortical neurons: neuroprotective effects of alpha 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor ligands. *Brain Res* 1151: 227-35.
- Jameson, L., T. Frey, B. Zeeberg, F. Dalldorf und M. Caplow (1980). Inhibition of microtubule assembly by phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Biochemistry* 19(11): 2472-9.
- Jessen, F., A. Spottke, I. Kopp, G. Deuschl und W. Maier. (2009). "Methodenreport und Evidenztabelle zur S3-Leitlinie "Demenzen"." from <https://www.dgppn.de/...leitlinien/s3-leitlinie-demenz-methoden-report.pdf>.
- Kadir, A., O. Almkvist, A. Wall, B. Langstrom und A. Nordberg (2006). PET imaging of cortical 11C-nicotine binding correlates with the cognitive function of attention in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)* 188(4): 509-20.
- Kayed, R., E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman und C. G. Glabe (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300(5618): 486-9.
- Kimberly, W. T., J. B. Zheng, S. Y. Guenette und D. J. Selkoe (2001). The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem* 276(43): 40288-92.
- Krause, D. L. und N. Muller (2010). Neuroinflammation, microglia and implications for anti-inflammatory treatment in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2010.

- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19(8): 312-8.
- Kummer, M. P., C. Hulsmann, M. Hermes, D. Axt und M. T. Heneka (2012). Nitric oxide decreases the enzymatic activity of insulin degrading enzyme in APP/PS1 mice. *J Neuroimmune Pharmacol* 7(1): 165-72.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5.
- Lee, C. Y. und G. E. Landreth (2010). The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm* 117(8): 949-60.
- LeVine, H., 3rd (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* 2(3): 404-10.
- Li, X. W. und H. Wang (2006). Non-neuronal nicotinic alpha 7 receptor, a new endothelial target for revascularization. *Life Sci* 78(16): 1863-70.
- Liu, Y. und D. Schubert (1997). Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis. *J Neurochem* 69(6): 2285-93.
- Liu, Y. Y., A. Sparatore, P. Del Soldato und J. S. Bian (2011). ACS84, a novel hydrogen sulfide-releasing compound, protects against amyloid beta-induced cell cytotoxicity. *Neurochem Int* 58(5): 591-8.
- Lugo-Huitron, R., T. Blanco-Ayala, P. Ugalde-Muniz, P. Carrillo-Mora, J. Pedraza-Chaverri, D. Silva-Adaya, P. D. Maldonado, I. Torres, E. Pinzon, E. Ortiz-Islas, T. Lopez, E. Garcia, B. Pineda, M. Torres-Ramos, A. Santamaria und V. P. La Cruz (2011). On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicol Teratol* 33(5): 538-47.
- Malchiodi-Albedi, F., S. Paradisi, A. Matteucci, C. Frank und M. Diociaiuti (2011). Amyloid oligomer neurotoxicity, calcium dysregulation, and lipid rafts. *Int J Alzheimers Dis* 2011: 906964.

- Mandelkow, E. M. und E. Mandelkow (2012). Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(7): a006247.
- Mangialasche, F., A. Solomon, B. Winblad, P. Mecocci und M. Kivipelto (2010). Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol* 9(7): 702-16.
- Martinez, F. O., A. Sica, A. Mantovani und M. Locati (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13: 453-61.
- Matsui, T., M. Ingelsson, H. Fukumoto, K. Ramasamy, H. Kowa, M. P. Frosch, M. C. Irizarry und B. T. Hyman (2007). Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1161: 116-23.
- Mc Donald, J. M., G. M. Savva, C. Brayne, A. T. Welzel, G. Forster, G. M. Shankar, D. J. Selkoe, P. G. Ince und D. M. Walsh (2010). The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Abeta dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. *Brain* 133(Pt 5): 1328-41.
- McKhann, G., D. Drachman, M. Folstein, R. Katzman, D. Price und E. M. Stadlan (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34(7): 939-44.
- McKhann, G. M., D. S. Knopman, H. Chertkow, B. T. Hyman, C. R. Jack, Jr., C. H. Kawas, W. E. Klunk, W. J. Koroshetz, J. J. Manly, R. Mayeux, R. C. Mohs, J. C. Morris, M. N. Rossor, P. Scheltens, M. C. Carrillo, B. Thies, S. Weintraub und C. H. Phelps (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7(3): 263-9.
- Moon, J. H., S. Y. Kim, H. G. Lee, S. U. Kim und Y. B. Lee (2008). Activation of nicotinic acetylcholine receptor prevents the production of reactive oxygen species in fibrillar beta amyloid peptide (1-42)-stimulated microglia. *Exp Mol Med* 40(1): 11-8.

