

Klinik und Poliklinik für Neurologie

Inauguraldissertation

**MODULATION ENZYMATISCHER
STICKOXIDSYNTHESEN IN ZELLULÄREN
UND MURINEN MODELLEN DER
ALZHEIMER-KRANKHEIT**

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

vorgelegt von

Michael Hermes

aus

Emsdetten

Bonn 2012

Gutachter

Erstgutachter: Prof. Dr. M. T. Heneka

Zweitgutachter: Prof. Dr. D. O. Fürst

Dekan: Prof. Dr. U.-G. Meißner

Tag der Promotion: 16. Mai 2012

Erscheinungsjahr: 2012

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ein Teil der im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten sind in Fachzeitschrift „Neuron“ unter dem Titel „Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid β aggregation and plaque formation“ (Kummer, Hermes *et al.*, 2011) veröffentlicht.

Diese Dissertation wird auf dem Hochschulschriftenserver der Universitäts- und Landesbibliothek Bonn (http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Widmung

Meiner Frau Maria, meinen Töchtern Marie, Joana und Annika sowie meinen Eltern gewidmet.

Vielen Dank für all die Unterstützung!

Zusammenfassung

Die induzierbare Form der Stickoxidsynthase (iNOS) wird bei entzündlichen Stimuli transkriptionell hochreguliert und kann in Gehirnen von Patienten mit *Morbus Alzheimer* (AD; „Alzheimer’s disease“, auch Alzheimer-Demenz) nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der genetischen oder pharmakologischen Ausschaltung der iNOS in Amyloid-Vorläuferprotein/Präsenilin1 (APP/PS1; „amyloid precursor protein/presenilin1“-transgenen Mäusen auf das räumliche Gedächtnis, die hippokampale Langzeitpotenzierung (LTP; „long term potentiation“), amyloide Pathologie, Astroglie sowie den neuronalen Verlust hin untersucht. Ebenfalls wurde die Aktivität Amyloid β -degradierender Enzyme sowie synaptosomaler Mitochondrien und deren Modifikationen durch Stickstoffmonoxid (NO) analysiert. APP/PS1-tg iNOS^(-/-) Mäuse sowie Mäuse, die mit dem iNOS-spezifischen Inhibitor L-N⁶-(1-iminoethyl)-Lysin (L-NIL) behandelt wurden, zeigten sowohl im Alter von drei, als auch zwölf Monaten im Radialarm-Labyrinth eine signifikante Reduktion von Arbeitsgedächtnis- und Referenzgedächtnisfehlern. Ebenso konnte eine Verbesserung der LTP oben genannter Tiere verglichen mit rein APP/PS1 transgenen Tieren zum Zeitpunkt von drei Monaten gezeigt werden. Darüber hinaus konnte im Alter von zwölf Monaten sowohl mittels „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) eine signifikante Reduktion der Amyloid- β (A β)-Menge sowohl in den entsprechenden Ganzhirn-Lysaten, als auch mittels Thioflavin-S-Färbung sowie A β -Antikörper-Immunofluoreszenzfärbung in der Großhirnrinde und im *Hippocampus* nachgewiesen werden. Immunohistologische Untersuchungen zeigten des Weiteren, dass APP/PS1-tg iNOS^(-/-) Mäuse, verglichen mit APP/PS1-transgenen Tieren, eine reduzierte „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) Expression, jedoch eine erhöhte „neuronal nuclei“ (NeuN) Immunoreaktivität im Alter von zwölf Monaten in den genannten Gehirnregionen aufweisen. Korrespondierend zu dem Nachweis nitrosylierten Glukose-regulierten Proteins 75 (GRP 75) ließ sich eine reduzierte Aktivität synaptosomaler Mitochondrien durch Zugabe von NO (-Derivat)-Donoren *in vitro* nachweisen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Expression von iNOS zu einer Verschlechterung der AD-Symptome wie neuropathologische Veränderungen, kognitive Leistung und der damit verbundenen elektrophysiologischen Parameter in diesem etablierten Modell der AD führt. Da die pharmakologische Inhibition der

iNOS identische Effekte wie der genetische „knock out“ zeigt, könnte iNOS zukünftig als therapeutisches Ziel zur Behandlung der AD dienen.

Abstract

The inducible form of the nitric oxide synthase (iNOS), is transcriptionally upregulated in response to inflammatory stimuli and can be found in the brains of patients suffering from Alzheimer's disease (AD). In this study we determined the effects of iNOS deficiency in amyloid precursor protein/presenilin1 (APP/PS1) transgenic mice on spatial memory, hippocampal long term potentiation (LTP), amyloid pathology, astrogliosis and neuronal loss. Additionally, the activity of amyloid β -degrading enzymes as well as of synaptosomal mitochondria and their modifications by nitric oxide (NO) was determined. APP/PS1-tg iNOS^(-/-) mice as well as APP/PS1-tg mice treated with the iNOS inhibitor L-N⁶-(1-iminoethyl)-lysine (L-NIL), showed a significant reduction of working memory and reference memory errors in the radial arm maze-test at three and twelve months of age as well as improvement of LTP at three months of age. Furthermore, APP/PS1-tg iNOS^(-/-) mice revealed decreased amyloid β (A β) burden at twelve months, as detected by thioflavin-S and A β -antibody immunostaining. A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ levels in brain extracts of these mice were reduced as assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunohistochemical staining also demonstrated that APP/PS1-tg iNOS^(-/-) mice had a reduced glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression, while neuronal nuclei (NeuN) immunoreactivity was increased when compared to APP/PS1-tg mice. Corresponding to the detection of nitrosylated glucose-regulated protein 75 (GRP 75), a lowered activity of synaptosomal mitochondria by NO (-derivative)-donors could be found *in vitro*. These results suggest that iNOS expression aggravates AD like neuropathological changes, cognitive performance and related electrophysiological parameters in an established animal model of AD. Since pharmacological iNOS inhibition showed identical effects than iNOS gene deficiency, iNOS may serve as a future therapeutic target in AD.

Schlagworte

Alzheimer-Krankheit; iNOS; pharmakologische Inhibition; Stickstoffmonoxid; kognitive Defizite; Langzeitpotenzierung; L-NIL; Nitrierung / Nitrosylierung; Modulation synatosomaler Aktivität

Keywords

Alzheimer's disease; iNOS; pharmacological inhibition; nitric oxide; cognitive deficits; long term potentiation; L-NIL; nitration / nitrosylation; modulation of synaptosomal activity

Inhaltsverzeichnis

GUTACHTER	II
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	III
WIDMUNG	IV
ZUSAMMENFASSUNG	V
ABSTRACT	VI
SCHLAGWORTE	VII
KEYWORDS	VII
INHALTSVERZEICHNIS	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
TABELLENVERZEICHNIS	XI
ANHANGSVERZEICHNIS	XII
EINHEITEN- UND ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XV
VORWORT	XXI
1 EINLEITUNG	1
1.1 HISTOPATHOLOGISCHE ASPEKTE	2
1.1.1 <i>Tangles</i>	2
1.1.2 <i>Plaques</i>	3
1.2 DIE GENERATION VON AMYLOID-B	5
1.2.1 <i>α-sekretorischer Weg</i>	8
1.2.2 <i>Amyloidogener Weg</i>	8
1.2.3 <i>Amyloid-β-, Clearance“ oder -Fibrillierung</i>	10
1.3 GENETISCHE ASPEKTE	11
1.3.1 <i>Down Syndrom und Mutationen im APP-Gen</i>	12
1.3.2 <i>Mutationen in den Presenilin-Genen</i>	14
1.4 ENTZÜNDLICHE PROZESSE	15
1.4.1 <i>Zelluläre Beteiligung des Nervensystems</i>	15
1.4.2 <i>Das Komplement-System</i>	16
1.4.3 <i>Zytokine, Chemokine und Prostanoid</i>	17
1.4.4 <i>Antiinflammatorische Therapieansätze</i>	19
1.5 VERWENDETE TIERMODELLE UND ZIEL DER ARBEIT	20
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 TIERMATERIAL	22
2.1.1 <i>Amyloid-Vorläuferprotein/Präsenilin1-transgene Tiere</i>	22

2.1.2	<i>induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase-defiziente Tiere</i>	22
2.1.3	<i>Pharmakologische Inhibition der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase</i>	23
2.1.4	<i>Genotypisierung und Kreuzung</i>	24
2.2	VERHALTENS BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	26
2.2.1	<i>„Open field“</i>	26
2.2.2	<i>Radiales 8-Arm-Labyrinth</i>	27
2.3	EXPLANTATION DER GEHIRNE NACH ABSCHLUSS DER VERHALTENS BIOLOGISCHEN EXPERIMENTE	29
2.3.1	<i>RIPA- und SDS-Extraktion zur Aβ-Detektion</i>	29
2.3.2	<i>Isolation von Synaptosomen für proteinchemische Untersuchungen</i>	30
2.3.3	<i>Isolation synaptosomaler Mitochondrien zur Aktivitätsbestimmung</i>	31
2.4	ZELLKULTUR.....	32
2.4.1	<i>Kultivierung der Mausfibroblastenzelllinie</i>	32
2.4.2	<i>Isolation primärer Mikroglia</i>	32
2.4.3	<i>Phagozytoseassay</i>	33
2.5	HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	35
2.5.1	<i>Anfertigung der Gefrierschnitte</i>	35
2.5.2	<i>Thioflavin-S-Färbung</i>	35
2.5.3	<i>Immunhistochemische Färbungen</i>	36
2.5.4	<i>Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung, Dokumentation und Analyse</i>	38
2.6	LANGZEITPOTENZIERUNG <i>IN VITRO</i>	39
2.7	PROTEINBIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	40
2.7.1	<i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	40
2.7.2	<i>„Western blot“</i>	40
2.7.3	<i>Immunpräzipitation zur Maldi-TOF-Massenspektrometrie</i>	42
2.7.4	<i>Coomassie-Färbung</i>	42
2.7.5	<i>„Enzyme-linked immunosorbent assay“</i>	43
3	ERGEBNISSE	44
3.1	VERHALTENS BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	44
3.1.1	<i>„Open field“</i>	44
3.1.2	<i>Radiales 8-Arm-Labyrinth</i>	44
3.2	LANGZEITPOTENZIERUNG <i>IN VITRO</i>	47
3.3	ANALYSE DER MENGEN VON AB UND ANDEREN PROTEINEN IN GANZHIRN-HOMOGENATEN .	49
3.3.1	<i>„Enzyme-linked immunosorbent assay“</i>	49
3.3.2	<i>„Western blot“-Detektion</i>	50
3.4	HISTOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG	53
3.4.1	<i>Aβ-Level in situ</i>	53
3.4.2	<i>Aβ / CD11b Co-Lokalisation in situ</i>	55
3.4.3	<i>Gliale und neuronale Immunreaktivität</i>	57
3.5	DEGRADATION DES AB.....	59

3.5.1	<i>In vitro</i> Phagozytose primärer Mikroglia.....	59
3.5.2	Aktivität A β -degradierender Enzyme <i>in vitro</i>	60
3.6	SYNAPTOSOMALE MODIFIKATIONEN.....	62
3.6.1	Nitrierung und Nitrosylierung synaptosomaler Proteine.....	62
3.6.2	Aktivität synaptosomaler Mitochondrien.....	64
4	DISKUSSION	65
4.1	NO-MEDIERTE, iNOS-ABHÄNGIGE ASPEKTE NEURODEGENERATIVER ERKRANKUNGEN	65
4.2	iNOS-INHIBITOREN - WIRKSAMKEIT UND SICHERHEIT ALS HUMANMEDIZINISCHE ARZNEIMITTEL.....	66
4.3	REDUZIERUNG KOGNITIVER DEFIZITE.....	67
4.4	PROTEKTION DER LANGZEITPOTENZIERUNG.....	69
4.5	NO-BEDINGTE SYNAPTOSOMALE MODIFIKATIONEN	69
4.6	AB-REDUKTION UND PRÄVENTION AMYLOIDER ABLAGERUNGEN	70
4.7	ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNG UND AUSBLICK	72
	ANHANG	75
	DANKSAGUNG	CIV
	LITERATUR	CVI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Schema der Progression neurofibrillärer Pathologien, modifiziert nach Braak und Braak, 1991b.....	2
Abbildung 1-2:	Schema der Progression amyloider Plaques, modifiziert nach Braak und Braak, 1991b	4
Abbildung 1-3:	Klassische Amyloid-Plaques im Gehirn einer APP und PS1 (APP/PS1)-transgenen Maus im Alter von zwölf Monaten.....	5
Abbildung 1-4:	Prozessierungswege des Amyloid- Vorläuferproteins	7
Abbildung 1-5:	Überblick über mögliche "pathways" zur entweder A β -„Clearance“ oder Fibrillierung und Plaquebildung	10
Abbildung 1-6:	Bekannte Mutationen des APP.....	13
Abbildung 2-1:	Kreuzungsschema zur Generation der APP/PS1-tg / iNOS ^(-/-) -Tiere.....	23
Abbildung 2-2:	Schematische Darstellung des verwendeten radialen 8-Arm-Labyrinths und der Verteilung der visuellen Orientierungsmarken (Cues) sowie der mit Kondensmilch bestückten Näpfen (Bait).....	28
Abbildung 3-1:	Arbeitsgedächtnis- und Referenzgedächtnisfehler (WME, „working memory error“ und RME, „reference memory error“) drei und zwölf Monate alter Tiere	45

Abbildung 3-2: Mittelwerte der prozentualen fEPSP-Werte (Amplitude und Steigung) der untersuchten Gruppen nach LTP-Induktion	47
Abbildung 3-3: Mittelwerte der prozentualen fEPSP-Werte (Amplitude und Steigung) der untersuchten Gruppen bei sowie Mittelwerte nach zehn Minuten und 60 Minuten nach LTP-Induktion	48
Abbildung 3-4: Absolute und relative A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂ -Mengen APP/PS1-transgener und APP/PS1-tg iNOS ^(-/-) Tiere im Alter von drei und zwölf Monaten	50
Abbildung 3-5: „Western blot“-Detektion verschiedener Peptide und Proteine aus Homogenaten APP/PS1-transgener und APP/PS1-tg iNOS ^(-/-) Tiere.....	51
Abbildung 3-6: Quantifizierung der Banden aus Abbildung 3-5: „Western blot“-Detektion verschiedener Peptide und Proteine aus Homogenaten APP/PS1-transgener und APP/PS1-tg iNOS ^(-/-) Tiere	52
Abbildung 3-7: Thioflavin-S-gefärbte <i>Hippocampi</i> (Hc) und <i>Cortices</i> (Cx) zwölf Monate alter Tiere (APP/PS1 und APP/PS1 iNOS ^(-/-)) <i>in situ</i>	54
Abbildung 3-8: Unlösliche (a) Thioflavin-S) und lösliche (b) A β -Antikörper 2964) A β -Mengen zwölf Monate alter Tiere (APP/PS1 und APP/PS1 iNOS ^(-/-)) <i>in situ</i>	55
Abbildung 3-9: Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenzen von A β und CD11b eines zwölf Monate alten APP/PS1-transgenen Tieres <i>in situ</i>	56
Abbildung 3-10: Co-Lokalisation von Mikroglia (CD11b) und A β -Plaques (A β -Antikörper 2964) bei zwölf Monate alten Tiere (APP/PS1 und APP/PS1 iNOS ^(-/-)).....	57
Abbildung 3-11: Gliale [a) GFAP] und neuronale [b) NeuN] Immunreaktivität zwölf Monate alter Tiere (APP/PS1 und APP/PS1 iNOS ^(-/-)) <i>in situ</i>	58
Abbildung 3-12: Phagozytose PMG normalisiert.....	59
Abbildung 3-13: Phagozytose primärer Mikroglia bei Zugabe verschiedener Stimuli.....	60
Abbildung 3-14: Enzymaktivität von Neprilysin und IDE unter NO.....	61
Abbildung 3-15: Separation nitrosylierter Proteine zur massenspektrometrischen Untersuchung	62
Abbildung 3-16: Identifikation nitrosylierten GRP 75 in Synaptosomen	63
Abbildung 3-17: O ₂ -Verbrauch synaptosomaler Mitochondrien ohne Stimulation sowie nach Exposition gegenüber 10 μ M SIN-1 oder 10 μ M ONOO.....	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Kalkulationen zur Determination der applizierten L-NIL-Menge und -Konzentration... 24	24
Tabelle 2-2: Konzentrationen der Stimuli und des fluoreszierenden A β	34
Tabelle 2-3: Verwendete Antikörper	41

Anhangsverzeichnis

I - Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Rezeptur 1: aCSF* - Medium für die LTP-Messungen.....	75
Rezeptur 2: Coomassie-Färbung - Anfärbung von Proteinbanden für die Maldi-TOF-MS	75
Rezeptur 3: Homogenisations- & Gradientenpuffer - Proteinbiochemie.....	76
Rezeptur 4: Homogenisationspuffer - synaptosomale Mitochondrien.....	76
Rezeptur 5: Lysispuffer (nicht-ionisch) - Proteinase K-Verdau * der Schwanzbiopsien.....	76
Rezeptur 6: PBS*(T)** - Trypsinisierung von Zellen in Kultur sowie für die Histologie	77
Rezeptur 7: RIPA* Puffer - Lysis der Proben für die PAGE	77
Rezeptur 8: Synaptosomenpuffer zur Isolation synaptosomaler Fraktionen	77
Rezeptur 9: TBE* - Laufpuffer und flüssige Phase des Agarose-Gels zur DNA-Separation.....	77
Rezeptur 10: TBS*(T)** - Waschen und Blocken der Blot-Membranen.....	78
Rezeptur 11: TG* - “Western blot”-Transfer	78

II - Supplementäre Abbildungen

Suppl. Abbildung 1: „Open field“ Untersuchung - Design und Auswerteparameter	79
Suppl. Abbildung 2: Radiales 8-Arm-Labyrinth - Design und Projektion der Tier-Koordinaten einer Sitzung.....	80
Suppl. Abbildung 3: „Open field“ - MW und SEM der „Centertime“-, „Cornertime“-, „Corridortime“- und „Gridchange“-Werte der drei Monate alten Tiere.....	81
Suppl. Abbildung 4: „Open field“ - MW und SEM der „Centertime“-, „Cornertime“-, „Corridortime“- und „Gridchange“-Werte der zwölf Monate alten Tiere.....	82
Suppl. Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Wahl der Regionen von Interesse (ROI, „region of interest“; rote Linie) an Thioflavin-S-gefärbten Schnitten zwölf Monate alter APP/PS1-transgener Tiere (a) <i>Hippocampus</i> (Hc), b) <i>Cortex</i> (Cx).....	83
Suppl. Abbildung 6: Blotauswertungen der zwölf Monate alten Tiere	83

III - Supplementäre Tabellen

Suppl. Tabelle 1: Determination des durchschnittlichen Körpergewichts sowie des durchschnittlichen Wasserverbrauchs der mit L-NIL zu behandelnden APP/PS1-tg-Mäuse.....	84
Suppl. Tabelle 2: PCR-Bedingungen zur Genotypisierung der verwendeten Genotypen.....	85
Suppl. Tabelle 3: „Open field“ - MW und SEM der drei Monate alten Tiere.....	86
Suppl. Tabelle 4: „Open field“ - MW und SEM der zwölf Monate alten Tiere.....	87

Suppl. Tabelle 5: Radiales 8-Arm-Labyrinth - „ANOVA“ und „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“ der WME-AUC-Werte der drei Monate alten Tiere.....	88
Suppl. Tabelle 6: Radiales 8-Arm-Labyrinth - „ANOVA“ und „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“ der RME-AUC-Werte der drei Monate alten Tiere.....	89
Suppl. Tabelle 7: Radiales 8-Arm-Labyrinth - „ANOVA“ und „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“ der WME-AUC-Werte der zwölf Monate alten Tiere.....	90
Suppl. Tabelle 8: Radiales 8-Arm-Labyrinth - „ANOVA“ und „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“ der RME-AUC-Werte der zwölf Monate alten Tiere.....	91
Suppl. Tabelle 9: Langzeitpotenzierung - „ANOVA“, „Bartlett’s test for equal variances“ und „Turkey’s Multiple Comparison Test“ der prozentualen Amplitudenänderung 10 Minuten nach Induktion	92
Suppl. Tabelle 10: Langzeitpotenzierung - „ANOVA“, „Bartlett’s test for equal variances“ und „Turkey’s Multiple Comparison Test“ der prozentualen Amplitudenänderung 60 Minuten nach Induktion	93
Suppl. Tabelle 11: Langzeitpotenzierung - „ANOVA“, „Bartlett’s test for equal variances“ und „Turkey’s Multiple Comparison Test“ der prozentualen Steigungsänderung 10 Minuten nach Induktion	94
Suppl. Tabelle 12: Langzeitpotenzierung - „ANOVA“, „Bartlett’s test for equal variances“ und „Turkey’s Multiple Comparison Test“ der prozentualen Steigungsänderung 60 Minuten nach Induktion	95
Suppl. Tabelle 13: A β -ELISA - „Student’s t-test“, MW und SEM der APP/PS1 und APP/PS1 iNOS ^(-/-) Tiere	96
Suppl. Tabelle 14: „Western blot“-Detektion von A β aus Homogenaten von APP/PS1-transgenen und APP/PS1-tg iNOS ^(-/-) Tieren - „Paired two-tailed t-test“	96
Suppl. Tabelle 15: (Immun)- histochemische Untersuchungen - „Student’s t-test“, MW und SEM der APP/PS1 und APP/PS1 iNOS ^(-/-) Tiere	97
Suppl. Tabelle 16: Immunhistochemische Detektion von A β (AK 2964) und CD11b - „ANOVA“, „Bartlett’s test for equal variances“ und „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“ der <i>Hippocampi</i> APP/PS1-tg und APP/PS1 iNOS ^(-/-) Tiere	98
Suppl. Tabelle 17: Immunhistochemische Detektion von A β (AK 2964) und CD11b - „ANOVA“, „Bartlett’s test for equal variances“ und „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“ der <i>Cortices</i> APP/PS1-tg und APP/PS1 iNOS ^(-/-) Tiere	100
Suppl. Tabelle 18: Phagozytose primärer Mikroglia aus WT und iNOS ^(-/-) Tieren - „Paired two-tailed t-test“	101
Suppl. Tabelle 19: Phagozytose primärer Mikroglia bei verschiedenen Stimuli - „ANOVA“ und „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“	102

Suppl. Tabelle 20: Für Immunpräzipitationen synaptosomaler Proteine verwendete Antikörper 103

Einheiten- und Abkürzungsverzeichnis

3' / 5'	[sprich: drei <i>Strich</i> / fünf <i>Strich</i>] (Desoxy-)Ribosen-Kohlenstoffposition der Phosphatgruppe eines Nukleotids; auch: Polarität und Orientierung eines DNA/RNA-Stranges
5-FAM	5-Carboxyfluoreszein
6-OHDA	Oxidopamin
α 2M	α -2-Makroglobulin
aCSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
A β _(1-40/42)	Amyloid- β -Peptid (mit 40 respektive 42 Aminosäuren Länge)
AD	Alzheimer-Demenz; auch „Alzheimer’s disease“, Alzheimer-Krankheit, <i>Morbus Alzheimer</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ADAM	„a disintegrin and metalloproteinase“, ein Disintegrin und eine Metalloproteinase
AG	Arbeitsgruppe
AICD	„amyloid intracellular domain“, amyloide, intrazelluläre Domäne
AK	Antikörper
Ala	Alanin
ANOVA	„One-way analysis of variance“
AP-1	Aktivator Protein-1
Aph-1	„anterior pharynx defective, homolog of , 1“
APLP ^(-/-)	„amyloid precursor like protein“, Amyloid-Vorläufer-ähnliches Protein [-defizient]
Apo E	Apolipoprotein E
APP ^(-/-)	„amyloid precursor protein“, Amyloid-Vorläuferprotein [-defizient]
APP/PS1 ^{(-/-)/(+/+)}	„amyloid precursor protein/presenilin 1“, Amyloid-Vorläuferprotein /Präsenilin 1[-defizient / -transgen]
APP/PS1-tg	„amyloid precursor protein/presenilin 1-transgene/transgenic“, Amyloid-Vorläuferprotein /Präsenilin 1-transgen
APP _{sw}	Schwedische APP-Mutante
Arc	„activity-regulated cytoskeleton-associated protein“, Aktivitäts-reguliertes Zytoskelett-assoziertes Protein
Art. Nr.	Artikelnummer
AS	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
AUC	„area under the curve“, Integral
BACE	„ β -site APP cleaving enzyme“, β -Sekretase
bp	Basenpaare
BCA	„bicinchoninic acid“, Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
BST	basale synaptische Transmission
°C	Grad Celsius
C	Cystein

C1q	„complement 1q“, Komplementfaktor 1q
C3	„complement 3“, Komplementfaktor 3
ca.	<i>circa</i> , etwa
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CamK II	Ca ²⁺ /calmodulin-abhängige Protein Kinase II
Cb	<i>Cerebellum</i>
Cc	<i>Corpus callosum</i>
CC(L/R)	β-Chemokin (Ligand) und Rezeptor mit CC-Motiv
CD-14	cluster of differentiation-14“
cDNA	„complementary DNA“, komplementäre DNA
CGA	Chromagranin A
cGMP	„cyclic guanosine monophosphate“, zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
COX	Cyclooxygenase
CSF	„colony stimulating factor“, koloniestimulierender Faktor
CTF	C-terminales Fragment
Cx	<i>Cortex</i> , Großhirnrinde
CX ₃ C(L/R)	γ-Chemokin (Ligand) und Rezeptor mit CX ₃ C-Motiv
CXC(L/R)	α-Chemokin (Ligand) und Rezeptor mit CXC-Motiv
Δ	<i>delta</i> , Differenz zweier Werte
ΔE9	Delta-Exon 9 Mutante des PS1
d	<i>diem</i> , Tag
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DMEM	„Dulbecco’s modified eagle medium“
DNA	„deoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholsäure
Drp1	„dynamin-related protein 1“, Dynamin-ähnlichen Proteins 1
DTT	Dithiothreitol
ebd.	ebenda
ECL	„enhanced chemiluminescence“, verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
eNOS	„endothelial nitric oxide synthase“, endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
EOFAD	„early onset familial Alzheimer’s disease“, frühe familiäre Alzheimer-Demenz
ER	endoplasmatisches Retikulum
etc.	<i>et cetera</i> , und so weiter
F	F-Wert-Verhältnis zweier Mittelwertquadrate
F(ab’)	„fragment antigen-binding“, Antigen-bindendes Fragment
FAD	familiäre Alzheimer-Demenz
Fc	„fragment crystallizable“, kristallisierbares Fragment
FCS	„fetal calf serum“, fötales Kälberserum
fEPSP	feld-exzitatorisches postsynaptisches Potential
FG	Freiheitsgrade
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
GFAP	„glial fibrillary acidic protein“, saures Gliafaserprotein

GRP	Glukose-reguliertes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	„Hanks' buffered salt solution“, Hanks' gepufferte Salzlösung
Hc	<i>Hippocampus</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HG	„high glucose“, 1000 mg/l Glukose in DMEM („Dulbecco's modified eagle medium“)
HRP	„horse raddish peroxidase“, Merrettich-Peroxidase
HSP	Hitze-Schock Protein
Hz	Hertz
IDE	Insulin-degradierendes Enzym
ie.	<i>id est</i> , das heißt
IFG	Integrierte Funktionelle Genomik (Serviceeinheit des IZKF Münster)
IFN	Interferon
IL	Interlaukin
iNOS ^(-/-)	„inducible nitric oxide synthase“, induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase[-defizient]
IVC	„individually ventilated cages“, individuell ventilierte Käfige
IZKF	Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung
Jnk 1	c-Jun N-terminale Kinase 1
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kHz	Kilohertz
l	Liter
LC	<i>Locus coeruleus</i>
Leu	Leucin
L-NIL	L-N ⁶ -(1-iminoethyl)-Lysin
LOAD	„late onset Alzheimer's disease“, späte Alzheimer-Demenz
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	Lipoprotein Rezeptor-verwandtes Protein
LTP	„long term potentiation“, Langzeitpotenzierung
Lys	Lysin
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol pro Liter
MΩ	Megaohm
M	Mol pro Liter
mA	Milliampere
MAC	„membrane attack complex“, Membranangriffskomplexes
Maldi-TOF-MS	„matrix-assisted laser desorption / ionization time of flight mass spectrometry“, Matrix-unterstützte Laser-Desorption / Ionisation Flugzeitmassenspektrometrie
MAPK 1	MAPK 1 Mitogen-aktivierte Protein Kinase 1
max.	maximal; Maximum
Met	Methionin

mg	Milligramm
min	Minute(n)
min.	minimal; Minimum
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol pro Liter
MM	„mastermix“,
MΩ	Megaohm
MW	Mittelwert
MW ²	Mittelwertquadrat
MWM	„Morris watermaze“, Morris-Wasserlabyrinth
n	Anzahl
NaVO ₃	Natriumorthovanadat
NB	<i>Nucleus basalis</i>
NC	Nitrocellulose
NDS	„normal donkey serum“, normales Eselserum
NeuN	„neuronal nuclei“
NFκB	„nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“, Transkriptionfaktor κB
nm	Nanometer
nM	Nanomol pro Liter
NMDA	N-Methyl D-Aspartat
NMDA-R	N-Methyl D-Aspartat-Rezeptor
nNOS	„neuronal nitric oxide synthase“, neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	„nitric oxide“, Stickstoffmonoxid
NOS	„nitric oxide synthase“, Stickstoffmonoxid-Synthase
ns	nicht signifikant
NSAID	„non-steroidal antiinflammatory drug“
NTF	N-terminales Fragment
NY	Nitrotyrosin
o.	oder
o.g.	oben genannte(n/r)
ONOO	Peroxynitrit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAPA-NONOat	(Z)-1-[N-3-aminopropyl]-N-(n-propyl)amino]diazen-1-ium-1,2-dolat
PBS(T)	„phosphate buffered saline“, phosphatgepufferte Salzlösung (mit 0,1 % Triton [®] X-100)
PD	„Parkinson's disease“, Parkinson-Erkrankung
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ , Prostazyklin
PEN2	„presenilin enhancer 2“, Präsenilin Verstärker2
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
Phe	Phenylalanin
PHP	„paired helical filaments“, gepaarte helikale Filamente
PIC	Proteasen-Inhibitor-Cocktail

PKC	Proteinkinase C
PLL	Poly-L-Lysin
PMG	primäre Mikroglia
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor γ
PPF	“paired pulse” Faszilitierung
PrP	Prion-Protein
PS(1/2) ^(-/-)	Präsenilin (1/2) [-defizient]
PSD 95	„post-synaptic density protein“
PVDF	Polyvinylidenfluorid
q	Verhältnisswert
R ²	Bestimmtheitsmaß
rcf	„relative centrifugal force“, Relative Zentrifugalbeschleunigung
resp.	respektive
RIPA	„radio immunoprecipitation assay“, Röntgenimmunopräzipitations-Untersuchung
RME	„reference memory error“, Referenzgedächtnisfehler
RNA	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
ROI	„region of interest“, Region von Interesse
ROS	„reactive oxygen species“
rpm	„revolutions per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Σ^2	Summenquadrat
s	Sekunde
s.	siehe
SAA	systemisches Amyloid A
sAPP α	nicht-amyloidogenes, lösliches APP („soluble APP“), Spaltprodukt der α -Sekretase
sAPP β	nicht-amyloidogenes, lösliches APP („soluble APP“), Spaltprodukt der β -Sekretase
SDS	„sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulfat
SEM	„standard error of mean“, Standardfehler
sGC	„soluble guanylate cyclase“, lösliche Guanylatcyclase
SIN-1	3-Morpholino-Sydnonimin
SNAP	S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin
SNO-C	S-Nitroso-Cystein
SNP	„sodium nitroprusside“, Natrium Nitroprussid
STAT	„signal transducers and activators of transcription“, Signaltransduktoren und Transkriptionsaktivatoren
suppl. / Suppl.	supplementär; Supplement
T	Zeit
TACE	„Tumour necrosis factor α converting enzyme“, TNF α -konvertierendes Enzym
TBS(T)	„Tris buffered saline“, Tris-gepufferte Salzlösung (mit 0,1 % Tween-20)
Tc	<i>Truncus cerebri</i>
TG	Tris-Glycin-Puffer
TGF β	„transforming growth factor β “, transformierender Wachstumsfaktor β
Temp	Temperatur

TMB	Trimethylbenzidin
TMPD	Tetramethylphenylendiamin
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem/ anderen
UKB	Universitätsklinikum Bonn
UKM	Universitätsklinikum Münster
U.S.A.	„United States of America“, Vereinigte Staaten von Amerika
UV Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
Val	Valin
VAMP	Vesikel-assoziiertes Membran Protein
vs	<i>versus</i> , gegen
% (v/v)	„% volume per volume“, Volumenprozent
WB	„Western blot“
WME	„working memory error“, Arbeitsgedächtnisfehler
WT	Wildtyp
% (w/v)	„% weight per volume“, Gewichtsprozent
WWU	Westfälische Wilhelms-Universität
ZNS	zentrales Nervensystem

Vorwort

Morbus Alzheimer, erstmals 1907 von Alois Alzheimer beschrieben, ist klassisch charakterisiert durch pathologische Veränderungen im Gehirn insbesondere von Menschen im Alter von über 65 Jahren. Diese manifestieren sich zum einen durch extrazelluläre Aggregate, sogenannte „Plaques“, bestehend aus APP („amyloid precursor protein“, Amyloid-Vorläuferprotein) Proteinfragmenten verschiedener Länge (u.a. A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂) und zum anderen durch Neurofibrillen („Tangles“), primär intra- und später extrazelluläre, faserartige Aneinanderlagerung des Tau-Proteins.

Kognitiv sind unter anderem Störungen des Kurz- und Langzeitgedächtnisses sowie Wortfindungsstörungen und Persönlichkeitsveränderungen kennzeichnend.

Durch das zunehmende Durchschnittsalter der Weltbevölkerung sowie der Bevölkerungszunahme insgesamt, werden sich Demenzerkrankungen in Zukunft zu einer der häufigsten und kostenintensivsten Erkrankungen weltweit entwickeln, je nach Schätzung mit einer Prävalenz von über 50 Millionen Betroffenen.

Die Erforschung der Ursachen dieser somit bedeutender werdenden Erkrankung, insbesondere die Erforschung der Entstehung und der daraus resultierenden möglichen Prävention, haben daher hohen Stellenwert für das Gesundheitssystem und somit auch für die zukünftige, allgemeine Lebensqualität.

Die vorliegende Arbeit soll helfen, die Ursachen der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung zu verstehen und somit der Entwicklung wirksamer Therapien Vorschub zu leisten.

1 Einleitung

Im Jahr 1907 gelang es Alois Alzheimer, im Rahmen der Beschreibung einer neurodegenerativen, progressiven Demenzerkrankung (*Morbus Alzheimer*), erstmals den Verlust kognitiver Fähigkeiten mit pathologischen Veränderungen des Gehirns zu korrelieren [Alzheimer, 1907]. Charakteristisch für diese Pathologien waren Amyloidablagerungen (so genannte „Plaques“), extrazelluläre Neurofibrillen (Aneinanderlagerungen des Tau-Proteins) und allgemein die neuronale Degeneration des Gehirns. Einhergehend mit den bereits früh einsetzenden Defiziten des Kurzzeitgedächtnisses treten sukzessive Störungen des Langzeitgedächtnisses, des räumlichen und zeitlichen Orientierungsvermögens, Halluzinationen sowie der Verlust logischen Denkens hinzu [Ferris und Kluger, 1997; Geldmacher und Whitehouse, 1997; Bracco *et al.*, 1998]. Jedoch sind Progression der kognitiven Defizite, als auch Dauer der Krankheit hochvariabel zwischen einzelnen Patienten [Reisberg, 1996; Wisniewski *et al.*, 1998]. Klinische Untersuchungsmöglichkeiten sind hierbei auf neuropsychologische Tests sowie bilddiagnostische Verfahren beschränkt. Die endgültige Diagnose kann erst *post mortem* im Rahmen einer histopathologischen Obduktion gestellt werden [Hendriks und Van Broeckhoven, 1996]. Insgesamt liegt die Rate der korrekten Vordiagnosen mittlerweile durch Verbesserungen der Methodik bei ca. 90 % [Vasto *et al.*, 2008].

Prognosen des „World Alzheimer’s Report 2009“ zufolge wird sich die Anzahl der Menschen mit einer Demenzerkrankung von 35,56 Millionen im Jahr 2010 auf 115,38 Millionen im Jahr 2050 mehr als verdoppeln [Prince *et al.*, 2009]. Mit einer, für die Vereinigten Staaten von Amerika ermittelten, Häufigkeit von 67 Fällen pro 1.000 Einwohner [Hirtz *et al.*, 2007] und unter Berücksichtigung der von Hebert *et al.*, 2003 ermittelten Zunahme der Inzidenz, insbesondere bei Menschen über 85 Jahre ist *Morbus Alzheimer* mit 50-70% die häufigste Form der Altersdemenz [Rocca *et al.*, 1991]. Dass das Alter als Hauptrisikofaktor für *Morbus Alzheimer* allein jedoch nicht notwendigerweise zur Entwicklung einer Demenz führen muss, zeigt der Fall einer 115-jährigen Frau in den Niederlanden [den Dunnen *et al.*, 2008]: Neurologische Untersuchungen im Alter von 112-113 Jahren zeigten bei ihr, ebenso wie histopathologische Untersuchungen *post mortem*, vergleichbare Werte wie die von gesunden Vergleichspersonen im Alter von 60-75 Jahren (psychologische Untersuchungen), respektive 60-80 Jahren (Amyloid β -

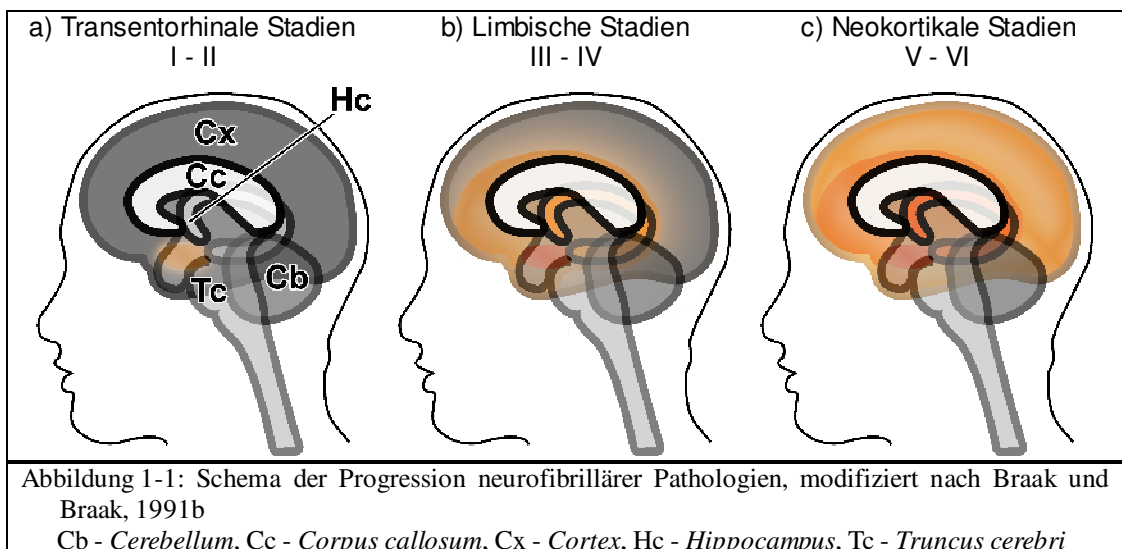
Ablagerungen, Tau-Phosphorylierung sowie *Locus coeruleus* Neuronenzahl). Im Gegensatz dazu sind bei der Alzheimer-Demenz (AD; auch: „Alzheimer’s disease“) Präsenilinmutationen bekannt, die bereits im Alter von 28 Jahren zum Tode führten [Wisniewski *et al.*, 1998].

1.1 Histopathologische Aspekte

Histopathologisch ist *Morbus Alzheimer* durch extrazelluläre Aggregate, sogenannte „Plaques“, bestehend aus Proteinfragmenten des Amyloid-Vorläuferprotein (APP, „amyloid precursor protein“) mit 36 - 43 Aminosäuren (AS) und zum anderen durch Neurofibrillen, zunächst intrazelluläre, faserartige Aneinanderlagerung des Tau-Proteins („Tangles“) gekennzeichnet.

1.1.1 Tangles

Tangles treten zunächst in der transentorhinalen Region und nur vereinzelt in der CA1-Region des *Hippocampus* (Hc) auf (Stadien I-II [Abbildung 1-1 a]), wohingegen die limbischen Stadien (Stadien III-IV [Abbildung 1-1 b]) durch die Progression der Tangles nicht nur in die entorhinalen *Cortex* (Cx)-Bereiche, sondern auch in die CA2 - CA4-Regionen des *Hippocampus* gekennzeichnet sind [Braak und Braak, 1991a, b]. Im Laufe der neokortikalen Stadien (Stadien V-VI [Abbildung 1-1 c]) kommt es im gesamten *Isocortex* zur Tangle-Bildung und zum Fortschreiten ebendieser im *Hippocampus* [ebd.].



Immunhistochemisch werden Tangles in drei Typen unterteilt [Bondareff *et al.*, 1994]:

- Typ 1 Intrazelluläre Aneinanderlagerungen in pyramidalen Neuronen
- Typ 2 Extrazelluläre, kompakte Ablagerungen nach Zelltod der Neuronen
- Typ 3 Extrazelluläre, durch astroglialen Abbau diffuse Ablagerungen

Hierbei korrelieren Verbreitung und Menge der Tangles mit der Schwere klinischer Symptome [Lee und Trojanowski, 1999].

Die Tangles bestehen hauptsächlich aus hyperphosphorylierten, gepaarten, helikalen Filamenten (PHF, „paired helical filaments“) von Tau [Grundke-Iqbal *et al.*, 1986], einem ubiquitär exprimierten Protein [Gu und Oyama, 1996], welches die Polymerisation der Mikrotubuli moduliert [Brion *et al.*, 1985; Pollock *et al.*, 1986]. Die Affinität von Tau an die Mikrotubuli ist abhängig vom Phosphorylierungsstatus der Mikrotubuli-Interaktions-Domäne [Drewes *et al.*, 1995], welche auch die Dynamik von Tau reguliert [Alonso *et al.*, 1994; Iqbal *et al.*, 1994; zur Übersicht: Maas *et al.*, 2000].

Die Hyperphosphorylierung von Tau spielt, neben einer Reihe von weiteren neurodegenerativen Tauopathien, auch bei *Morbus Alzheimer* eine entscheidende Rolle bezüglich des neuronalen Verlustes im Rahmen dieser degenerativen Erkrankung [zur Übersicht: Iqbal *et al.*, 2005]. Ebenso konnte die Präsenz von Tangles sowie die von löslichem Tau mit kognitiven Defiziten korreliert werden [Oddo *et al.*, 2006; Santacruz *et al.*, 2005].