- Morris, J. C. (2005). Early-stage and preclinical Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 19(3): 163-5.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Nagele, R. G., M. R. D'Andrea, W. J. Anderson und H. Y. Wang (2002). Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 110(2): 199-211.
- Neumann, H., M. R. Kotter und R. J. Franklin (2009). Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 132(Pt 2): 288-95.
- O'Nuallain, B., I. Klyubin, J. M. Mc Donald, J. S. Foster, A. Welzel, A. Barry, R. K. Dykoski, J. P. Cleary, M. F. Gebbink, M. J. Rowan und D. M. Walsh (2011). A monoclonal antibody against synthetic Aβ dimer assemblies neutralizes brain-derived synaptic plasticity-disrupting Aβ. *J Neurochem* 119(1): 189-201.
- Oddo, S., A. Caccamo, K. N. Green, K. Liang, L. Tran, Y. Chen, F. M. Leslie und F. M. LaFerla (2005). Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(8): 3046-51.
- Pelegri, P. und A. Surprenant (2009). Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1β release through pyrophosphates. *Embo J* 28(14): 2114-27.
- Pemberton, L. A., S. J. Kerr, G. Smythe und B. J. Brew (1997). Quinolinic acid production by macrophages stimulated with IFN-γ, TNF-α, and IFN-α. *J Interferon Cytokine Res* 17(10): 589-95.
- Perry, V. H., J. A. Nicoll und C. Holmes (2010). Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6(4): 193-201.
- Pietrzik, C. und C. Behl (2005). Concepts for the treatment of Alzheimer's disease: molecular mechanisms and clinical application. *Int J Exp Pathol* 86(3): 173-85.

- Pirttimaki, T. M., Codadu N. K., Awni A., Pratik P., Nagel, D. A., Hill, E. J., Dineley, K. T. und Parri H.R. (2013). $\alpha 7$ Nicotinic receptor-mediated astrocytic gliotransmitter release: A β effects in a preclinical Alzheimer's mouse model. *PLoS One* 8 (11): e81828.
- Rahman, A., K. Ting, K. M. Cullen, N. Braidy, B. J. Brew und G. J. Guillemin (2009). The excitotoxin quinolinic acid induces tau phosphorylation in human neurons. *PLoS One* 4(7): e6344.
- Ravichandran, K. S. (2003). "Recruitment signals" from apoptotic cells: invitation to a quiet meal. *Cell* 113(7): 817-20.
- Ronicke, R., A. Klemm, J. Meinhardt, U. H. Schroder, M. Fandrich und K. G. Reymann (2008). Abeta mediated diminution of MTT reduction--an artefact of single cell culture? *PLoS One* 3(9): e3236.
- Seguela, P., J. Wadiche, K. Dineley-Miller, J. A. Dani und J. W. Patrick (1993). Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13(2): 596-604.
- Shaftel, S. S., W. S. Griffin und M. K. O'Banion (2008). The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation* 5: 7.
- Shytle, R. D., T. Mori, K. Townsend, M. Vendrame, N. Sun, J. Zeng, J. Ehrhart, A. A. Silver, P. R. Sanberg und J. Tan (2004). Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. *J Neurochem* 89(2): 337-43.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson und D. C. Klenk (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1): 76-85.
- Solito, E. und M. Sastre (2012). Microglia function in Alzheimer's disease. *Front Pharmacol* 3: 14.

- Sperling, R. A., P. S. Aisen, L. A. Beckett, D. A. Bennett, S. Craft, A. M. Fagan, T. Iwatsubo, C. R. Jack, Jr., J. Kaye, T. J. Montine, D. C. Park, E. M. Reiman, C. C. Rowe, E. Siemers, Y. Stern, K. Yaffe, M. C. Carrillo, B. Thies, M. Morrison-Bogorad, M. V. Wagster und C. H. Phelps (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7(3): 280-92.
- Sriram, K. und J. P. O'Callaghan (2007). Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 2(2): 140-53.
- Stansley, B., J. Post und K. Hensley (2012). A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 9: 115.
- Suzuki, T., I. Hide, A. Matsubara, C. Hama, K. Harada, K. Miyano, M. Andra, H. Matsubayashi, N. Sakai, S. Kohsaka, K. Inoue und Y. Nakata (2006). Microglial alpha7 nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *J Neurosci Res* 83(8): 1461-70.
- Tracey, K. J. (2007). Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest* 117(2): 289-96.
- Tyas, S. L., J. C. Salazar, D. A. Snowdon, M. F. Desrosiers, K. P. Riley, M. S. Mendiondo und R. J. Kryscio (2007). Transitions to mild cognitive impairments, dementia, and death: findings from the Nun Study. *Am J Epidemiol* 165(11): 1231-8.
- Vamos, E., A. Pardutz, P. Klivenyi, J. Toldi und L. Vecsei (2009). The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: possibilities for neuroprotection. *J Neurol Sci* 283(1-2): 21-7.
- van Groen, T., A. J. Kiliaan und I. Kadish (2006). Deposition of mouse amyloid beta in human APP/PS1 double and single AD model transgenic mice. *Neurobiol Dis* 23(3): 653-62.