1.1.2 Plaques

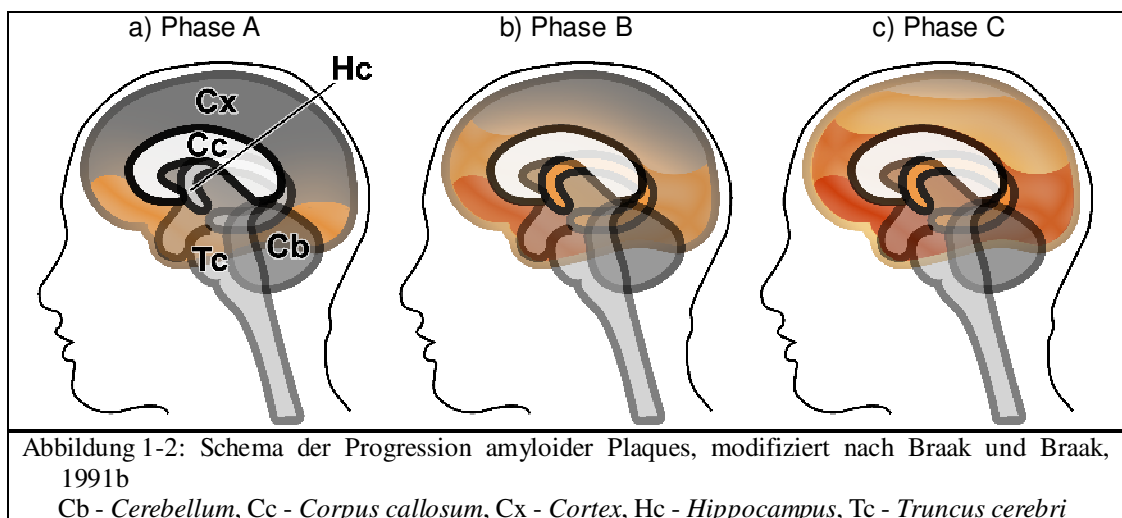
Im Jahre 1984 konnten Glenner und Wong, 1984 das Hauptpeptid der Alzheimer-Plaques erstmals sequenzieren.

Diese neuritischen Plaques bestehen aus einem dichten Amyloidkern, in dessen Nähe sich dystrophe Neuriten, reaktive Astrozyten sowie aktivierte Mikroglia nachweisen lassen [Braak und Braak, 1996; McGeer und McGeer, 1998]. Hauptbestandteil des Amyloid-Kerns ist das Amyloid β ($A\beta$), das sowohl fibrillär (8-10 nm), aber auch amorph vorliegen kann [Glenner und Wong, 1984; Masters *et al.*, 1985]. Über 30 weitere Proteinkomponenten des amyloiden Kerns (u.a. α 1-Antichymotrypsin, Vitronectin, Clusterin, Protectin sowie

Lipoprotein Rezeptor-ähnliches Protein (LRP) und dessen Liganden wie Apolipoprotein E (ApoE) und α -2-Makroglobulin (α 2M)) sind mittlerweile nachgewiesen worden [Dickson *et al.*, 1997; McGeer *et al.*, 1994; Rebeck *et al.*, 1995; Roher *et al.*, 1993b]. Braak und Braak, 1994 zeigten, dass im Verlauf der Krankheit nahezu alle neokortikalen Bereiche von diesen Peptid-Ablagerungen betroffen sind.

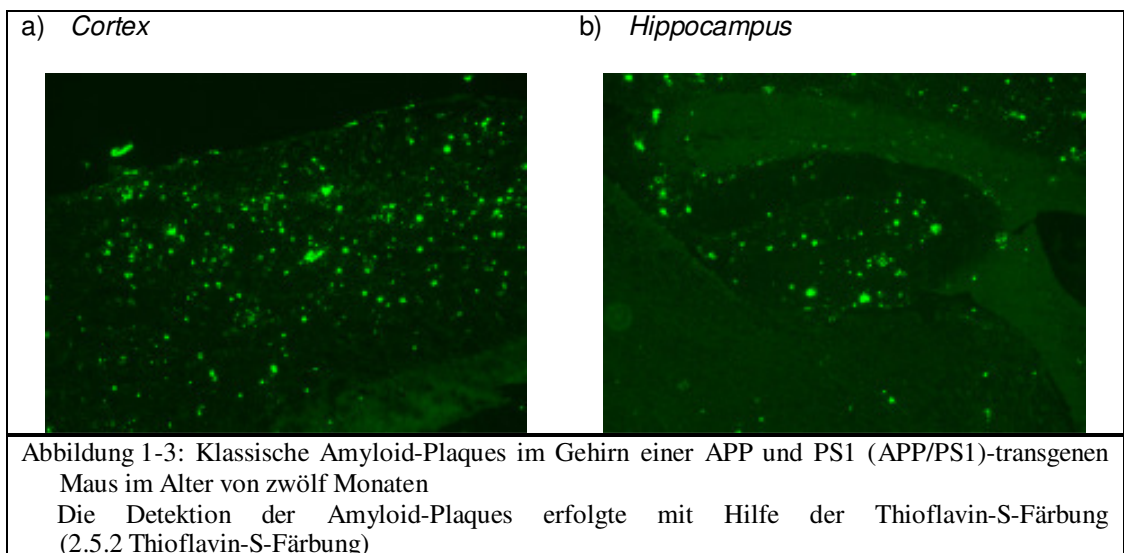
Analog zur Klassifizierung der Progression neurofibrillärer Pathologien unterteilten Braak und Braak, 1991b das Voranschreiten amyloider Plaques in unterschiedliche Phasen:

- Phase A amyloide Ablagerungen in den basalen Bereichen des *Isocortex* (Frontal-, Temporal- sowie Occipitallappen) [s. Abbildung 1-2 a)]
- Phase B mit Ausnahme der primären Projektionsfelder Ablagerungen im gesamten *Isocortex*, insbesondere im Assoziationskortex; wenige Plaques im *HiCornu ammonis* ([s. Abbildung 1-2 b)]
- Phase C Ablagerungen im gesamten *Isocortex* inklusive der Primärareale sowie vereinzelt in subkortikalen Strukturen [s. Abbildung 1-2 c)].



Das aus Plaques sowie vaskulären Ablagerungen isolierte A β variiert in seiner Peptidlänge [Glennner und Wong, 1984; Masters *et al.*, 1985], wobei A β -Peptide mit einer Länge von 40 und 42 AS (A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂) dominieren [Miller *et al.*, 1993; Mori *et al.*, 1992; Roher *et al.*, 1993a]. Hierbei zeigt A β ₁₋₄₂ eine wesentlich höhere Fibrillenbildung als A β ₁₋₄₀ [Yankner, 1996]. Dies erklärt unter anderem, dass A β ₁₋₄₂ den dominierenden Anteil des Plaque-A β stellt [Teplow, 1998].

In vitro konnte die Neurotoxizität von A β mit dem Aggregationszustand der Peptide korreliert werden [Busciglio *et al.*, 1992; Mattson *et al.*, 1993; Pike *et al.*, 1993; Pike *et al.*, 1992]. Während lösliche A β_{1-40} - sowie A β_{1-42} -Monomere eine lediglich geringe Toxizität bei PC12-Zellen respektive primären Rattenneuronen zeigten, wirkte die Inkubation mit fibrillärem A $\beta_{1-40/1-42}$ bereits ab einer Konzentration von 20 μ M (A β_{1-40}) respektive 40 μ M (A β_{1-42}) zytotoxisch [Howlett *et al.*, 1995; Lorenzo und Yankner, 1994]. Ebenso wie lösliche A β -Oligomere zeichnen Fibrillen-Vorstufen [Walsh und Selkoe, 2007] auch verantwortlich für Reduzierungen der Langzeitpotenzierung (LTP, „long term potentiation“) sowie der synaptischen Plastizität [Haass und Selkoe, 2007; Klyubin *et al.*, 2008; Walsh *et al.*, 2005].



1.2 Die Generation von Amyloid- β

Die Klonierung der gesamten cDNA- („complementary DNA“, komplementäre DNA) Sequenz durch Beyreuther und Kollegen zeigte, dass das A β -Peptid Teil eines Typ-I Transmembranproteins, des APP ist [Kang *et al.*, 1987]. Später konnten zwei weitere Mitglieder dieser Genfamilie, das Amyloid-Vorläufer-ähnliche Protein (APLP, „amyloid precursor like protein“)-1 und das APLP-2 identifiziert werden [Wasco *et al.*, 1992 Sprecher *et al.*, 1993]. APP-Homologe konnten darüber hinaus in *Drosophila melanogaster* [Rosen *et al.*, 1989] und *Caenorhabditis elegans* [Daigle und Li, 1993] nachgewiesen werden. Allerdings ist die A β -Domäne zwischen verschiedenen Species variabel [Selkoe, 1989; Wasco *et al.*, 1992; Wasco *et al.*, 1993a; Wasco *et al.*, 1993b]. Aus diesem Grund ist die Prozessierung murinen

APPs zu A β , welches sich in lediglich drei AS-Resten innerhalb der A β -Domäne vom humanen APP unterscheidet, wesentlich geringer [De Strooper *et al.*, 1995]. Auf Grund des ansonsten recht hohen Grades der Homologie der APP-Gene kann eine wichtige biologische Funktion dieser Gene abgeleitet werden, welche mit Hilfe verschiedener Modellorganismen analysiert wurde:

Die Störungen der Flügelentwicklung durch humanes APP, exprimiert in *D. melanogaster*, ließen auf eine Funktion des APP bei der Zell-Zell-Interaktion schließen [Fossgreen *et al.*, 1998]. Bei homozygot APP-defizienten (APP^(-/-)) Mäusen zeigten sich ontogenetische Störungen, Defizite im Lernverhalten sowie ein geringeres Körpergewicht, im Vergleich mit gleichaltrigen WT-Tieren [Muller *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 1995].

Zwar zeigten aus APP / APLP-1 / APLP-2 dreifach defizienten (APP^(-/-) APLP-1^(-/-) APLP-2^(-/-)) Stammzellen differenzierte Neurone keinerlei funktionelle Auffälligkeiten [Bergmans *et al.*, 2010], hingegen waren Mäuse mit einem APP^(-/-) APLP2^(-/-) beziehungsweise APLP1^(-/-) APLP2^(-/-), jedoch nicht mit einem APP^(-/-) APLP1^(-/-) Genotyp perinatal letal [Anliker und Muller, 2006; Heber *et al.*, 2000; Herms *et al.*, 2004; Von Koch *et al.*, 1997]. Dies lässt auf eine zwar fundamentale, jedoch redundante Funktion der Proteine innerhalb der APP-Genfamilie schließen.

APP ist strukturell ein Oberflächenrezeptor mit einer langen N-terminalen Ectodomäne, einer Transmembrandomäne (welche die A β -Sequenz beinhaltet) und einem kurzen zytoplasmatischen Carboxy-Terminus [s. Abbildung 1-4: Prozessierungswege des Amyloid-Vorläuferproteins]. Durch alternatives Splicing einer prä-mRNA werden unterschiedliche Isoformen synthetisiert [Golde *et al.*, 1990; Kang *et al.*, 1987; Kitaguchi *et al.*, 1988; Tanzi *et al.*, 1988; zur Übersicht: Menendez-Gonzalez *et al.*, 2005]: Während in peripherem Gewebe APP-Isoformen mit 751 AS und 771 AS überwiegen, dominiert in Neuronen APP mit 695 AS [Neve *et al.*, 1988]. Neben regulatorischen Funktionen des Carboxyterminus der APP-Ectodomäne beim Neuritenwachstum und der synaptischen Plastizität sowie einer möglichen Funktion als Rezeptormolekül in der Signalübertragung heterotrimerer Guanosintriphosphat-(GTP)-bindende Proteine sind Alterationen der neuronalen Erregbarkeit, intrinsischen Plastizität, sowie der Physiologie verschiedener glialer Zellen und Neuron-Glia Interaktionen weitere Funktionen des APP [Milward *et al.*,

1992; Nishimoto *et al.*, 1993; Saitoh *et al.*, 1989; zur Übersicht: Randall *et al.*, 2010].

Prozessierung des APP

APP wird auf zwei verschiedenen Wegen durch drei Enzyme prozessiert, die als α -, β - und γ -Sekretase bezeichnet werden. In Folge entstehen Proteolyseprodukte, welche nicht nur unter pathologischen Bedingungen, sondern auch unter physiologischen Bedingungen generiert werden. Diese konnten sowohl im Plasma, als auch im Liquor von Kontrollpatienten nachgewiesen werden [Seubert *et al.*, 1992; Shoji *et al.*, 1992].

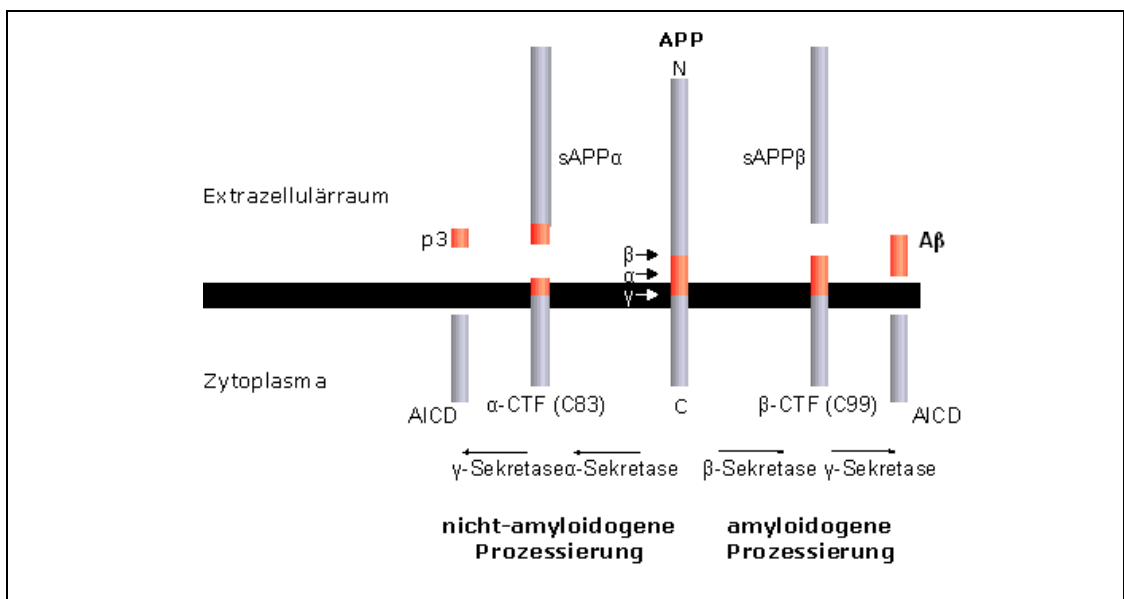


Abbildung 1-4: Prozessierungswege des Amyloid- Vorläuferproteins

Bei dem α -sekretorischen Weg führt die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP, „amyloid precursor protein“) durch α - und γ -Sekretase zur Produktion der Fragmente p3 und löslichem sAPP α („soluble APP α “).

Die Prozessierung des APP durch β - und γ -Sekretase produziert hingegen sowohl die amyloidogenen Peptide A β 1-40 und A β 1-42, als auch das nicht-amyloidogene, verkürzte sAPP β („soluble APP β “).

Intrazellulär kommt es bei beiden Prozessierungen zur Abspaltung der amyloiden, intrazellulären Domäne (AICD, „amyloid intracellular domain“).

Allgemein lassen sich für APP der α -sekretorische und der amyloidogene Prozessierungsweg unterscheiden:

1.2.1 α -sekretorischer Weg

Die α -Sekretase

Nachdem bereits 1989 die Proteolyse des APP durch eine α -Sekretase zu einem löslichen, ca. 95 Kilodalton (kDa) großen, N-terminalen Peptid des APP, zu sAPP α („soluble APP α “)[Weidemann *et al.*, 1989] bekannt war, konnten noch vor der Identifizierung der Sekretase die neuroprotektiven Eigenschaften dieses Peptids nachgewiesen werden [Furukawa *et al.*, 1996; Mattson *et al.*, 1999; Meziane *et al.*, 1998]. Als sAPP α -spezifische Sekretasen konnten die Disintegrine und Metalloproteinasen (ADAM; „a disintegrin and metalloproteinase“) 9 [Koike *et al.*, 1999; Roghani *et al.*, 1999], ADAM10 [Lammich *et al.*, 1999] und ADAM17 (= TNF α (Tumor Nekrose Faktor α)-konvertierendes Enzym, TACE, „Tumour necrosis factor α converting enzyme“) [Blacker *et al.*, 2002; Buxbaum *et al.*, 1998; Merlos-Suarez *et al.*, 1998] identifiziert werden. Insgesamt kann der Schluss gezogen werden, dass vermutlich verschiedene Mitglieder der ADAM Proteinfamilie in die APP Prozessierung, teilweise mit funktioneller Redundanz, eingebunden sind [Allinson *et al.*, 2003; Fahrenholz und Postina, 2006]. Zudem erfolgt die Spaltung inmitten der A β -Sequenz des APP, so dass eine Bildung von A β ausgeschlossen ist [Sisodia *et al.*, 1990].

Die γ -Sekretase

Nach Generation des C-terminalen Fragments (CTF) α sowie des sAPP α erfolgt eine weitere Spaltung des CTF α zu den Peptiden p3 (3 kDa; N-terminales Spaltprodukt) und der amyloiden, intrazellulären Domäne (AICD, „amyloid intracellular domain“; 5 kDa; C-terminales Spaltprodukt) [Muller *et al.*, 2008]. Weitere Informationen zur γ -Sekretase, insbesondere im Kontext der CFT β -Proteolyse, siehe 1.2.2 Amyloidogener Weg | Die γ -Sekretase.

1.2.2 Amyloidogener Weg

Die β -Sekretase

1999 klonierten gleich mehrere Gruppen die cDNA der ersten β -Sekretasenisoform (BACE1, „ β -site APP cleaving enzyme1“) und charakterisierten das Enzym *in vivo* [Hussain *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999]. Kurz

darauf gelang die Klonierung der zweiten Isoform, BACE2 [Acquati *et al.*, 2000; Saunders *et al.*, 1999; Xin *et al.*, 2000].

Die beiden Isoformen gehören zur Familie der A1 Aspartyl Proteasen, stellen innerhalb dieser aber auf Grund ihrer Transmembrandomainen und Disulfidbrückenverteilungen eine neue Subgruppe dar. Beide Enzyme können APP an der A β -Schnittstelle in A β und sAPP β („soluble APP β “) spalten, jedoch spaltet BACE2 bevorzugt zwischen Aminosäuren Phe⁶⁹⁰ und Phe⁶⁹¹ oder Phe⁶⁹¹ und Ala⁶⁹² innerhalb der A β Sequenz. Mittlerweile gilt BACE1 als hauptsächliche β -Sekretase der A β -Prozessierung. Die gezielte Depletion von BACE1 in APP-transgenen Mäusen führte zur Reduzierung der Produktion und Ablagerung von A β [Vassar, 2004; zur Übersicht: Stockley und O'Neill, 2007].

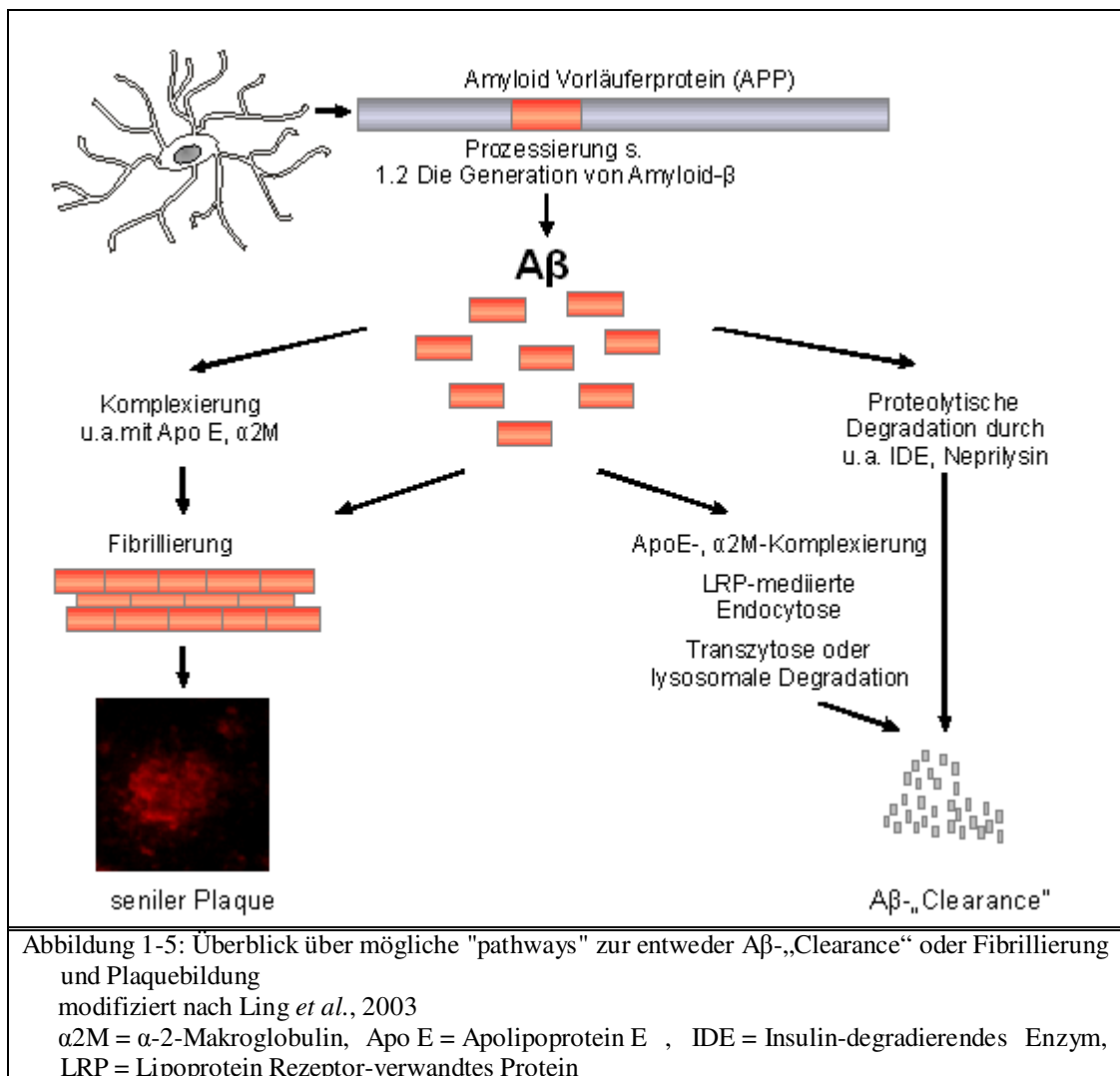
Konzentrationen von BACE1 sind bei Patienten mit *Morbus Alzheimer* bis zu zweifach erhöht [Fukumoto *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2003]. Wegen der Bedeutung von BACE1 für die Langzeitpotenzierung ist die Inhibition dieses Enzyms jedoch kein prominenter therapeutischer Ansatz [Vassar *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008].

Die γ -Sekretase

Durch die finale Proteolyse der CTF β durch die γ -Sekretase am C-terminalen Ende der A β -Domäne nach Val⁴⁰ oder Ala⁴² wird zum einen ein 3 kDa-Fragment, das sogenannte p3, und zum anderen A β ₁₋₄₀ oder A β ₁₋₄₂ sekretiert [Haass *et al.*, 1993; Haass und Selkoe, 1993]. Nachdem De Strooper *et al.*, 1998 die proteolytische Prozessierung von APP durch Präsenilin 1 (PS1) sowohl an homozygot PS1-defizienten (PS1^(-/-)) hippocampalen Neuronen sowie PS1^(-/-) Fibroblasten nachweisen konnten, sind mittlerweile ebenso Präsenilin 2 (PS2), Nicastrin, „anterior pharynx defective, homolog of , 1“ (Aph-1) sowie „presenilin enhancer 2“ (Pen-2, Präsenilin Verstärker 2) als Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes identifiziert worden [zur Übersicht: Krishnaswamy *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007; Pardossi-Piquard *et al.*, 2005; Verdile *et al.*, 2007]. Ebenso wie Mutationen im APP-Gen konnten AD-spezifische Mutationen auch für PS1 und PS2 nachgewiesen werden [s. 1.3 Genetische Aspekte].

1.2.3 Amyloid-β-„Clearance“ oder -Fibrillierung

Die Entstehung der Fibrillen (Durchmesser von 6-10 nm) aus den Monomeren von Aβ₁₋₄₀ und Aβ₁₋₄₂ ist zum einen Folge einer reduzierten Aβ-Monomer-Degradation durch Neprilysin [Iwata *et al.*, 2001; Kanemitsu *et al.*, 2003] und/oder dem Insulin degradierenden Enzym (IDE) [Farris *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 1998], sowie der geringeren Degradation von Oligomeren, [s. Abbildung 1-5; Leissring *et al.*, 2003; zur Übersicht: Ling *et al.*, 2003]. Die Monomeren und Oligomeren lagern sich zu größeren Protofibrillen zusammen, aus deren Aneinanderlagerung dann die Fibrillen hervorgehen können [s. Abbildung 1-5; Thal *et al.*, 2006; zur Übersicht: Fiala, 2007].



Co-Faktoren der Fibrillierung sind u.a. α2M [Blacker *et al.*, 1998; Du *et al.*, 1998; Hughes *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 1996] sowie ApoE [Bertram *et al.*, 2010; Strittmatter

et al., 1993]. Insbesondere dessen Isoform ApoE4 wird mit der späten Alzheimer-Demenz (LOAD, „late onset Alzheimer’s disease“) in ursächliche Verbindung gebracht [Schmechel *et al.*, 1993; Strittmatter *et al.*, 1993; zur Übersicht: Huang, 2010; Kim *et al.*, 2009]. Das LRP und dessen Liganden $\alpha 2M$ und ApoE konnten bereits durch Rebeck *et al.*, 1995 in senilen Plaques nachgewiesen werden.

Allerdings tragen ebendiese Proteine auch durch LRP-vermittelte Endozytose zur „Clearance“ von A β bei [Kang *et al.*, 2000; Kounnas *et al.*, 1995; Narita *et al.*, 1997; Nazer *et al.*, 2008]. Darüber hinaus wird eine Rolle von LRP als kompetitives Substrat der γ -Sekretase diskutiert [Lleo *et al.*, 2005].

1.3 Genetische Aspekte

Etwa zehn Prozent aller *Morbus Alzheimer* sind genetisch determiniert [Sorbi *et al.*, 2001]. Je nach Verlauf wird zwischen einer frühen, familiären Alzheimer-Demenz (EOFAD, „early onset familial Alzheimer’s disease“) mit einem Auftreten vor dem 65. Lebensjahr und einer ApoE-abhängigen LOAD mit einem Auftreten der AD nach dem 65. Lebensjahr unterschieden [s. 1.2.3 Amyloid- β -„Clearance“ oder -Fibrillierung, sowie zur Übersicht: Bertram *et al.*, 2010; Blacker und Tanzi, 1998; St George-Hyslop, 2000].

Für drei Genloci konnten Mutationen in Zusammenhang mit der familiären Alzheimer-Demenz (FAD) gebracht werden [Price und Sisodia, 1998; Price *et al.*, 1998; zur Übersicht Hardy, 2006]: das APP-Gen (Chromosom 21) [Goate *et al.*, 1991], das PS1-Gen (Chromosom 14) [Sherrington *et al.*, 1995], sowie das PS2-Gen (Chromosom 1) [Levy-Lahad *et al.*, 1995]. Pathogene Mutationen in dem APP- und den PS-Genen beeinflussen die Prozessierung von APP in Richtung einer Erhöhung des sezernierten A β_{1-42} und somit dessen verstärkter Aggregation. Diese Tatsache führte zur Entwicklung der „Amyloidkaskade“-Hypothese, nach der die Überproduktion beziehungsweise der verminderte Abbau von A β und dessen anschließende Aggregation zu *Morbus Alzheimer* führt [zur Übersicht: Pimplikar, 2009; Wirths *et al.*, 2004].

Im Tau-Gen sind bislang keine Mutationen bekannt, die zur Ausbildung von familiärem *Morbus Alzheimer* führen. Jedoch wurden verschiedene Mutationen von Tau beschrieben, die mit Chromosom 17 gekoppelter, frontotemporaler Demenz und weiteren präsenilen Demenzen einhergehen [Hong *et al.*, 1998; Hutton *et al.*, 1998;

Spillantini und Goedert, 1998; Vogel, 1998]. Bei diesen Demenzerkrankungen kommt es ebenfalls zum Auftreten von neurofibrillären Bündeln, die denen der AD ähnlich sind, jedoch werden hier keine Amyloidplaques beobachtet [zur Übersicht: Arvanitakis, 2010; Goedert und Jakes, 2005; Shepherd *et al.*, 2009].

1.3.1 Down Syndrom und Mutationen im APP-Gen

Down Syndrom-Patienten entwickeln bereits in der späten Kindheit [Mann *et al.*, 1989; Tanzi, 1996] Amyloidablagerungen, die ab etwa 40 Jahren neuropathologisch nicht von Alzheimerbefunden zu unterscheiden sind [Mann *et al.*, 1989; Olson und Shaw, 1969]. Dies führte früh zu der Vermutung, dass die Überexpression eines auf Chromosom 21 lokalisierten Genes auch für die Entwicklung von *Morbus Alzheimer* verantwortlich sein könnte.

Bei Untersuchungen an Familien mit FAD wurden bei der Sequenzierung des auf Chromosom 21 gelegenen APP-Gens verschiedene Mutationen charakterisiert, die für das Auftreten der FAD bei einem mittleren Erkrankungsalter von 40 Jahren verantwortlich sind [zur Übersicht: Hendriks und Van Broeckhoven, 1996; Levy *et al.*, 1990; Selkoe, 1998; Shepherd *et al.*, 2009; Van Dam und De Deyn, 2006].

Die meisten der bislang entdeckten, FAD-auslösenden Mutationen im APP-Gen sind auf den Bereich der β -Amyloiddomäne sowie angrenzenden Aminosäuresequenzen begrenzt. Sie befinden sich unter anderem an, beziehungsweise sehr nahe bei den Schnittstellen für die drei APP prozessierenden Sekretasen [s. Abbildung 1-6: Bekannte Mutationen des APP; [Shepherd *et al.*, 2009; Van Dam und De Deyn, 2006]. Untersuchungen an verschiedenen Zellkulturmodellen zeigten, dass APP-Mutationen die Prozessierung des APP durch die Sekretasen in unterschiedlicher Weise beeinflussen können [Cai *et al.*, 1993; Citron *et al.*, 1992; Haass *et al.*, 1994; Haass *et al.*, 1995; zur Übersicht: Vassar *et al.*, 2009].

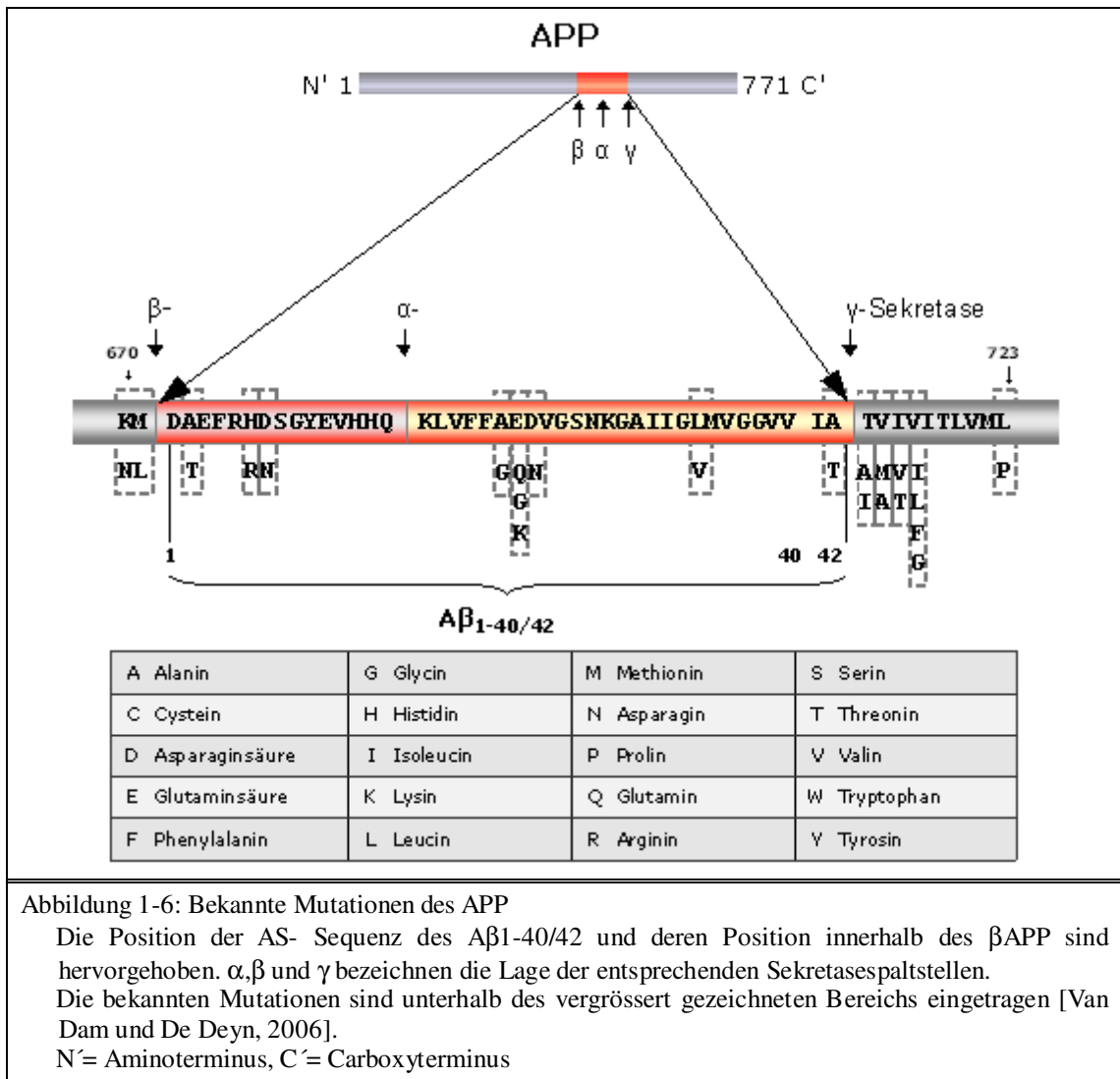


Abbildung 1-6: Bekannte Mutationen des APP

Die Position der AS- Sequenz des $A\beta_{1-40/42}$ und deren Position innerhalb des β APP sind hervorgehoben. α , β und γ bezeichnen die Lage der entsprechenden Sekretasespaltstellen. Die bekannten Mutationen sind unterhalb des vergrößert gezeichneten Bereichs eingetragen [Van Dam und De Deyn, 2006].

N' = Aminoterminus, C' = Carboxyterminus

Die schwedische Mutante

Bei der „schwedischen Mutante“ (APP^{sw}) handelt es sich um eine Mutation der für die zwei AS N-terminal der β -Sekretasespaltstelle kodierenden Sequenz und führt zum Aminosäureaustausch von Lys⁵⁹⁵Asn und Met⁵⁹⁶Leu [Mullan *et al.*, 1992]. *In vitro* wurde, da diese Mutante offensichtlich ein besseres Substrat für die β -Sekretase darstellt, eine 10- bis zu 100-fachen Erhöhung des Gesamt- $A\beta$ beobachtet, wohingegen das $A\beta_{1-40/42}$ -Verhältnis im Wesentlichen unverändert bleibt [Ancolio *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 1993; Citron *et al.*, 1992; Dovey *et al.*, 1993; Vassar *et al.*, 2009]. Die Ursache hierfür ist, dass im Falle des APP^{sw} der Schnitt durch die β -Sekretase bereits im Golgi-Apparat und nicht erst im endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgen kann [Haass *et al.*, 1995; Thinakaran *et al.*, 1996], wodurch es innerhalb des selben Kompartiments zu einer Konkurrenz zwischen β - und α -

Sekretase kommt. Daher stehen größere Menge an CTF β für die Spaltung durch die γ -Sekretase zur Verfügung [Haass *et al.*, 1995].

1.3.2 Mutationen in den Presenilin-Genen

Nachdem in genetischen Studien an FAD-Patienten festgestellt wurde, dass neben Mutationen im APP auch andere Faktoren an der FAD beteiligt sein müssen, begann die Suche nach weiteren Genloci [Schellenberg *et al.*, 1992; St George-Hyslop, 2000; Van Broeckhoven *et al.*, 1992], welche mit Hilfe genetischer Kopplungsstudien das PS1-Gen als möglichen Auslöser der familiären Form der AD fand [Sherrington *et al.*, 1995]. Durch Vergleiche mit DNA-Sequenzdatenbanken wurde später das PS2-Gen identifiziert [Levy-Lahad und Bird, 1996; Levy-Lahad *et al.*, 1995; Rogaev *et al.*, 1995]. Mehrere Punktmutationen [Hardy, 1997; Perez-Tur *et al.*, 1996; Tanzi, 1996] in den beiden humanen PS-Genen haben den Austausch einer Aminosäure zur Folge. Wie auch bei den APP-Mutationen kommt es in Folge der PS-Mutationen zu einem Anstieg der A $\beta_{1-40/42}$ -Ratio, während die Menge an Gesamt-A β konstant zu bleiben scheint. Dies konnte sowohl an transfizierten Zellen, als auch an Fibroblasten von Patienten mit PS-Mutationen nachgewiesen werden [Citron *et al.*, 1997; Scheuner *et al.*, 1996; Steiner *et al.*, 1999b; Tomita *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1997; zur Übersicht: Steiner *et al.*, 1999a]. Bei den betroffenen PS1-FAD Patienten liegt eine erhöhte A β_{1-42} -Plasma- Konzentration vor [Scheuner *et al.*, 1996], zudem weisen die Gehirne dieser Patienten gegenüber Patienten mit sporadischer AD eine signifikant erhöhte Menge an A β_{1-42} Ablagerungen auf [Lemere *et al.*, 1996].

Für Mäuse, die für APP^{sw} und PS-FAD-Mutationen transgen waren, konnte nachgewiesen werden, dass A β früher abgelagert als in Mäusen, die nur für APP^{sw} transgen waren [Borchelt *et al.*, 1997].

Neben den „klassischen“ Punktmutanten existiert in PS1 eine Mutation, die einen Fehler des mRNA-Splicing induziert (Δ E9, Delta-Exon 9) [Sato *et al.*, 1998]. Hierbei kommt es zur Generierung einer aberranten Splice-Site, die neben dem Verlust des Exon 9 die Einführung einer Punktmutation zur Folge hat. Durch Rückmutation der mutierten Aminosäure zur Wildtyp-Sequenz konnte gezeigt werden, dass auch in dieser Mutante ausschließlich die Aminosäuresubstitution, unabhängig vom Verlust der durch das Exon 9 codierten Domäne, für die

pathologische Erhöhung der A β -Generierung verantwortlich ist [Steiner *et al.*, 1999a].

1.4 Entzündliche Prozesse

Bereits 1992 konnten McGeer und Kollegen erhöhte Inflammationsmarker-Level und die Anwesenheit aktivierter Mikroglia in *post mortem*-Gehirnen von Alzheimer-Patienten nachweisen [McGeer und Rogers, 1992]. Zwar berichteten Itagaki *et al.*, 1989 sowie Rozemuller *et al.*, 1989 über engen Kontakt aktivierter Mikroglia mit amyloiden Fibrillen, machten jedoch keine Angaben zu chronischen inflammatorischen Parameter.

Im gleichen Jahr ihres Nachweis entzündlicher Prozesse in Alzheimer-Patienten-Gehirnen beschrieben Rogers *et al.*, 1992 die Immunstimulierung der Komplement-Kaskade durch A β . Diese Aktivierung wird jedoch nur durch fibrilläres A β hervorgerufen, hingegen nicht durch monomeres A β [Snyder *et al.*, 1994]. Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass Itagaki und Rozemuller keine inflammatorischen Marker in diffusen, niederfibrillären Plaquestadien nachweisen konnten. Die mikrogliale Aktivierung an den Plaques wird über „cluster of differentiation-14“ (CD-14), Komponente des Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptors und Immuzellaktivator, vermittelt [Fassbender *et al.*, 2004]. Dessen Bindung an A β ₁₋₄₂ führt zur nachfolgenden mikroglialen Beseitigung geschädigter Neuronen [Bate *et al.*, 2004].

Ein weiteres krankheitsrelevantes Immunstimulanz ist Chromogranin A (CGA) [Taupenot *et al.*, 1996]. Dieses 48-52 kDa große Glykoprotein konnte in Plaques sowie in dystrophen Neuriten nachgewiesen werden [Brion *et al.*, 1991]. Zudem trug die nachfolgende mikrogliale Aktivierung zum neuronalen Zelltod bei [Ciesielski-Treska *et al.*, 1998]. Die entzündlichen Prozesse werden zudem durch krankheitsbedingte Neurodegeneration in aminergen Hirnstammregionen wie *Locus coeruleus* (LC) und *Nucleus basalis* (NB) begünstigt [Wenk *et al.*, 2003; Zarow *et al.*, 2003; zur Übersicht: Grudzien *et al.*, 2007; Heneka und O'Banion, 2007].

1.4.1 Zelluläre Beteiligung des Nervensystems

Astrozyten und Neuronen

Astrozyten tragen zusätzlich zu ihrer regulären trophischen Versorgung der Neuronen im Rahmen der AD zur Degradation sowie zur intrazellulären

Akkumulation von A β ₁₋₄₂ bei, was indirekt zudem zur Astrogliose in Nähe amyloider Plaques führt [Nagele *et al.*, 2003; Wyss-Coray *et al.*, 2003; zur Übersicht: Rodriguez *et al.*, 2009]. Seit den Untersuchungen von Vodovotz *et al.*, 1996, Wallace *et al.*, 1997 sowie Heneka *et al.*, 1998, welche die ersten Nachweise einer Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS, „inducible nitric oxide synthase“) in plaquenahen Astrozyten und Neuronen erbrachten, und den Experimenten durch Weldon *et al.*, 1998, die zeigen konnten, dass die iNOS-Expression sowohl in Astrozyten, ebenso aber auch in Mikroglia nahe der Injektionsstelle des im Laufe der Studie applizierten fibrillären A β zunimmt, rückte zunehmend die inflammatorische Rolle von iNOS und Stickstoffmonoxid (NO, „nitric oxide“) während der Progression der Alzheimer-Erkrankung in den Vordergrund [zur Übersicht: Heneka und Feinstein, 2001].

Mikroglia

Mikroglia als Immunzellen des Gehirns sind spezialisiert auf Gewebsschädendetektion sowie die Abwehr eindringender Pathogene. Durch Stimulation u.a. durch neurodegenerative Erkrankungen ändern sie ihren „Aktivitätsstatus“, welcher im Verlauf der Erkrankung weiter zunehmen kann [Hanisch und Kettenmann, 2007; O'Banion, 1999; Ransohoff, 2009]. Unter aktivierten Bedingungen sezernieren sie eine Vielzahl an Zytokinen, „reactive oxygen species“ (ROS), Komplementfaktoren, neurotoxischen Sekreten, freien Radikalen sowie NO [Griffin *et al.*, 1998; zur Übersicht: Heneka und O'Banion, 2007]. Neben diesen inflammatorischen Eigenschaften tragen Mikroglia ebenso auch zur A β -„Clearance“ durch Phagozytose und Degradation durch IDE-Sekretion bei [s. Amyloid- β -„Clearance“ oder -Fibrillierung; Frautschy *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 1998; zur Übersicht: Yan *et al.*, 2003].