- Wang, H., M. Yu, M. Ochani, C. A. Amella, M. Tanovic, S. Susarla, J. H. Li, H. Wang, H. Yang, L. Ulloa, Y. Al-Abed, C. J. Czura und K. J. Tracey (2003). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421(6921): 384-8.
- Wang, J. Z. und F. Liu (2008). Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol* 85(2): 148-75.
- Wang, Q., D. M. Walsh, M. J. Rowan, D. J. Selkoe und R. Anwyl (2004). Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J Neurosci* 24(13): 3370-8.
- Wang, Z. G., R. B. Qi, L. H. Zhu und D. X. Lu (2013). [Effects of antagonist and agonist of nicotinic acetylcholine receptors on injury of rat neurons induced by amyloid beta-protein]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 93(11):864-7.
- Wee Yong, V. (2010). Inflammation in neurological disorders: a help or a hindrance? *Neuroscientist* 16(4): 408-20.
- Whitehouse, P. J., D. L. Price, R. G. Struble, A. W. Clark, J. T. Coyle und M. R. Delon (1982). Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215(4537): 1237-9.
- Wisniewski, H. M., J. Wegiel, K. C. Wang, M. Kujawa und B. Lach (1989). Ultrastructural studies of the cells forming amyloid fibers in classical plaques. *Can J Neurol Sci* 16(4 Suppl): 535-42.
- Zhang, Y., R. McLaughlin, C. Goodyer und A. LeBlanc (2002). Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J Cell Biol* 156(3): 519-29.
- Zheng, H. und E. H. Koo (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1: 5.

Zhou, Z. D., C. H. Chan, Q. H. Ma, X. H. Xu, Z. C. Xiao und E. K. Tan (2011).
The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis:
Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. *Cell
Adh Migr* 5(4): 280-92.

Zwilling, D., S. Y. Huang, K. V. Sathyaikumar, F. M. Notarangelo, P. Guidetti,
H. Q. Wu, J. Lee, J. Truong, Y. Andrews-Zwilling, E. W. Hsieh, J. Y.
Louie, T. Wu, K. Scearce-Levie, C. Patrick, A. Adame, F. Giorgini, S.
Moussaoui, G. Laue, A. Rassoulpour, G. Flik, Y. Huang, J. M.
Muchowski, E. Masliah, R. Schwarcz und P. J. Muchowski (2011).
Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates
neurodegeneration. *Cell* 145(6): 863-74.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	1	Darstellung von A β -Oligomeren durch die Western Blot Methode.....	7
Abbildung	2	Der amyloidogene und nicht-amyloidogene Weg der APP-Spaltung [modifiziert nach (De Strooper et al. 2010)].....	8
Abbildung	3	Darstellung von A β -Oligomeren durch die Western Blot Methode.....	41
Abbildung	4	Thioflavin T Assay zur Darstellung von A β 1-40-Fibrillen.....	42
Abbildung	5	Expression von α 7nAChR in A β 1-40 und KA behandelten BV-2 Zellen	43
Abbildung	6	Zellviabilität von mit A β 1-40 und KA behandelten BV-2 Zellen.....	44
Abbildung	7	KA senkt signifikant die Apoptose.....	45
Abbildung	8	Messung von TNF- α - und IL-6-Konzentrationen durch Zytokin-ELISA	47
Abbildung	9	Einfluss der KA auf die NO-Sekretion von BV-2 Zellen.....	48
Abbildung	10	KA reduziert die Aufnahme von A β 1-40 in BV-2 Zellen.....	50
Abbildung	11	Kynureninsäure-ELISA mit Serum von AD und Kontrollen.....	51

8.2 Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
$\alpha 7nAChR$	Alpha 7 nikotinerger Acetylcholin Rezeptor
$^{\circ}C$	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
A β	Amyloid- β
AD	Alzheimer´s Disease (Alzheimer Erkrankung)
AG	Arbeitsgruppe
AICD	Englisch: APP intracellular C-terminal domain
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
APP	Englisch: Amyloid-Precursor-Protein, Amyloid-Vorläuferprotein
BAD	Englisch: Bcl-2 associated death promoter
BAX	Englisch: Bcl-2-associated X protein
BCA	Bicinchoninsäure
BCL2	Englisch: B-cell lymphoma 2
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
Ca ²⁺	Calcium
Cdk	Englisch: cyclin-dependet kinase, Cyclin-abhängige Kinase
Cl	Chlorid
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C-Terminus	Carboxy-Terminus
dd H ₂ O	deionisiertes Wasser
DMEM	Englisch: Dulbecco´s modified Eagle´s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Englisch: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERKs	Englisch: Extracellular signal-regulated kinases
et al.	et alii
FACS	Englisch: Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FCS	Englisch: fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
GSK3 β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 beta