1.4.2 Das Komplement-System

Die Aktivierung des Komplements erfolgt im Kontext der AD entweder klassisch über Komplementfaktor 1q (C1q, „complement 1q“) via Antigen-Antikörper-Komplexe und/oder durch Interaktion u.a. mit fibrillärem A β [Rogers *et al.*, 1992] oder aber über Komplementfaktor 3 (C3, „complement 3“)-Opsonierung (den alternativen „pathway“) [zur Übersicht: Van Beek *et al.*, 2003]. Physiologische Funktionen des Komplementsystems sind Erkennung, Opsonierung, entzündliche

Stimulation und Zytolyse der Zielzelle mit Hilfe des Membranangriffskomplexes (MAC, „membrane attack complex“) [McGeer und McGeer, 2002; Quigg, 2002].

Die Aktivierung des Komplements trägt sowohl über kristallisierbares Fragment- (Fc, „fragment crystallizable“-)abhängige sowie Fc-unabhängige Mechanismen [Bacsikai *et al.*, 2001; Bard *et al.*, 2000] auch zur A β -„Clearance“ u.a. in Folge passiver Immunisierung bei [Schenk *et al.*, 1999; zur Übersicht: Van Beek *et al.*, 2003].

1.4.3 Zytokine, Chemokine und Prostanoid

Zytokine

Zytokine wie Interferone (IFN), Interleukine (IL), koloniestimulierende Faktoren (CSF, „colony stimulating factors“) TNF α und der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF β , „transforming growth factor β “) sowie Chemokine werden sowohl von Mikroglia als auch Astrozyten und Neuronen im ZNS produziert [Hopkins und Rothwell, 1995]. IL-1 β , IL-6, TNF α und TGF β werden in Abhängigkeit von Kernfaktor κ B-(NF κ B, „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“) im AD-Gehirn exprimiert [Akiyama *et al.*, 2000; Moore und O'Banion, 2002; Wilson *et al.*, 2002; zur Übersicht: Tuppo und Arias, 2005]. Zudem formulierten Guo *et al.*, 2002 nach Untersuchungen an einem systemischen Amyloid A (SAA) Tiermodell einen potentiellen „feedback“ Mechanismus via Amyloiddeposition und sukzessiver fokaler Entzündung.

Chemokine

Die Familie der Chemokine besteht aus einer Vielzahl an chemotaktischen Proteinen, die je nach AS-Umgebung der ersten zwei Cysteine (C) in mindestens vier verschiedene Untergruppen eingeteilt werden, welche spezifische G Protein-gekoppelte Rezeptoren an der Zelloberfläche binden [Baggiolini, 1998; Baggiolini *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 1995; zur Übersicht: Rot und von Andrian, 2004]:

1. CXC-Motiv (α -Chemokine): die ersten zwei N-terminalen Cysteine (welche bei allen Untergruppen mit jeweils anderen Cysteinen Disulphidbrücken bilden) sind durch eine andere AS („X“) getrennt
2. CC-Motiv (β -Chemokine): die ersten zwei N-terminalen Cysteine folgen direkt aufeinander
3. C-„Motiv“ (γ -Chemokine): Die zwei Chemokine dieser Untergruppe besitzen insgesamt nur zwei Cysteine, die, entfernt voneinander liegend, lediglich eine Disulphidbrücke ausbilden
4. CX₃C-Motiv (δ -Chemokine): zwischen den ersten zwei Cysteinen liegen drei andere AS

Sowohl β -Chemokine als auch α -Chemokine medieren die Leukozytenakkumulation am Entzündungsort [zur Übersicht: Owens *et al.*, 2005; Ransohoff, 2009]. So führt der genetische „Knock-out“ des CC-Ligand 2 (CCL2) Rezeptors (CCR2) zu einer Progression AD-ähnlicher Pathologien sowie verringerter mikroglialer Akkumulation in einem APP_{sw}-tg Tiermodell [El Khoury *et al.*, 2007]. Fuhrmann *et al.*, 2010 konnten zeigen, dass der „Knock out“ des CX₃C-Rezeptors-1 (CX₃CR1) vor mikroglial bedingtem Neuronenverlust schützt.

Cyclooxygenase und Prostanoid

Die zwei Cyclooxygenasen (COX) COX1 und COX2 produzieren durch ihre Cyclooxygenase- und Peroxidase-Aktivität aus Arachidonsäure, Eicosapentaensäure oder Dihomogammalinolensäure das Prostaglandin H₂ (PGH₂) [O'Banion, 1999]. Dieses wird durch gewebsspezifische Isomerasen in andere Prostanoid wie PGE₂, PGD₂, PGI₂ (Prostazyklin) sowie Thromboxan konvertiert [ebd.]. Sowohl aktivierte Mikroglia als auch A β -stimulierte Astrozyten exprimieren COX2 [O'Banion *et al.*, 1996] und allgemein ist COX2 in vielen inflammatorischen Erkrankungen hochreguliert [Dubois *et al.*, 1998]. Zwar reguliert via COX2 PGE₂ u.a. die Expression von IL-6 [Blom *et al.*, 1997; Fiebich *et al.*, 1997; Hinson *et al.*, 1996], der Einfluss von COX2 im Rahmen der AD ist jedoch nicht eindeutig [zur Übersicht: Heneka und O'Banion, 2007]

1.4.4 Antiinflammatorische Therapieansätze

Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor γ (PPAR γ) als therapeutisches Ziel für „non-steroidal antiinflammatory drugs“ (NSAIDs)

Viele der durch NO transkriptionell beeinflussten Faktoren wie COX2 sowie diverse Zyto- und Chemokine können durch pharmakologische Modulation der PPAR γ -Aktivität reguliert und das Ausmaß der neurodegenerativen Effekte reduziert werden [Bredert *et al.*, 2002; Camacho *et al.*, 2004; Feinstein *et al.*, 2002; Heneka *et al.*, 2003; Heneka *et al.*, 2005; Heneka *et al.*, 2001a; in t' Veld *et al.*, 2001; Landreth und Heneka, 2001; Sastre *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 1997; zur Übersicht: Heneka und Landreth, 2007; Kummer und Heneka, 2008]. Insbesondere die Arbeit von Ricote *et al.*, 1998 konnte eine transkriptionelle Regulation der iNOS-Expression via Inhibition von NF κ B sowie von Mitgliedern der Signaltransduktoren und Transkriptionsaktivatoren- (STAT, „signal transducers and activators of transcription“)- und Aktivator Protein-1- (AP-1)-Familie zeigen. Darüber hinaus wurden von Camacho *et al.*, 2004 auch Reduzierungen der A β -Menge, insbesondere von A β ₁₋₄₀, nach PPAR γ -Antagonist-Behandlung, nachgewiesen. PPAR γ war und ist daher ein wichtiger therapeutischer Ansatzpunkt in einer Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen mit inflammatorischen Komponenten.

NO-Inhibition als möglicher Therapieansatz

Mittlerweile sind negative Einflüsse von NO und iNOS über die oben genannten klassischen inflammatorischen Prozesse hinaus bekannt. Im Kontext von *Morbus Alzheimer* sind Auswirkungen auf die mitochondriale Atmung [Beal, 2000], synaptische Aktivität und neuronalen Verlust [Cho *et al.*, 2009; Hara *et al.*, 2005; Uehara *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2004] nachgewiesen, unter anderem Cystein- und Tyrosin-Modifikationen durch das NO-Derivat Peroxynitrit (ONOO) [Butterfield *et al.*, 2007; Castegna *et al.*, 2003; Fernandez-Vizarra *et al.*, 2004; Luth *et al.*, 2002; Tohgi *et al.*, 1999]. Insbesondere die S-Nitrosylierung thiolhaltiger AS-Reste führt zu Fehlfaltungen der Proteine sowie zu neurotoxischen Effekten [Nakamura und Lipton, 2009]. Die Nitrierung von Tyrosinresten führt hingegen vornehmlich zu Änderungen der Aktivität A β -degradierender Enzyme [Souza *et al.*, 2008].

Nathan *et al.*, 2005 konnten bereits zeigen, dass Astrozytose, Mikrogliose sowie Plaquebildung bei iNOS-defizienten, APP und PS1(APP/PS1)-transgenen Tieren im

Vergleich zu iNOS-kompetenten APP/PS1-transgenen Tieren reduziert sind, wohingegen Colton *et al.*, 2006 in Tieren, die lediglich APP-transgen, nicht jedoch transgen für Präsenilin1 waren, eine Amyloid- β -Erhöhung in zugleich iNOS-defizienten Tieren nachweisen konnten. Insbesondere der erhöhte Anteil unlöslichen Amyloids- β war offensichtlich für die im Vergleich mit iNOS-kompetenten, APP-transgenen Tieren erhöhten A β -Level verantwortlich. „Enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISAs) zeigten, dass das Verhältnis A β ₁₋₄₀ zu A β ₁₋₄₂ um ein Mehrfaches in diesen Tieren erhöht war.

1.5 Verwendete Tiermodelle und Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Studie wurden von David Borchelt entwickelte, APP/PS1-transgene (APP/PS1-tg) Mäuse [Jankowsky *et al.*, 2001] verwendet, da diese bereits im Alter von vier Monaten erste Thioflavin-positive Plaques aufweisen [Garcia-Alloza *et al.*, 2006]. Dieses transgene Tiermodell enthält die cDNA für humanes PS1 mit Exon 9-Deletion sowie jene für im A β Bereich humanisiertes (d.h. eine im Bereich der γ -Sekretase-Schnittstelle der menschlichen Sequenz angepasste DNA-Sequenz), murines Amyloid-Vorläuferprotein mit schwedischer Mutation (APP_{sw}), jeweils unter der Kontrolle eines murinen Prion-Protein (PrP)-Promoters, welcher die Expression des Transgens vornehmlich in Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) zur Folge hat [s. 2.1.1 Amyloid-Vorläuferprotein/Präsenilin1-transgene Tiere]. Kognitiv zeigen diese Mäuse bereits im Alter von sieben Monaten signifikante Defizite bei räumlichen Gedächtnisleistungen im Barnes-Labyrinth [Reiserer *et al.*, 2007] sowie im Alter von zwölf Monaten im Morris Wasser-Labyrinth [Lalonde *et al.*, 2005].

Durch Kreuzung mit iNOS-defizienten (iNOS^(-/-)) Tieren vor genetischem C57BL/6 Hintergrund [Laubach *et al.*, 1995; Weberpals *et al.*, 2009] und nachfolgender Rückkreuzung wurden APP/PS1-tg iNOS^(-/-) Tiere generiert, welche helfen sollten, den Beitrag iNOS-produzierten NOs im Kontext der AD zu evaluieren.

Zudem wurden APP/PS1-tg Tiere ab dem zweiten Lebensmonat (Gruppe der drei Monate alten Tiere) oder ab dem sechsten Lebensmonat (Gruppe der zwölf Monate alten Tiere) mit dem iNOS-spezifischen Inhibitor L-N⁶-(1-iminoethyl)-Lysin (L-NIL) [Hampl *et al.*, 2006; Hansel *et al.*, 2003; Law *et al.*, 2001] behandelt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Determination des Einflusses von Modulationen der enzymatischen Aktivität der iNOS in murinen und zellulären Modellen der Alzheimer-Erkrankung.

Die im Rahmen dieser Studie analysierten Parameter umfassten sowohl den Einfluss von NO auf die motorischen und kognitiven Leistungen, die Langzeitpotenzierung, die histopathologischen Unterschiede, die phagozytotische Aktivität der Mikroglia, die Enzymaktivität A β -degradierender Enzyme, die Nitrierung und S-Nitrosylierung von synaptosomalen Proteinen sowie die Aktivität der synaptosomalen Mitochondrien.

2 Material und Methoden

Mit Ausnahme der LTP-Messungen (freundlicherweise durchgeführt von Thea Hammerschmidt), der Bestimmungen der enzymatischen Aktivität des Insulin-degradierenden Enzyms (IDE) und Neprilysin sowie der A β -„enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISAs) und -Blots (Dr. Markus Kummer), der Maldi-TOF-MS (Prof. Dr. Simone König) sowie der Aktivitätsbestimmung der synaptosomalen Mitochondrien (Dr. Alexei P. Kudin, Prof. Dr. Wolfram S. Kunz) wurden die im Folgenden beschriebenen Experimente von Michael Hermes durchgeführt.

2.1 Tiermaterial

Alle im Projekt verwendeten Tiere wurden, soweit nicht anders angegeben, von The Jackson Laboratory (via Charles River Laboratories, Sulzfeld) bezogen und in IVC („individually ventilated cages“, individuell ventilierte Käfige) Systemen der Firma Tecniplast (Buguggiate, Italien) bei 22 °C (\pm 1 °C) mit freiem Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Die Versuche wurden unter Einhaltung der ethischen Grundsätze der Deklaration von Helsinki und nach zustimmender Bewertung durch die zuständigen Behörden und Ethik-Kommissionen durchgeführt.

2.1.1 Amyloid-Vorläuferprotein/Präsenilin1-transgene Tiere

APP/PS1-transgene (APP/PS1-tg) Tiere wurden von The Jackson Laboratories (via Charles River Laboratories, Sulzfeld; *stock number* 004462) [Jankowsky *et al.*, 2001] bezogen und mit C57BL/6 Wildtyp Mäusen (The Jackson Laboratory via Charles River Laboratories, Deutschland, Sulzfeld; *stock number* 000664) zwecks Erhaltungszucht verpaart. Nachkommen mit APP/PS1-PCR-Amplifikat wurden sowohl zur Generierung der APP/PS1-tg iNOS-defizienten Tiere (s. 2.1.4 Genotypisierung und Kreuzung), als auch in den Experimenten verwendet. Nicht-transgene Wurfgeschwister wurden als Wildtyp (WT)-Kontrollen verwendet.

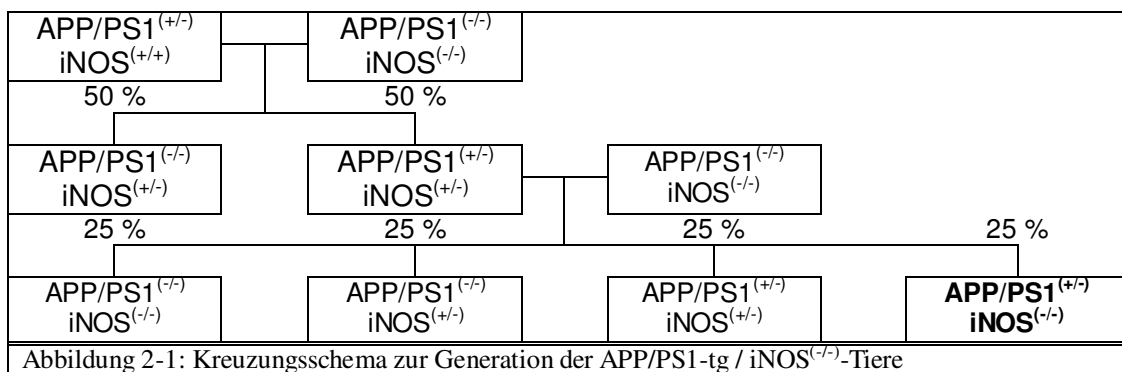
2.1.2 induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase-defiziente Tiere

Die von Laubach *et al.*, 1995 durch „targeted disruption“ generierte Mauslinie wurde ursprünglich zur Untersuchung der Rolle der iNOS während eines septischen Schocks, ausgelöst durch intraperitoneale LPS-Injektion, hergestellt. iNOS-defiziente (iNOS^(-/-)) Tiere (The Jackson Laboratory via Charles River Laboratories,

Sulzfeld; *stock number* 002609) wurden mit C57BL/6 Wildtyp Mäusen (The Jackson Laboratory via Charles River Laboratories, Sulzfeld; *stock number* 000664) gekreuzt, um heterozygote iNOS^(+/-) Mäuse mit genetischem C57BL/6 Hintergrund zu erzeugen. Durch nachfolgende, reziproke Kreuzungen wurden homozygote iNOS^(-/-) auf C57BL/6 Hintergrund erzeugt [Weberpals *et al.*, 2009], welche dann zur Generation der APP/PS1-tg/iNOS^(-/-)-Mäuse (s. 2.1.2.1 Generierung der APP/PS1-tg iNOS^(-/-)-Mäuse) verwendet wurden.

2.1.2.1 Generierung der APP/PS1-tg iNOS^(-/-)-Mäuse

Durch Kreuzung von APP/PS1-tg Tieren (2.1.1 Amyloid-Vorläuferprotein/Präsenilin1-transgene Tiere) mit den homozygoten iNOS^(-/-) Tieren vor C57BL/6 Hintergrund (2.1.2 induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase-defiziente Tiere) in der Parentalgeneration und anschließender Rückkreuzung der APP/PS1-transgenen Nachkommen der ersten Filialgeneration mit homozygot iNOS-defizienten Tieren der Parentalgeneration waren etwa 25 % der Nachkommen der zweiten Filialgeneration APP/PS1-transgene, homozygot iNOS-defiziente Tiere [s. Abbildung 2-1].



2.1.3 Pharmakologische Inhibition der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase

Die L-N⁶-(1-iminoethyl)-Lysin (L-NIL; Cayman Chemicals via IBL International GmbH, Hamburg) Konzentration im Trinkwasser betrug 8 mg/l, eine Konzentration, die durch Hampl *et al.*, 2006 als effektiv und selektiv ermittelt wurde. Durch Überwachung des Wasserkonsums der für die Experimente zu verwendenden APP/PS1-transgenen Tiere wurde der Wasserbedarf pro Tier und Tag mit 5 ml sowie das durchschnittliche Gewicht mit 30 g ermittelt [s. Tabelle 2- und Suppl. Tabelle 1:

Determination des durchschnittlichen Körpergewichts sowie des durchschnittlichen Wasserverbrauchs der mit L-NIL zu behandelnden APP/PS1-tg-Mäuse].

Tabelle 2-1: Kalkulationen zur Determination der applizierten L-NIL-Menge und -Konzentration	
Pharmakologische Inhibition	
Vorgaben:	
Inhibitions-Zielsynthase:	iNOS
Inhibitor:	L-NIL
Konzentration L-NIL*:	8 mg/l
Berechnung der L-NIL Konzentration pro kg Körpergewicht	
Zugrunde liegende Daten:	
Körpergewicht (MW)**:	30 g
Wasserverbrauch pro Tag (MW)**:	5 ml
Konzentration L-NIL (260,20 g/M) pro kg Körpergewicht**:	1,3 mg/kg KG/d 5,1 µmol/kg KG/d
* nach Hampl <i>et al.</i> , 2006	
** Suppl. Tabelle 1: Determination des durchschnittlichen Körpergewichts sowie des durchschnittlichen Wasserverbrauchs der mit L-NIL zu behandelnden APP/PS1-tg-Mäuse	

Die applizierte L-NIL Konzentration betrug somit 1,3 mg pro kg Körpergewicht und Tag (ie. 5,1 µmol pro kg Körpergewicht und Tag).

2.1.4 Genotypisierung und Kreuzung

2.1.4.1 Isolation genomischer Desoxyribonukleinsäure (gDNA)

Den zu genotypisierenden Mäusen wurden mittels steriler Schere ca. 5 mm des distalen Schwanzendes amputiert und unmittelbar in 300 µl nicht-ionischen Lysispuffer (Rezeptur 5: Lysispuffer (nicht-ionisch) - Proteinase K-Verdau* der Schwanzbiopsien) transferiert. Nach Zugabe von Proteinase K (finale Konzentration im Lysispuffer 10 mg/ml) wurden die Schwanzbiopsien über Nacht bei 55 °C und 350 rpm in einem Wärmeblockschüttler (Thermomixer Comfort; Eppendorf AG, Hamburg) inkubiert.

Nach zehminütiger Inaktivierung der Proteinase K bei 70 °C und 350 rpm wurden die Proben bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge (BioFuge Pico; Heraeus, Osterode) abzentrifugiert und der Überstand bei +4 °C gelagert.

2.1.4.2 Polymerase Kettenreaktion

Drei µl des Überstandes aus 2.1.4.1 (Isolation genomischer Desoxyribonukleinsäure (gDNA)) wurden in der entsprechenden Genotypisierungs-PCR [s. Suppl. Tabelle 2: PCR-Bedingungen zur Genotypisierung der verwendeten Genotypen] unter Verwendung des GoTaq[®] Hot Start PCR Kits (Promega Corporation, Mannheim) als Template eingesetzt.

2.1.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

12,5 µl des PCR-Produktes aus 2.1.4.2 (Polymerase Kettenreaktion) wurden zur Separation der Amplifikate auf ein 1,5 % (w/v) Agarose-Gel (Rezeptur 9: TBE* - Laufpuffer und flüssige Phase des Agarose-Gels zur DNA-Separation) mit 1 : 1.000 0,1 % (v/v) Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) aufgetragen und mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese-Einheit (Bio-Rad, München, Deutschland) bei max. 5 V/cm Laufstrecke entsprechend der relativen Fragmentgröße aufgetrennt. Die erhaltenen Amplifikatsbanden wurden unter UV Licht mit Hilfe des ChemiDoc XRS (Bio-Rad, München) und der Quantity One-Software (Version 4.6.6; Bio-Rad, München) detektiert und dokumentiert.

2.2 Verhaltensbiologische Untersuchungen

Zur Determination kognitiver und/oder motorischer Defizite wurden die verwendeten Tiere vor Beginn der verhaltensbiologischen Untersuchungen zwei Wochen lang bei gewechseltem Tag-Nacht-Rhythmusⁱ in einem komplett verdunkelten Raum mit von 20:00 - 8:00 Uhr eingeschalteter Beleuchtung gehalten, um die verhaltensbiologischen Experimente während der aktiven Phase der nachtaktiven Tiere durchführen zu können.

Die verhaltensbiologischen Untersuchungen wurden jeweils mit Tieren im Alter von drei und zwölf Monaten durchgeführt.

2.2.1 „Open field“

Die „Open-field“-Untersuchungen wurden an drei aufeinander folgenden Tagen nach mindestens 14-tägiger Tag/Nacht-Umkehr durchgeführt. Sie dienten der Evaluation des Explorations- und Angstverhaltens sowie der Untersuchung lokomotorischer Fähigkeiten.

Die Tiere wurden ins Zentrum einer schwach beleuchteten (20-30 Lux) „Open field“ Box [s. Suppl. Abbildung 1: „Open field“ Untersuchung - Design und Auswerteparameter] gesetzt. Jede Sitzung wurde mit Hilfe der verhaltensbiologischen Dokumentations- und Auswertesoftware EthoVision (Version 3.1.16; Noldus Information Technology b.v., Wageningen, Niederlande) dokumentiert und nach Abschluss der Untersuchung ausgewertet.

Die Fläche der „Open field box“ wurde virtuell in ein Zentrum, in einen Korridor und Ecken, die zum Teil mit der Korridoromäne überlappten, unterteilt [s. Suppl. Abbildung 1: „Open field“ Untersuchung - Design und Auswerteparameter, a) - b)]. Die Anzahl der für jede Sitzung ermittelten Koordinaten in diesen Zonen wurde detektiert und daraus die Parameter „Centertime“, „Cornertime“ und „Corridortime“ ermittelt. Außerdem wurde die motorische Aktivität durch Monitoring der Anzahl der Eintritte in neun gleich große

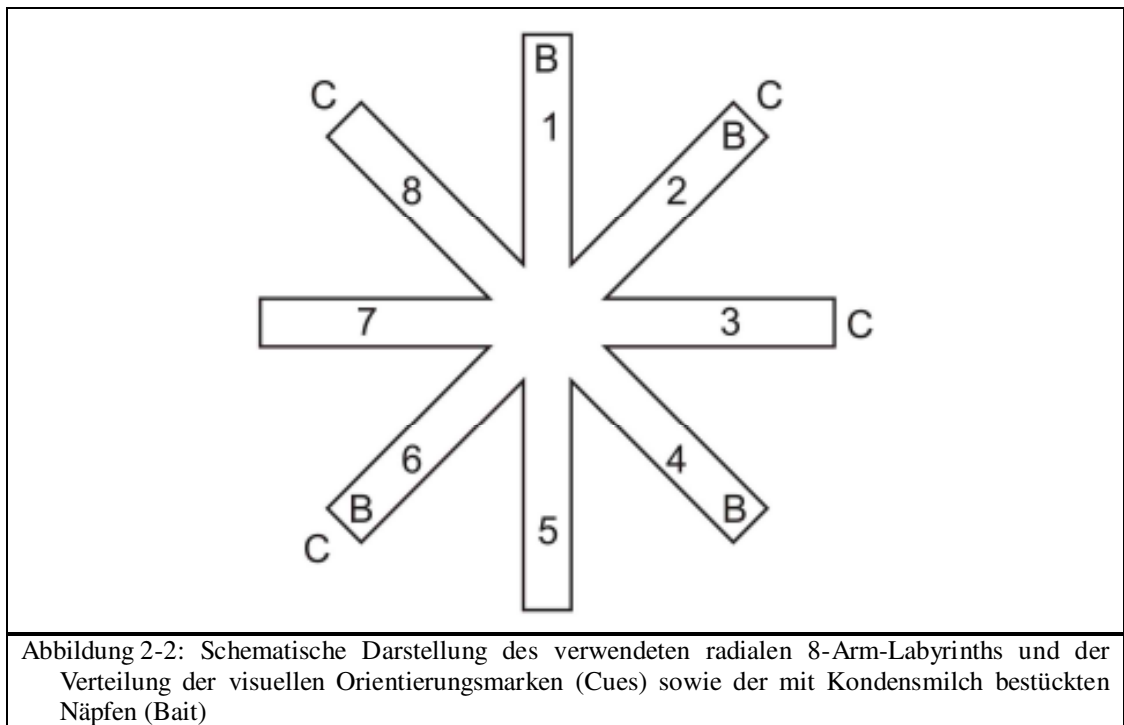
ⁱ Unter der Annahme, dass eine siebenstündige, sukzessive Vorverlegung der Dunkelphase binnen fünf Tagen seitens der Tiere kompensiert werden kann (A Santos, 2006. Cell proliferation and cell survival in the dentate gyrus of adult mice under naturalistic conditions. *Ludwig-Maximilians-Universität München.*)

Quadranten bestimmt [s. Suppl. Abbildung 1: „Open field“ Untersuchung - Design und Auswerteparameter, c)]. Das Experiment wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt.

2.2.2 Radiales 8-Arm-Labyrinth

Über insgesamt fünf Tage (zwei Tage vor und die drei Tage während der „Open field“-Untersuchungen) wurde der tägliche Futterbedarf jedes Tieres ermittelt und nach Abschluss der Untersuchungen die täglich gegebene Futtermenge nach einem Tag kompletten Fastens auf 80 % der ermittelten Menge reduziert. Die Tiere wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen jeweils 6 min in das verwendete Labyrinth [s. Abbildung 2-2] inklusive der visuellen Orientierungsmarken, jedoch ohne Näpfe gesetzt, um sich an die neue Umgebung und das Prozedere zu gewöhnen. Hierzu wurde die Maus zunächst für 60 s in ein Stück Rohr (\varnothing 120 mm) gesetzt und dieses abgedeckt, um eine Orientierung des Tieres basierend auf der Richtung, in der es in das Labyrinth gesetzt wurde, ausschließen zu können. Nach Ablauf der 60 Sekunden wurde das Rohr möglichst ohne Sichtkontakt der Maus zum Experimentator angehoben und aus dem Labyrinth entfernt. 5 min nach Start der Sitzung wurde das Tier dann wieder in den Käfig zurückgesetzt und bekam die individuell ermittelte Futtermenge.

Im Anschluss an die Gewöhnungsphase wurden die Tiere bei vollzählig mit 50 μ l Kondensmilch bestückten Näpfen nach oben beschriebenem Prozedere entweder bis zu 10 min oder bis zur Leerung aller Näpfe in das Labyrinth gesetzt, je nachdem, welcher Fall zuerst eintrat. Tiere, welche auch nach sieben Tagen keine Kondensmilch zu sich nahmen, wurden aus dem Versuch ausgeschlossen. Hierdurch wurde sichergestellt, dass ausschließlich Tiere in den Versuch eingeschlossen wurden, welche die Kondensmilch als Futter und somit auch als Belohnung annahmen.



Nach Akzeptanz der Kondensmilch als Futter / Belohnung wurden zur Bestimmung der Lernkurve des räumlichen Arbeits- und Referenzgedächtnisses [Olton, 1987] der verwendeten Tiergruppen nur noch vier Näpfe mit Kondensmilch bestückt (Arme 1, 2, 4 und 6 [s. Abbildung 2-2]). Die zu bestückenden Arme wurden so gewählt, dass sich keine axiale oder radiale Symmetrie ergab. Jede Sitzung wurde mit Hilfe der verhaltensbiologischen Dokumentations- und Auswertesoftware EthoVision (Noldus Information Technology b.v., Wageningen, Die Niederlande) dokumentiert und nach Abschluss der Untersuchung ausgewertet [s. Suppl. Abbildung 2: Radiales 8-Arm-Labyrinth - Design und Projektion der Tier-Koordinaten einer Sitzung]. Nach Auffinden und Leeren aller vier bestückten Näpfe, spätestens jedoch nach 10 Minuten, war die Sitzung beendet.

Nach Abschluss der Untersuchung wurde das Tier in den Käfig zurückgesetzt und gefüttert, das Labyrinth mit einem Sterillium-befeuchteten (Bode Chemie GmbH, Hamburg) Papierhandtuch gesäubert und um 22,5 Grad (einen Labyrintharm) gedreht, um eine Orientierung des nachfolgenden Tieres anhand von vom Vorgänger hinterlassenen Duftmarken auszuschließen.

2.3 Explantation der Gehirne nach Abschluss der verhaltensbiologischen Experimente

Im Anschluss an die verhaltensbiologischen Experimente wurden die Tiere unter Isofluran (DeltaSelect GmbH, München) Narkose mit eisgekühlter, 1 : 1.000 % (v/v) heparinierter Ringerlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) perfundiert, um ein möglichst blutfreies Explantat zu erhalten.

Hierzu wurde eine Schmetterlingskanüle, angeschlossen an eine 50 ml Spritze (BD PlastikpakTM, BD Biosciences, Heidelberg) mit der heparinisierten Ringerlösung, in den linken Ventrikel eingeführt und das rechte Atrium mit einer Präparierschere eröffnet. Über die Schmetterlingskanüle wurde das Tier bei möglichst geringem Druck bis zur Entfärbung der Leber perfundiert.

Danach wurde das Tier dekapitiert und das Gehirn auf Eis explantiert sowie in seine Hemisphären geteilt. Für die spätere Proteinbiochemie (2.7 Proteinbiochemische Untersuchungen) wurden *Bulbus olfactorius*, Kleinhirn und Stammhirn entfernt, das verbliebene Vorderhirn gewogen und in entsprechendem Puffer homogenisiert. Mit Ausnahme der Synaptosomenisolate, für die die Vorderhirne nach Homogenisation unmittelbar auf die Saccharose-Gradienten aufgetragen wurden (2.3.2 Isolation von Synaptosomen), wurde das Homogenat im Anschluss an die Präparation in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert (VIPTM Laboratory Freezer, SANYO Component Europe GmbH, München).

Für die spätere Anfertigung von Gefrierschnitten (2.5 Histologische Untersuchungen) wurde die gesamte Hemisphäre auf Aluminiumschiffchen luftblasenfrei mit Tissue-Tek[®] O.C.T.TM Compound (Sakura Finetek Germany GmbH, Heppenheim) überzogen und über Flüssigstickstoff-gekühltem Isobutanol bis zur vollständigen Trübung der Probenmatrix gefroren. Bis zur Anfertigung des Gefrierschnitte wurden die Hemisphären bei -80 °C gelagert.

2.3.1 RIPA- und SDS-Extraktion zur A β -Detektion

Homogenate der schockgefrorenen Hemisphären wurde mit modifiziertem RIPA-Puffer (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 % Na-Desoxycholat (DOC), 1 % NP-40) 30 Minuten auf Eis extrahiert. Nach Zentrifugation für 30 Minuten bei 10.0000-facher relativer Zentrifugalbeschleunigung (rcf, „relative centrifugal force“)

und 4 °C in einer gekühlten Laborzentrifuge (SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz) enthielt der Überstand die lösliche Proteinfraction. Das Sediment wurde in 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 % Natriumodecylsulfat (SDS, „sodium dodecylsulfate“) sonifiziert (8 × 1 s bei 10 % Leistung; Sonoplus, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin) und somit die unlöslichen Proteine solubilisiert.

2.3.2 Isolation von Synaptosomen für proteinchemische Untersuchungen

Gewogene Vorderhirnexplantate (2.3 Explantation der Gehirne nach Abschluss der verhaltensbiologischen Experimente) wurden mit 9-fachem Volumen (w/v) Synaptosomenpuffer (Rezeptur 3: Homogenisations- & Gradientenpuffer - Proteinbiochemie) mit Hilfe eines motorgetriebenen Pistills (15 Impulse bei 700 Umdrehungen pro Minute (rpm, „revolutions per minute“); PSB 650 RE, Robert Bosch GmbH, Gerlingen) bei 4 °C homogenisiert [modifiziert nach Stephan *et al.*, 2008]. Zwei ml des Homogenates wurden bei 800 × rcf und 4 °C für 5 Minuten in einer gekühlten Laborzentrifuge (SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz) abzentrifugiert, um Gewebs- und Zelltrümmer zu sedimentieren.

Der Rest des Homogenats wurde nach 8 × 1 s Beschallung bei 10 % Leistung in einem Ultraschall-Homogenisator (Sonoplus, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin) in Flüssigstickstoff schockgefrostet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Etwa 1.2 ml Überstand des zentrifugierten Homogenats („crude fraction“) wurden abgenommen, von denen 600 µl bei 16,000 × rcf und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert wurden. Das Sediment wurde in 300 µl 0,32 M Saccharosepuffer (Rezeptur 3: Homogenisations- & Gradientenpuffer - Proteinbiochemie; „washed fraction“) resuspendiert. Ein diskontinuierlicher Gradient wurde mit Homogenisationspuffer mit ansteigender Saccharosekonzentration (300 µl 1,4 M Saccharose und 500 µl 1.0 M Saccharose) in 1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen für 10 min bei 9.100 × rcf und 4 °C zentrifugiert. Die untere Interphase (130 - 160µl) wurde abgenommen, mit 1 ml ddH₂O, 1 : 500 Phosphatase-Inhibitor Cocktail (PIC) verdünnt, und die somit erneut gewaschenen Synaptosomen („well-washed fraction“) wurden 20 Minuten bei 16,000 × rcf und 4 °C (Ultrazentrifuge OptimaTM MAX-XP; Beckman Coulter GmbH, Krefeld) sedimentiert. Das Sediment wurde im

Anschluss mittels Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Sediment mit 50 - 150 µl RIPA-Puffer (Rezeptur 7: RIPA* Puffer - Lysis der Proben für die PAGE; abhängig von der weiteren Verwendung des Gels, 50 µl RIPA für Coomassie-Gele (2.7.4 Coomassie-Färbung), 150 µl für „Western blot“-Analysen (2.7.2 „Western blot“)) resuspendiert und 20 Minuten auf Eis lysiert.

2.3.3 Isolation synaptosomaler Mitochondrien zur Aktivitätsbestimmung

Zehn explantierte WT-Gehirne wurden nach einem modifizierten Protokoll von Stephan *et al.*, 2008 durch Homogenisation in Mitochondrienpuffer (Rezeptur 4: Homogenisationspuffer - synaptosomale Mitochondrien) mit Hilfe eines motorgetriebenen Pistills (zwölf Impulse bei 900 rpm; PSB 650 RE, Robert Bosch GmbH, Gerlingen) und 4 °C homogenisiert. Zwei ml des Homogenates wurden 10 Minuten bei 1000 × rcf 4 °C in einer gekühlten Laborzentrifuge (SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz) zentrifugiert.

Der Überstand wurde auf Eis aufbewahrt, das Sediment mit 500 µl Mitochondrienpuffer mittels Durchmischung auf einem Vortex (VWR International GmbH, Darmstadt) resuspendiert, mit Mitochondrienpuffer auf 2 ml aufgefüllt und erneut 10 Minuten bei 1000 × rcf 4 °C abzentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt und 15 Minuten in zwei 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen bei 9.200 × rcf zentrifugiert.

Das Sediment bestand aus einem grauen, soliden Anteil am Boden des Reaktionsgefäßes und einem weißen, flockigeren Anteil darüber. Letzterer wurde durch Zugabe von 500 µl Mitochondrienpuffer und vorsichtigem Auf- und Abpipettieren mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze einer Pipetman P200-Pipette (Gilson Inc., Middleton, U.S.A.) selektiv resuspendiert. Die Lösung wurde mit Mitochondrienpuffer auf 2 ml aufgefüllt und für 15 Minuten in 2 ml Reaktionsgefäßen bei 10.000 × rcf und 4 °C zentrifugiert.

Das Sediment wurde in 50 µl Mitochondrienpuffer resuspendiert, die einzelnen Präparationen vereinigt und je ein Drittel mit 10 µM 3-Morpholino-Sydnonimin (SIN-1) oder Peroxynitrit (ONOO) behandelt.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Kultivierung der Mausfibroblastenzelllinie

Mausfibroblasten der Linie L929 wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre in „Dulbecco's modified medium ‚High Glucose‘“ (DMEM HG; Gibco® via Invitrogen, Karlsruhe) mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS, „fetal calf serum“; Invitrogen, Karlsruhe) und 1 % (v/v) Penicillin-Streptavidin (Pen-Strep; Biochrom AG, Berlin) in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Grundfläche (BD Flacon™; BD Biosciences, Heidelberg) kultiviert und alle drei bis vier Tage mit 1 × Trypsin (Gibco® via Invitrogen, Karlsruhe) 1 : 8 subkultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium (30 ml) gewechselt, nach drei bis vier Tagen zur späteren Stimulation primärer Mikroglia (PMG; 2.4.2 Isolation primärer Mikroglia) abgenommen und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen erneut gesplittet und weiterkultiviert.

2.4.2 Isolation primärer Mikroglia

Gehirne neonataler Mäuse (bis max. drei Tage nach Geburt) wurden auf Eis explantiert und in eine mit Hanks' Salzlösung (HBSS, „Hanks' buffered salt solution“; Biochrom AG, Berlin) gefüllte 3 cm Petrischale (BD Flacon™; BD Biosciences, Heidelberg) transferiert und die Meningen mit spitzen Pinzetten entfernt [Hanisch *et al.*, 2004]. Bis zu zwölf hirnhautfreie Präparate wurden in einem 50 ml Zellkulturröhrchen (BD Flacon™; BD Biosciences, Heidelberg) mit HBSS gesammelt und im Anschluss drei Mal mit 10 ml HBSS gewaschen. Nach Absaugen der HBSS wurde 1 × Trypsin (Gibco® via Invitrogen, Karlsruhe) 1 : 250 in PBS (Rezeptur 6: PBS^{*}(T)^{**} - Trypsinisierung von Zellen in Kultur sowie für die Histologie) zugegeben, auf einem Vortex (VWR International GmbH, Darmstadt) kurz durchmischt und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach einer weiteren Durchmischung nach 5 Minuten wurde die Trypsinwirkung nach insgesamt 10 Minuten mit 7 - 8 ml DMEM HG, 10 % FCS, 1 % Pen-Strep (Gibco® via Invitrogen, Karlsruhe) gestoppt. Nach Zugabe von *DNase* I (0,001%; Gibco® via Invitrogen, Karlsruhe) wurde die Zellsuspension zunächst mit einer 10 ml, danach mit einer 5 ml sterilen Einwegpipette durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Danach wurden die PMG erneut abzentrifugiert, in 30 ml Medium aufgenommen

und je 5 ml in 10 ml vorgelegten Mediums in mit 0,01 % Poly-L-Lysin (PLL; Sigma-Aldrich, Steinheim) beschichteten 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert.

Ein bis zwei Tage nach der Präparation, je nach Anwachsrate der Zellen, wurde das Medium abgenommen, die Zellen drei Mal vorsichtig mit PBS gewaschen und 10 ml frisches Medium zugegeben. In der Folgezeit adhärten primär Astrozyten und Oligodendrozyten, wohingegen sich die Mikroglia auf diese astro- und oligodendrozytäre Schicht absetzten.

Etwa fünf Tage nach Präparation wurden 5 ml L929-Überstand (2.4.1 Kultivierung der Mausfibroblastenzelllinie) zur Aktivierung des mikroglialen Wachstums zugegeben.

Nach insgesamt acht Tagen wurden die Mikroglia das erste Mal vom astro- und oligodendrozytären Zellrasen abgeschlagen. Hierzu wurde ca. 5 Minuten mit der flachen Hand gegen die Wand der Zellkulturflasche geschlagen und die Rate der abgelösten Mikroglia regelmäßig im Binokular kontrolliert. Der Überstand wurde dann abgenommen und die PMG bei 12.000 rpm und 4 °C 5 Minuten sedimentiert.

Dieser Vorgang konnte bis zu vier Mal im Abstand von zwei bis vier Tagen wiederholt werden, bevor Fibroblasten die Kulturen überwuchsen und kontaminierten.

Die Zellzahl eines jeden Abschlags wurde mittels Trypanblau (0,4 %; Sigma-Aldrich, Steinheim)-Färbung und Zählung der lebenden Zellen mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die PMG unmittelbar für die Experimente verwendet.

2.4.3 Phagozytoseassay

Primäre Mikroglia (2.4.2 Isolation primärer Mikroglia) wurden in schwarzen 96-Loch Zellkulturplatten („Microtest, Black Flat Bottom“; BD Biosciences, Heidelberg) in 200 µl DMEM HG ohne Phenolrot, 10 %FCS, 1 % Pen-Strep mit 20.000 Zellen / Loch ausgesät und über Nacht inkubiert, um sie an die Zellkulturplatte adhären zu lassen.

Nach 24 h wurden den Zellen 100 µl Medium inklusive der entsprechenden Stimuli und des zu phagozytierenden 5-FAM SE-gekoppelten A β ₁₋₄₂ [s. Tabelle 2-2: Konzentrationen der Stimuli und des fluoreszierenden A β] zugegeben. Lediglich A β ₁₋₄₂, welches zur Aktivierung der Mikroglia dienen sollte, wurde sechs Stunden

vor Zugabe des FAM-A β_{1-42} zur Ermittlung der Phagozytoserate A β_{1-42} -aktivierter Mikroglia zu den Zellen gegeben.

Tabelle 2-2: Konzentrationen der Stimuli und des fluoreszierenden A β		
	Doppelte Konzentration in Phenolrot-freiem DMEM*	Finale Konzentration
L-NIL	20 μ M	10 μ M
A β_{1-42}	10 μ M	5 μ M
SNAP**	200 μ M	100 μ M
Cytochalasin D***	10 μ M	5 μ M
FAM- A β_{1-42} ****	300 nM	150 nM
* „high glucose“, 10 % FCS, 1 % Pen-Strep (Gibco [®] via Invitrogen, Karlsruhe) ** S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (Cayman Chemicals via IBL International GmbH, Hamburg) *** Sigma-Aldrich, Steinheim **** 5-FAM SE (5-carboxyfluoreszein)-gekoppeltes Amyloid- β_{1-42} -Peptid (AnaSpec, San Jose, U.S.A.)		