h	Stunde
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HRP	Horseradish peroxide
IL	Interleukin
Inc.	Incorporation
K	Kalium
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KA	Kynureninsäure
KS	Kynureninstoffwechselweg
l	Liter
M	Molar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MARK	Englisch: Microtubule affinity regulating kinase
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Mikromolar
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazoliumbromid
Na	Natrium
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaF	Natriumfluorid
nM	Nanometer
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Englisch: phosphate buffered saline
PBST	Englisch: phosphate buffered saline Tween 20
pH	potentia hydrogenii
QA	Englisch: quinolinic acid, Quinolinsäure
RIPA	Englisch: Radio immune precipitation assay
rpm	revolutions per minute
sAPP α	Lösliches Amyloid-Precursor-Protein Spaltprodukt der α – Sekretase
sAPPβ	Lösliches Amyloid-Precursor-Protein Spaltprodukt der β-Sekretase
RT	Raumtemperatur
s.	Siehe

SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Th	Thioflavin
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris-(hydroxyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
z.B.	zum Beispiel

8.3 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren folgende Damen und Herren:

Adamkiewicz, Alter, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Becker A., Becker K., Becker S., Behr, Berger, Bien, Bohlander, Czubayko, Daut, Depboylu, Dodel, Donner-Banzhoff, Eggert, Fendrich, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Görg, Gress, Grimm, Hamer, Hertl, Heverhagen, Höffken, Höglinger, Hofmann, Hoyer, Kann, Kircher, Klingmüller, Klose, Knake, König, Koolman, Kühnert, Kruse, Leonhardt, Lill, Löffler, Lohoff, Mahnken, Maier, Maisch, Mandrek, Michl, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Neff, Nimsky, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Plant, Printz, Renz, Richter, Riße, Röhm, Rose, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer J., Schäfer H., Schieffer, Schofer, Schmidt, Sesterhenn, Sekundo, Sommer, Steiniger, Strik, Tackenberg, Teymoortash, Vogelmeier, Wagner, Waldegger, Weihe, Werner, Westermann, Wulf und Zovko

8.4 Publikation

Die Daten der Arbeit wurden wie folgt zur Veröffentlichung angenommen:

Levke Steiner¹; Maike Gold¹, Ph.D.; David Mengel; Richard Dodel; Jan-Philipp Bach: "The endogenous $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor antagonist kynurenic acid modulates amyloid- β -induced inflammation in BV-2 microglial cells", Journal of the Neurological Science (2014)

¹ Equal contributors

8.5 Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dodel für das Vertrauen bedanken in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen. Herzlichen Dank für die Unterstützung und die gnadenlosen aber stets hilfreichen Korrekturen meiner schriftlichen Arbeiten.

Zudem gilt mein großer Dank Herrn Dr. Jan-Philipp Bach. Vielen Dank für die kritischen aber auch immer motivierenden Worte, den unerschütterlichen Optimismus und vor allem für den Ideenreichtum und die häufige persönliche Präsenz bei der Betreuung meiner Arbeit.

Frau Dr. Maike Gold danke ich ganz besonders für die lustigen und auch ernstesten Labor-Gespräche, für ihre unerschöpfliche Geduld beim Rechnen von Konzentrationen und für das stets offene Ohr bei Fragen und Problemen aller Art. Schön, dass aus Laborkollegschaft Freundschaft geworden ist!

Lieben Dank an Frau Dr. Yvonne Röttger, Charlotte Plaschka, Hanno Schenker und Steffen Pöttgen für viele gemeinsame Kaffeepausen, fantastische Stunden in der Mensa und an vielen anderen Orten Marburgs. Durch euch gerieten frustrane Versuchsergebnisse schnell in den Hintergrund!

Vielen Dank an Christine Forbach und Susanne Stei für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Ein ganz besonders großer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die nicht nur während meiner Dissertation in allen Bereichen und Lebenslagen liebevoll unterstützend an meiner Seite waren und sind.

Lieben Dank auch an meine Großeltern, die mir immer das Gefühl geben alles genau richtig zu machen.

Lieber Felix, Dir danke ich sehr für Deine Unterstützung, Dein Verständnis, Deine Geduld, Deine Gabe mich immer wieder zu erden und stets zu motivieren und ganz besonders dafür, dass Du immer für mich da bist!