Nach sechs Stunden Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen, Trypanblau (0,4 %; Sigma-Aldrich, Steinheim) 1 : 16 mit PBS verdünnt und je 100 μ l für 1 Minute zum "Quenching" (Fluoreszenzlöschung) zugegeben. Im Anschluss wurden die Zellen ein Mal vorsichtig mit PBS gewaschen und vor der Messung 100 μ l 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS, „sodium dodecylsulfate“) in 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) zugeben. Die Fluoreszenz des phagozytierten A β_{1-42} wurde mit Hilfe des SpectraFluor Plus und der Magellan[™]-Software (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bei 485 nm Anregungswellenlänge und 535 nm Emissionswellenlänge ermittelt.

2.5 Histologische Untersuchungen

2.5.1 Anfertigung der Gefrierschnitte

Die nach Abschluss der verhaltensbiologischen Experimente explantierten und mit Tissue-Tek[®] O.C.T.[™] Compound überzogenen Hemisphären wurden im Gefriermikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar) bei -20 °C Kammertemperatur akklimatisiert und mit einem Tropfen Tissue-Tek[®] auf einen Superfrost-Objektträger (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen) fixiert. Eine mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Luisa de Cola (Physikalisches Institut der WWU) gefräste Form aus 1 cm Aluminiumblech mit pyramidaler Aussparung wurde mit Hilfe zweier Edelstahl-Dokumentklammern mit ihrer schmaleren Aussparung zum Objektträger um die Hemisphäre herum fixiert. Die Form wurde luftblasenfrei mit Tissue-Tek[®] befüllt und im Gefriermikrotom gefroren. Somit war es nach Entfernung des Objektträgers möglich, die Hemisphäre sagittal von median nach laterad zu schneiden.

Die 10 µm dicken Schnitte (-20 - -21 °C Klingentemperatur) wurden durch das Schmelzen des Tissue Tek[®] auf den Raumtemperatur (RT)-warmen, vornummerierten Gefrierobjektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden bis zur Färbung bei -80 °C gelagert.

2.5.2 Thioflavin-S-Färbung

Die Objektträger wurden 30 Minuten bei RT getrocknet und 20 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd (PFA; Roti[®]-Histofix; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) fixiert. Die Schnitte wurden danach drei Mal in ddH₂O gespült und 35 Minuten in 0,01 % Thioflavin-S in 80 % Ethanol, 20 % PBS (Rezeptur 6: PBS*(T)** - Trypsinisierung von Zellen in Kultur sowie für die Histologie) gefärbt. Die anschließende Differenzierung erfolgte für ca. 35 Minuten in 80% Ethanol in PBS. Die Schnitte wurden 10 Minuten bei RT getrocknet und mit Mowiol 4-88 (Calbiochem, Darmstadt) eingedeckelt.

Die gefärbten Präparate wurden bis zur mikroskopischen Dokumentation bei -20 °C gelagert.

2.5.3 Immunhistochemische Färbungen

2.5.3.1 A β / CD11b Co-Färbung

Die Schnitte wurden 30 Minuten bei RT getrocknet, mit Roti[®]-„Liquid Barrier“ (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) umrandet, 20 Minuten mit 4 % PFA fixiert und zunächst 10 Minuten bei RT in „Mouse BD Fc-Block“ (BD Biosciences, Heidelberg), 0,1 % (v/v) in PBST, sowie danach eine Stunde in 5 % normalem Eselserum (NDS, „normal donkey serum“) in PBST geblockt. Vor und nach jedem Blocken wurden die Schnitte je drei Mal fünf Minuten in PBST gewaschen.

Die primären Antikörper, der polyklonale anti-Amyloid- β (1-40) Antikörper 2964 [Wahle *et al.*, 2006] aus Kaninchen sowie monoklonaler anti-CD11b Antikörper aus der Ratte (AbD Serotec, Raleigh, U.S.A.) wurden 1 : 250 für eine Stunde in 1 % (w/v) bovinem Serumalbumin (BSA) in PBST parallel zum Blocken der Schnitte vorinkubiert. Die Schnitte wurden aus der Blockierlösung genommen und über Nacht in einer feuchten Kammer mit der Lösung der primären Antikörper bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte in der feuchten Kammer 45 Minuten bei RT akklimatisiert und drei Mal fünf Minuten in PBST gewaschen. Im Anschluss wurden sie eine Stunde bei RT mit den sekundären Antikörpern (Alexa Fluor[®] 488 Antigenbindenden Fragments (F(ab')₂, „fragment antigen-binding“) eines anti-Ratte IgG aus der Ziege (1 : 500 in PBST; Bindung an den anti-CD11b-Erstantikörper) und Texas Red[®] F(ab')₂ Fragment eines anti-Kaninchen Antikörpers (1 : 2.000 in PBST; Bindung an den anti-A β ₁₋₄₀ Erstantikörper; beide Sekundärantikörper Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST und kurzem Spülen mit ddH₂O wurden die Schnitte mit Mowiol 4-88 (Calbiochem, Darmstadt) eingedeckelt.

2.5.3.2 GFAP-Färbung

Die Schnitte wurden 30 Minuten bei RT getrocknet, mit Roti[®]-„Liquid Barrier“ (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) umrandet, 20 Minuten mit 4 % PFA fixiert und eine Stunde in 5 % (v/v) NDS in PBST geblockt. Vor und nach jedem Blocken wurden die Schnitte je drei Mal fünf Minuten in PBST gewaschen.

Der primäre, polyklonale anti-saures Gliafaserprotein (GFAP, „glial fibrillary acidic protein“) Antikörper aus Kaninchen (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) wurde

1 : 900 eine Stunde in 2 % (v/v) NDS in PBST parallel zum Blocken der Schnitte vorinkubiert. Die Schnitte wurden aus der Blockierlösung genommen und über Nacht in einer feuchten Kammer mit der Lösung des primären Antikörpers bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte in der feuchten Kammer 45 Minuten bei RT akklimatisiert und drei Mal fünf Minuten in PBST gewaschen. Im Anschluss wurden sie eine Stunde bei RT mit dem sekundären Antikörper (Texas Red[®] F(ab')₂ Fragment eines anti-Kaninchen IgG (1 : 2.000 in PBST) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST und kurzem Spülen mit ddH₂O wurden die Schnitte mit Mowiol 4-88 (Calbiochem, Darmstadt) eingedeckelt.

2.5.3.3 NeuN-Färbung

Die Schnitte wurden 30 Minuten bei RT getrocknet, mit Roti[®]-„Liquid Barrier“ (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) umrandet, 20 Minuten mit 4 % PFA fixiert und eine Stunde in 5 % NDS in PBST geblockt. Vor und nach jedem Blocken wurden die Schnitte je drei Mal fünf Minuten in PBST gewaschen.

Der primäre, monoklonale anti-„neuronal nuclei“ (NeuN) Antikörper aus der Maus (Abcam Inc., Cambridge, U.S.A.) wurde 1 : 250 eine Stunde in 2 % (v/v) NDS in PBST parallel zum Blocken der Schnitte vorinkubiert. Die Schnitte wurden aus der Blockierlösung genommen und über Nacht in einer feuchten Kammer mit der Lösung des primären Antikörpers bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte in der feuchten Kammer 45 Minuten bei RT akklimatisiert und drei Mal fünf Minuten in PBST gewaschen. Im Anschluss wurden sie 30 Minuten bei RT mit dem sekundären Antikörper (Texas Red[®] F(ab')₂ Fragment eines anti-Maus IgG 1 : 400 in PBST; Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST und kurzem Spülen mit ddH₂O wurden die Schnitte mit Mowiol 4-88 (Calbiochem, Darmstadt) eingedeckelt.

Alle immunhistochemischen Präparate wurden bis zur mikroskopischen Dokumentation bei -20 °C gelagert.

2.5.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung, Dokumentation und Analyse

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung und fotografische Dokumentation erfolgte an einem Olympus BX61 Fluoreszenzmikroskop mit F-view II Digital Mikro Kamera (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg). Die Fotografien wurden mit Hilfe der Imaging-Software cell[^]P (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster) angefertigt und ausgewertet [s. Suppl. Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Wahl der Regionen von Interesse (ROI, „region of interest“; rote Linie) an Thioflavin-S-gefärbten Schnitten zwölf Monate alter APP/PS1-transgener Tiere (a) *Hippocampus* (Hc), b) *Cortex* (Cx)].

2.6 Langzeitpotenzierung *in vitro*

Es wurden elektrophysiologische Messungen an akuten Hirnschnittpräparaten vier Monate alter Mäuse durchgeführt. Hierzu wurden die Mäuse unter Isoflurananästhesie dekapitiert. Die Gehirne wurden entnommen und mit Hilfe eines Vibratoms (Integraslice 7550 PSDS; Campden Instruments, Loughborough, Großbritannien) in 4 °C kalter artifizierender cerebrospinaler Flüssigkeit (aCSF, Rezeptur 1: aCSF* - Medium für die LTP-Messungen) sagittal in 400 µm dicke Schnitte geschnitten. Unter einem Binokular wurde der Hippocampus herausgetrennt und in eine interface-Haltekammer in auf 29 °C temperierten, sauerstoffangereicherten artifizierender *Liquor cerebrospinalis* überführt.

Nach 30-minütiger Inkubation wurde die CaCl₂-Konzentration auf 2 mM erhöht. Anschließend ruhten die Hippokampusschnitte mindestens weitere 30 Minuten, bevor sie in eine Interface-Messkammer überführt wurden. Hier wurden sie für 15 Minuten äquilibriert. Die Stimulationselektrode wurde in das CA2 Areal der Schaffer-Kollaterale und die Ableitelektrode (0,8-2 MΩ) in die CA1 Region der Pyramidenzellschicht platziert. Die Messung der exzitatorischen, postsynaptischen Feldpotentiale (fEPSPs) wurde nach weiteren 15 Minuten begonnen. Die basale synaptische Transmission (BST) wurde durch das Auftragen der Stromstärke (mA) gegen die Maximalamplitude der fEPSPs bestimmt, um die Eingangs-Ausgangsbeziehung festzustellen. „Paired pulse“ Faszilitierung (PPF) wurde durch Stimulation mit Doppelpulsen in Interpulsintervallen von 30, 50, 75 und 100 ms vor und nach Induktion der LTP gemessen.

Für die LTP-Experimente wurden die Potentiale mit etwa 30 % des maximalen Signals im Pulsabstand von einer Minute abgeleitet. Nach Aufzeichnung einer stabilen Grundlinie von mindestens 15 Minuten wurde LTP durch einen sogenannten „Theta-Burst“ (vier Sequenzen bestehend aus 10 Pulsen von 100 Hz im Abstand von 200 ms) induziert. Anschließend wurde die postthetischen fEPSPs für weitere 90 Minuten mit Interpulsintervallen von einer Minute aufgezeichnet. Die Steigung der fEPSPs wurde vor und nach thetanischer LTP-Induktion bestimmt und prozentual auf die Grundlinie normalisiert.

ⁱ Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Thea Hammerschmidt

2.7 Proteinbiochemische Untersuchungen

2.7.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Der Proteingehalt zu untersuchender Proben (RIPA- und SDS-Extrakte, Homogenate und Synaptosomenfraktionen) wurde mit Hilfe des Pierce Bicinchoninsäure (BCA, „bicinchoninic acid“) Protein Assay Kit (via Thermo Fisher Scientific, Bonn) und eines SpectraFluor Plus (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) quantifiziert. Abhängig von der anschließenden Verwendung des Gels („Western blot“ (WB) oder Coomassie-Färbung) wurden Volumina der unterschiedlichen Proben mit 25 - 350 µg Proteingehalt mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O, „double distilled water“; Millipore, Molsheim, Frankreich) auf gleiche Volumina gebracht und durch Zugabe von vierfach konzentriertem Glycerol-haltigen LDS-Ladepuffer (Invitrogen, Karlsruhe; mit Coomassie G250 und Phenolrot als Indikator-Farbstoffen) für die anschließende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) vorbereitet. Für denaturierende Läufe wurden die Proben mit 50 mM Dithiothreitol (DTT) gemäß Herstellerangaben reduziert.

Für die PAGE wurden NuPAGE[®]-Bis-Tris-Gele der Firma Invitrogen (Karlsruhe) mit einem graduellen Acrylamidanteil von 4 - 12 % entsprechend der empfohlenen Ladevolumina des Herstellers mit den Proben beladen und diese je nach Größe des zu detektierenden Proteins / der zu detektierenden Proteine in NuPAGE[®] MES (zur Separation von Proteinen mit einem Molekulargewicht von < 100 kDa) oder NuPAGE[®] MOPS (zur Separation von Proteinen mit einem Molekulargewicht von > 100 kDa) Laufpuffer bei 175 V entsprechend ihrer relativen Größe aufgetrennt.

2.7.2 „Western blot“

Zur „Western blot“ Analyse wurden die in der PAGE (2.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese) im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine in 1 × Tris-Glycin-Puffer mit 20 % (v/v) Methanol (Rezeptur 11: TG* - “Western blot“-Transfer) im Trans-Blot Cell System (Bio-Rad, München, Deutschland) eine Stunde bei 170 mA auf zuvor methanolaktivierte Polyvinylidenfluorid (PVDF; für Aβ-Blots: Nitrocellulose (NC)) Membran transferiert. Aβ-Blots auf Nitrocellulosemembran wurden im Anschluss an den Transfer fünf Minuten in ddH₂O gekocht. Die Membranen wurden drei Mal fünf Minuten mit TBST (Rezeptur 10: TBS*(T)** - Waschen und Blocken der Blot-Membranen) gewaschen, mit 0,3% Tween-20 in

TBST (für A β -Blots: 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST) für eine Stunde geblockt. Die Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper [s. Tabelle 2-3: Verwendete Antikörper] erfolgte in der Blockierlösung bei 4 °C über Nacht auf einem Taumelschüttler (GfL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) im Kühlraum.

Tabelle 2-3: Verwendete Antikörper Ziel(protein), Wirtsspezies, Verdünnungen und Hersteller			
Ziel(protein)	Wirtsspezies	Verdünnung	Hersteller
140 (APP & CTF)	Kaninchen	siehe Wahle <i>et al.</i> , 2006	
A β ₁₋₁₆	Maus	1 : 1.000	Covance
IDE	Kaninchen	1 : 5.000	Calbiochem
GRP75	Maus	1 : 1.000	GeneTex Inc.
GRP94	Kaninchen	1 : 500	Abcam Inc.
NY	Maus	1 : 500	Cayman Chemicals
NMDA-R1	Maus	1 : 1.000	Synaptic Systems
PS1	Kaninchen	1 : 1.000	Calbiochem
SNO-C	Kaninchen	1 : 500	Sigma-Aldrich
Tubulin	Maus	1 : 5.000	Developmental Studies Hybridoma Bank
Abcam Inc. (Cambridge, U.S.A.) Calbiochem (via Merck KGaA, Darmstadt) Cayman Chemical (Ann Arbor, U.S.A.) Covance (Princeton, U.S.A.) Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowy City, U.S.A.) GeneTex Inc. (Irvine, U.S.A.) Sigma-Aldrich (Steinheim) Synaptic Systems (Göttingen)			

Am nächsten Tag wurden die Membranen drei Mal fünf Minuten in TBST gewaschen. Im Anschluss wurden sie bei entsprechender Blockierung eine Stunde bei RT mit dem der Wirtsspezies des Erstantikörpers entsprechenden, Meerrettich-Peroxidase (HRP, „horse raddish peroxidase“)-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert.

Nach erneuter dreifacher Waschung der Membranen in TBST wurden die detektierten Banden mittels verstärkter Chemielumineszenz (ECL, „enhanced

chemiluminescence“; Millipore, Schwalbach) detektiert und mit Hilfe des ChemiDoc XRS Systems (Bio-Rad, München) dokumentiert und analysiert.

2.7.3 Immunpräzipitation zur Maldi-TOF-Massenspektrometrie

Zur Immunpräzipitation wurden 0,5 µg des anti-Nitrotyrosin-Antikörpers (Cayman Chemical, Ann Arbor, U.S.A.) resp. anti-S-Nitrosocystein-Antikörpers (Sigma-Aldrich, Steinheim), *ad* 300 µl mit RIPA Puffer (Rezeptur 7: RIPA* Puffer - Lysis der Proben für die PAGE) sowie 50 µl Protein G Sepharose (Sigma-Aldrich, Steinheim), gemäß Herstellerangaben rekonstituiert, zur entsprechenden Probe (Gehirnhomogenat und / oder Synaptosomenisolat) zugegeben und über Nacht im Kühlraum auf einem Rotator inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Sepharose-Antikörper Suspension zwei Minuten bei 5.000 rpm und 4 °C in einer gekühlten Eppendorf Zentrifuge sedimentiert und anschließend zwei Mal mit 500 µl eiskaltem RIPA Puffer gewaschen. Nach Resuspension des Pellets in 500 µl RIPA Puffer wurden 500 µg Gesamtprotein der synaptosomalen Lysate zugegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert. Nach zwei RIPA Waschschritten wurden die Pellets bei 350 rpm und 25 °C auf einem Thermoblock für zehn Minuten mit 40 µl 1 × NuPage[®] LDS Ladepuffer (Invitrogen, Mannheim) ohne DTT inkubiert. Die Proben wurden, wie unter 2.7.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese beschrieben, aufgetrennt und Proteine mittels Coomassie-Färbung gefärbt und anschließend ausgeschnitten (2.7.4 Coomassie-Färbung).

2.7.4 Coomassie-Färbung

Vor der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation Flugzeit-Massenspektrometrie (Maldi-TOF-MS, „matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry“) Analyse durch Prof. Dr. Simone König an der Serviceeinheit „Integrierte Funktionelle Genomik“ (IFG) des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität (WWU) Münster wurden die Gele eine Stunde bei Raumtemperatur in Fixierlösung auf einem Taumelschüttler (GfL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) inkubiert, 3× 20 Minuten in ddH₂O gewaschen, eine Stunde bei Raumtemperatur in Färbelösung ohne Coomassie equilibriert und über Nacht bei +2 - +8 °C auf einem Taumelschüttler gefärbt (Rezeptur 2: Coomassie-Färbung - Anfärbung von Proteinbanden für die Maldi-TOF-MS). Am

nächsten Tag wurde die Farbintensität der Proteinbanden auf einem Durchlichttisch (Biotec-Fisher GmbH, Reiskirchen) beurteilt und das Gel gegebenenfalls eine weitere Nacht gefärbt. Deutlich gefärbte Banden wurden mit Einweg-Skalpellen (Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan) ausgeschnitten und bis zur Maldi-TOF-MS bei -80 °C gelagert.

2.7.5 „Enzyme-linked immunosorbent assay“

Die Quantifizierung der A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂ Konzentrationen in RIPA (Rezeptur 7: RIPA* Puffer - Lysis der Proben für die PAGE)-löslichen und SDS-löslichen Vorderhirnhomogenaten (2.3 Explantation der Gehirne nach Abschluss der verhaltensbiologischen Experimente) wurde mit Hilfe der humanen Amyloid A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂ „Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) Kits (The Genetics Company, Schlieren, Schweiz) gemäß Herstellerangaben vorgenommen. Nach dem Prinzip des Festphasen-Enzym-Immunoassays ist der Boden der ELISA-Platte mit einem Primärantikörper (Fangantikörper), selektiv für den C-Terminus des A β ₁₋₄₀ oder A β ₁₋₄₂, beschichtet. Ein weiterer, Biotin-konjugierter Antikörper (Detektionsantikörper) bindet an ein weiteres Peptid-Epitop, wodurch der sogenannte „Sandwich-Komplex“ (Fangantikörper - A β ₁₋₄₀ o. A β ₁₋₄₂) - Detektionsantikörper) entsteht. Durch Katalyse der Reaktion von Trimethylbenzidin (TMB) mit H₂O₂ zu Benzidinblau, katalysiert durch Streptavidin-konjugierte Meerrettichperoxidase, kann die Intensität des entstandenen Chromogens photometrisch gemessen werden. Durch Zentrifugation bei 100.000 × rcf für 20 Minuten wurde das Homogenat geklärt und anschließend auf den Konzentrationsbereich des im Kit enthaltenen Standards eingestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Verhaltensbiologische Untersuchungen

3.1.1 „Open field“

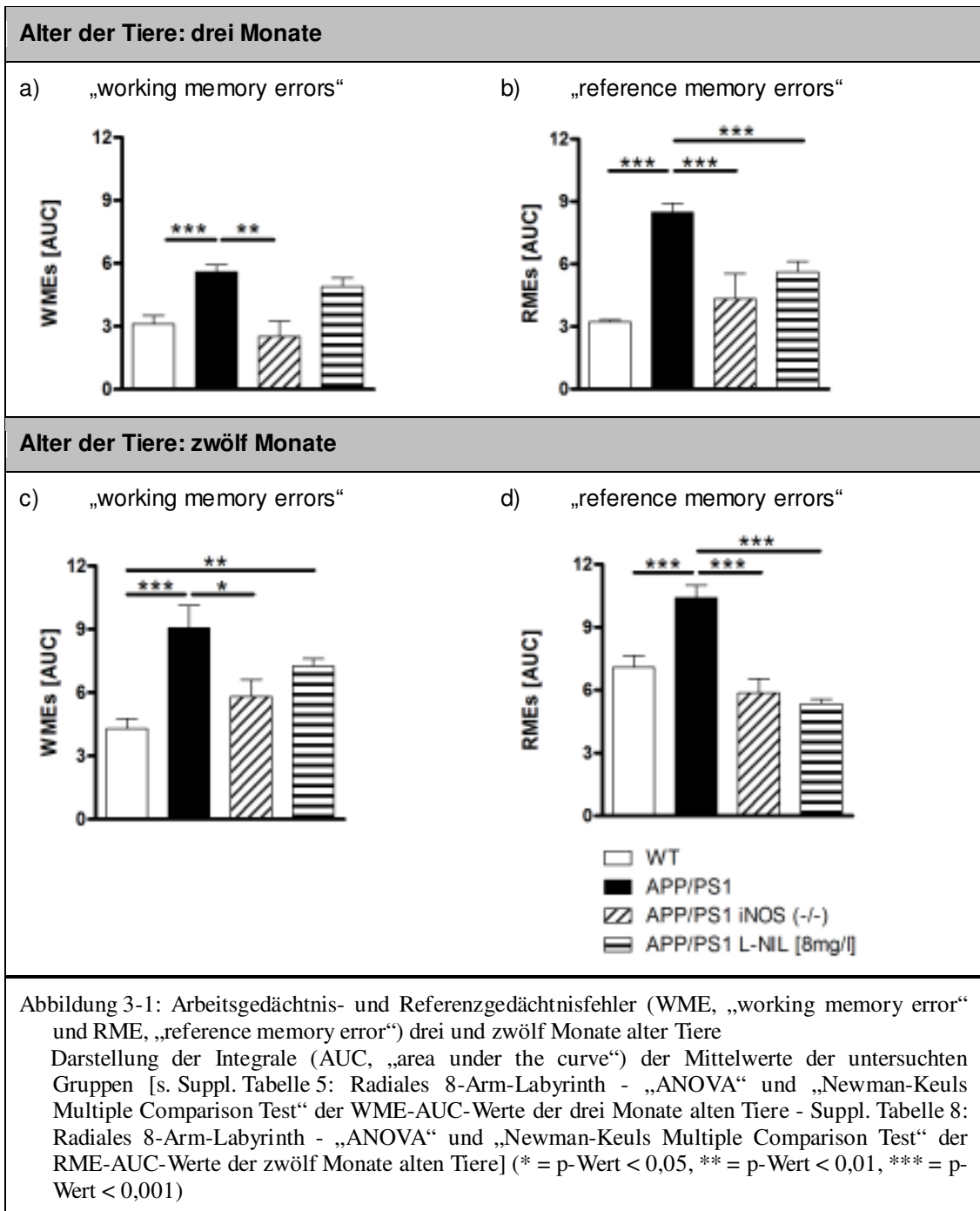
Die durch die „Open field“-Untersuchungen ermittelten Daten für die Parameter „Centertime“, „Cornertime“, „Corridortime“ sowie „Gridchange“ mussten nach Analyse der inter- und intraindividuellen Werte als nicht signifikant unterschiedlich zwischen den untersuchten Tiergruppen (WT, APP/PS1-tg, APP/PS1-tg iNOS^(-/-) und APP/PS1 + 8 mg/l L-NIL) beurteilt werden [s. Suppl. Abbildung 3: „Open field“ - MW und SEM der „Centertime“- , „Cornertime“- , „Corridortime“- und „Gridchange“-Werte der drei Monate alten Tiere, Suppl. Abbildung 4: „Open field“ - MW und SEM der „Centertime“- , „Cornertime“- , „Corridortime“- und „Gridchange“-Werte der zwölf Monate alten Tiere, Suppl. Tabelle 3: „Open field“ - MW und SEM der drei Monate alten Tiere, Suppl. Tabelle 4: „Open field“ - MW und SEM der zwölf Monate alten Tiere]. Bis auf eine geringfügige Erhöhung der allgemeinen motorischen Aktivität (Parameter „Gridchange“) der Wildtyp (WT) und APP/PS1-tg iNOS^(-/-) Mäuse zeigten sämtliche andere Parameter („Centertime“, „Cornertime“ und „Corridortime“) keinerlei signifikanten Unterschiede.

3.1.2 Radiales 8-Arm-Labyrinth

Als Arbeitsgedächtnis-Fehler (WMEs, „working memory errors“) wurden sämtliche Wiedereintritte des Tieres in bereits in der selben Sitzung besuchten Arme des Labyrinths gewertet, unabhängig davon, ob der Napf mit der Belohnung bestückt war oder nicht. Referenzgedächtnis-Fehler (RMEs, „reference memory errors“) waren als Eintritte in nicht-bestückte Arme definiert.

Die Integrale (AUC, „area under the curve“) der Lernkurven (WME/d und RME/d) der einzelnen Tiere im Alter von drei und zwölf Monaten wurden ermittelt, die Gruppenmittelwerte und -standardfehler bestimmt und mittels „One-way analysis of variance (ANOVA)“ sowie „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“ [s. Suppl. Tabelle 5: Radiales 8-Arm-Labyrinth - „ANOVA“ und „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“ der WME-AUC-Werte der drei Monate alten Tiere - Suppl. Tabelle 8: Radiales 8-Arm-Labyrinth - „ANOVA“ und „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“ der RME-AUC-Werte der zwölf Monate alten Tiere] hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht.

Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind im Folgenden wiedergegeben [s. Abbildung 3-1: Arbeitsgedächtnis- und Referenzgedächtnisfehler (WME, „working memory error“ und RME, „reference memory error“) drei und zwölf Monate alter Tiere].



APP/PS1-transgene Tiere zeigten sowohl im Alter von drei, als auch zwölf Monaten signifikant mehr Arbeits- und Referenzgedächtnisfehler sowohl als WT, als auch APP/PS1-tg iNOS^(-/-) Mäuse. Die mit L-NIL-behandelten, APP/PS1-tg Tiere zeigten

gegenüber den APP/PS1-transgenen eine zu beiden Zeitpunkten signifikant geringere Referenzgedächtnisfehlerrate.

3.2 Langzeitpotenzierung *in vitro*

Bereits 1989 berichtete Richard Morris von Beeinträchtigungen räumlicher Gedächtnisleistungen im Zusammenhang mit reduzierter Langzeitpotenzierung (LTP, „log term potentiation“) [Morris, 1989]. Daher wurden die exzitatorischen postsynaptischen Feldpotentiale (fEPSP, „field excitatory postsynaptic potentials“) der Tiere der drei Monate alten Gruppe nach Abschluss der verhaltensbiologischen Untersuchungen (*i.e.* im Alter von ca. vier Monaten) mittels extrazellulärer Ableitung der postsynaptischen Feldpotentiale des *Stratum radiatum* der CA1-Region des Hippocampus ermittelt.

Die folgende Abbildung [Abbildung 3-2: Mittelwerte der prozentualen fEPSP-Werte (Amplitude und Steigung) der untersuchten Gruppen nach LTP-Induktion] zeigt die prozentuale Veränderung der fEPSP der untersuchten Gruppen unmittelbar nach LTP-Induktion (a) Amplitude und b) Steigung 1 - 115 s nach Stimulation).

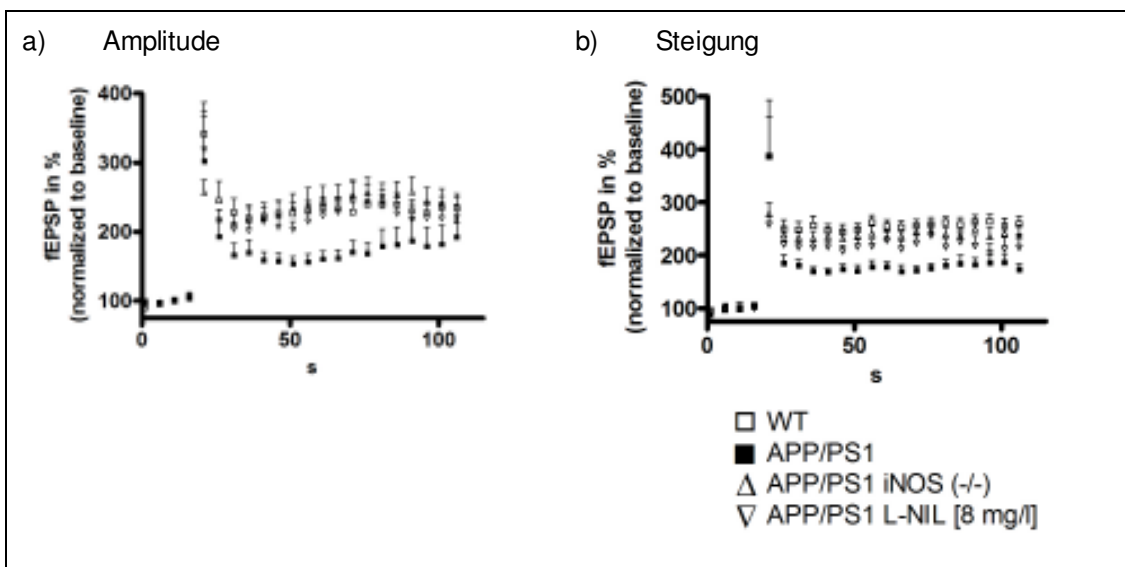


Abbildung 3-2¹: Mittelwerte der prozentualen fEPSP-Werte (Amplitude und Steigung) der untersuchten Gruppen nach LTP-Induktion
Darstellung der mittleren exzitatorischen postsynaptischen Feldpotentials (a) Amplitude und b) Steigung) unmittelbar nach Stimulation für die untersuchten Gruppen

Für die Unterschiede in Amplitude und Steigung der untersuchten Gruppen 10 („Timepoint 1“) und 60 Minuten („Timepoint 2“) nach LTP-Induktion wurden Mittelwert und Standardfehler berechnet [s. Abbildung 3-3: Mittelwerte der prozentualen fEPSP-Werte (Amplitude und Steigung) der untersuchten Gruppen bei sowie Mittelwerte nach zehn Minuten und 60 Minuten nach LTP-Induktion].

¹ Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Thea Hammerschmidt

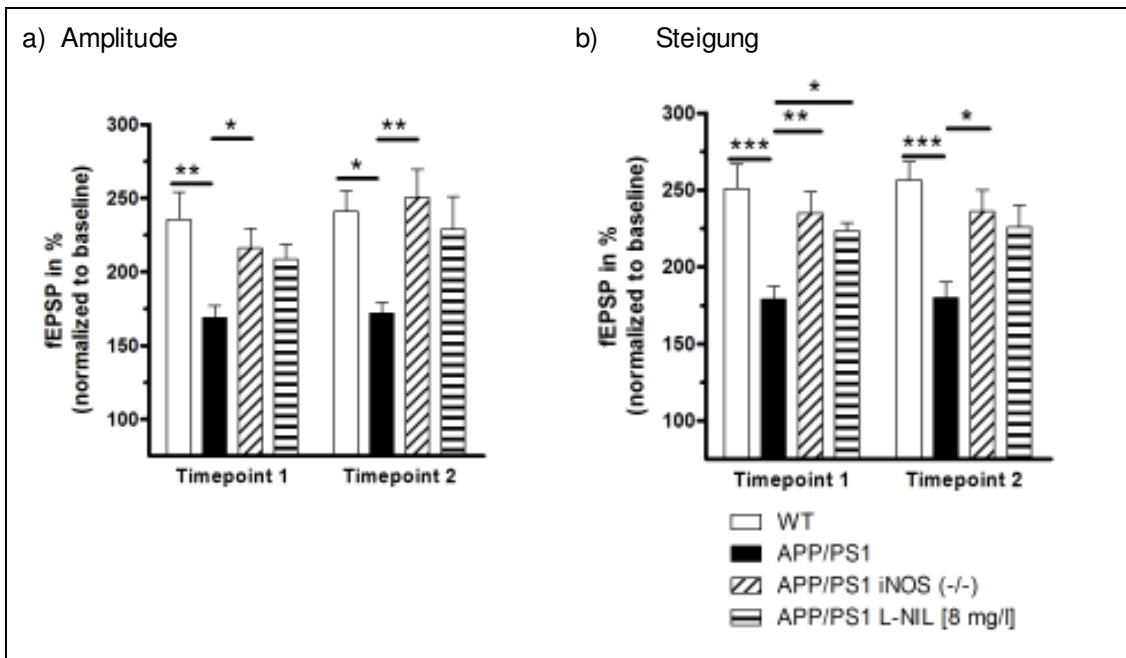


Abbildung 3-3: Mittelwerte der prozentualen fEPSP-Werte (Amplitude und Steigung) der untersuchten Gruppen bei sowie Mittelwerte nach zehn Minuten und 60 Minuten nach LTP-Induktion

Prozentuale Steigerung der fEPSP der Amplituden (a) und Steigungen (b) der untersuchten Gruppen 10 („Timepoint 1“) und 60 Minuten („Timepoint 2“) nach LTP-Induktion [s. Suppl. Tabelle 9: Langzeitpotenzierung - „ANOVA“, „Bartlett’s test for equal variances“ und „Turkey’s Multiple Comparison Test“ der prozentualen Amplitudenänderung 10 Minuten nach Induktion - Suppl. Tabelle 12: Langzeitpotenzierung - „ANOVA“, „Bartlett’s test for equal variances“ und „Turkey’s Multiple Comparison Test“ der prozentualen Steigungsänderung 60 Minuten nach Induktion] (* = p-Wert < 0,05, ** = p-Wert < 0,01, *** = p-Wert < 0,001)

APP/PS1-transgene Tiere zeigten zu beiden Zeitpunkten signifikant reduzierte Amplituden, verglichen mit WT und APP/PS1 iNOS^(-/-) Mäusen. Bezüglich der abgeleiteten Steigung konnte dieses Ergebnis bestätigt werden, zudem konnte 10 Minuten nach LTP-Induktion eine signifikant niedrigere abgeleitete Steigung APP/PS1-transgener Tiere im Vergleich zu mit L-NIL-behandelten APP/PS1-transgenen Mäusen festgestellt werden.

3.3 Analyse der Mengen von A β und anderen Proteinen in Ganzhirn-Homogenatenⁱ

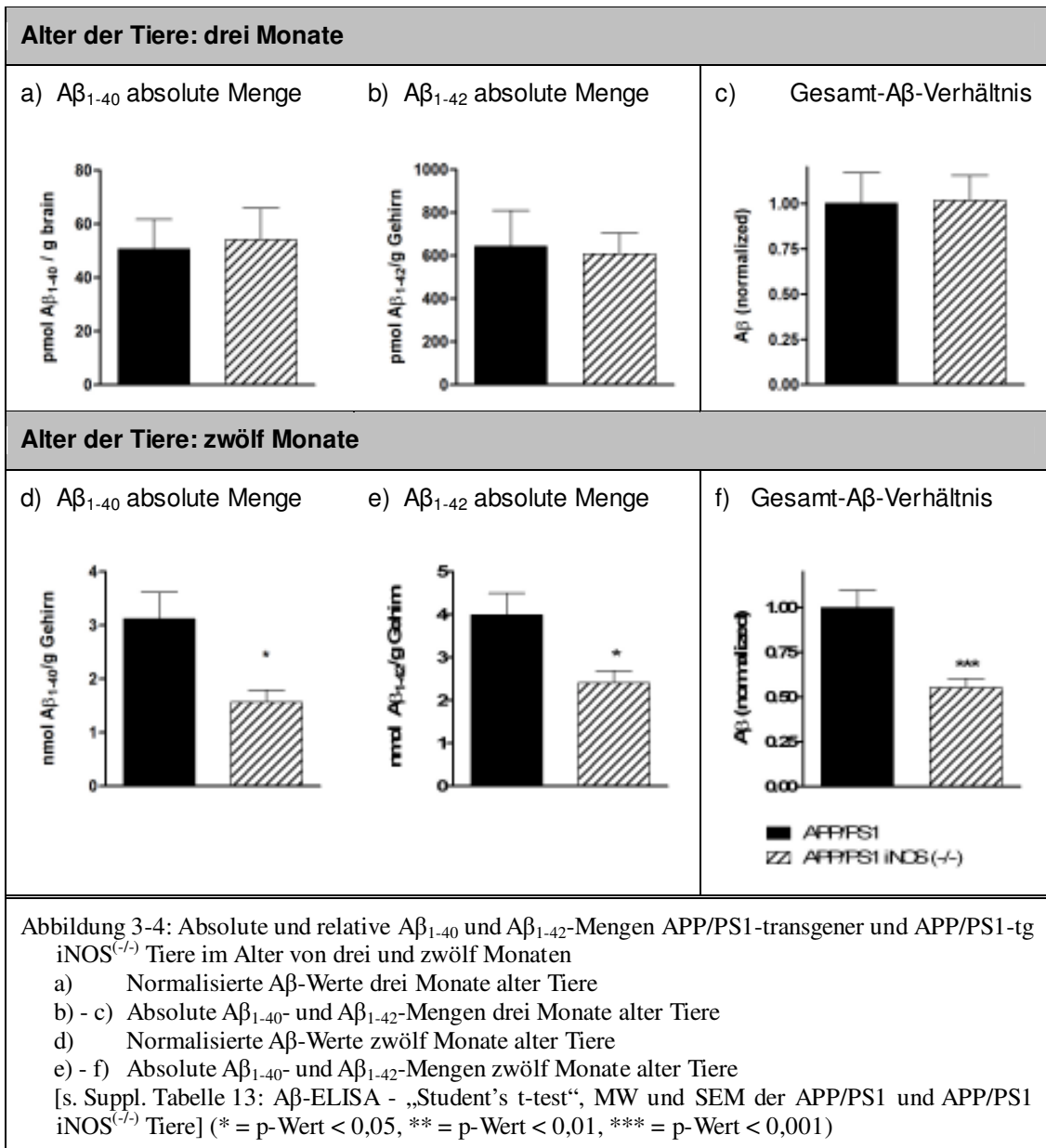
3.3.1 „Enzyme-linked immunosorbent assay“

A β -Mengen SDS-gelöster Proben APP/PS1-transgener und APP/PS1-tg iNOS^(-/-) Tiere wurden mit Hilfe der humanen A β ₁₋₄₀- und A β ₁₋₄₂-„Enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISAs) Kits (The Genetics Company, Schlieren, Schweiz) quantifiziert [s. Abbildung 3-4: Absolute und relative A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂; a) - b) und d) - e)].

Die Mengen für A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂ der APP/PS1-tg iNOS^(-/-) Tiere wurden gegen die Mengen der APP/PS1-transgenen Mäuse normalisiert und gemeinsame Mittelwerte für A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂ (A β _{normalized}) errechnet [s. Abbildung 3-4: Absolute und relative A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂; a) - b) und d) - e)].

Die Werte der APP/PS1 iNOS^(-/-) Mäuse für sowohl A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂ wurden gegen die ermittelten Mengen der APP/PS1-tg Tiere (= 1) normalisiert und dadurch das gesamt-A β -Verhältnis zwischen den zwei Gruppen zu beiden Zeitpunkten ermittelt [s. Abbildung 3-4: Absolute und relative A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂; c) und f)].

ⁱ Freundlicherweise durchgeführt von Dr. Markus Kummer

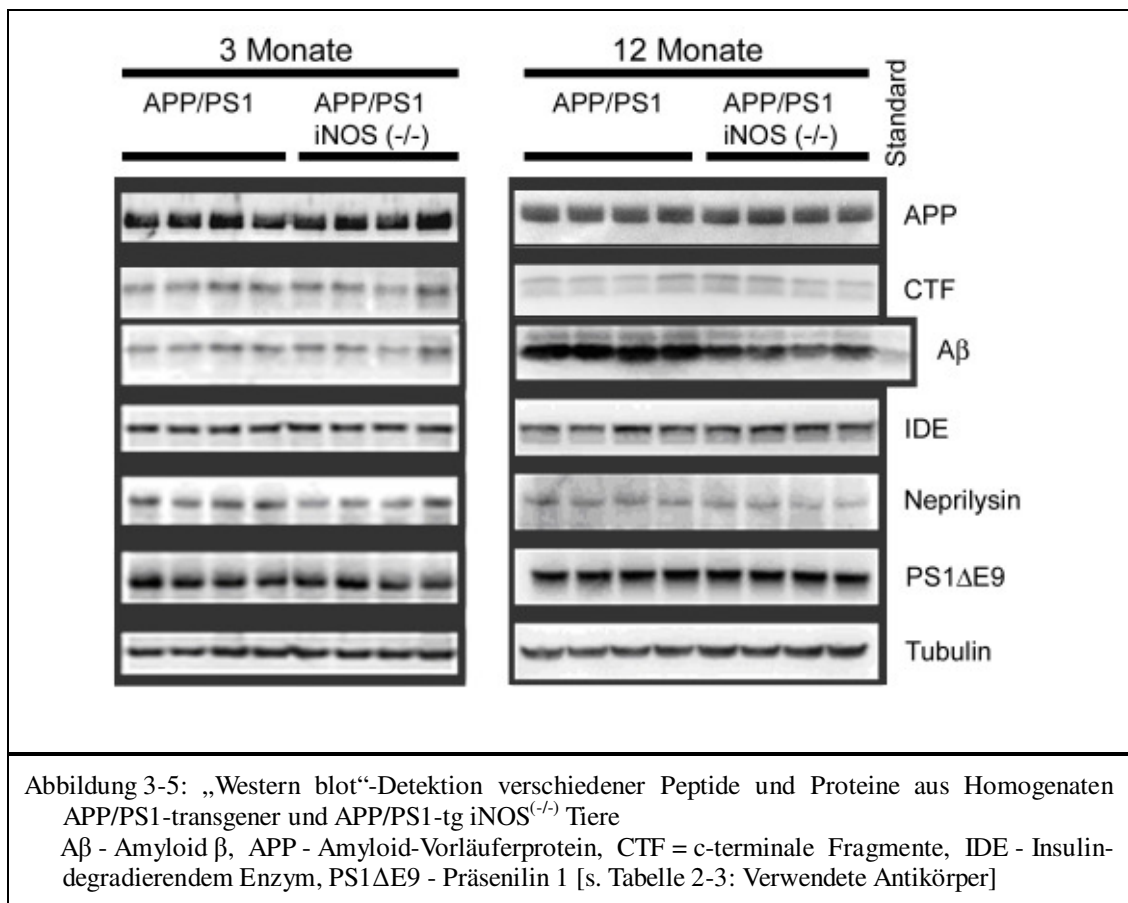


Während die A β -Level bei zwölf Monate alten APP/PS1-transgenen Tieren sowohl für die relativen Werte, als auch für absolute A β ₁₋₄₀- und A β ₁₋₄₂-Mengen signifikant höher waren als die korrespondierenden Werte der APP/PS1-tg iNOS^(-/-) Tiere, konnte zum Zeitpunkt von drei Monaten kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt werden.

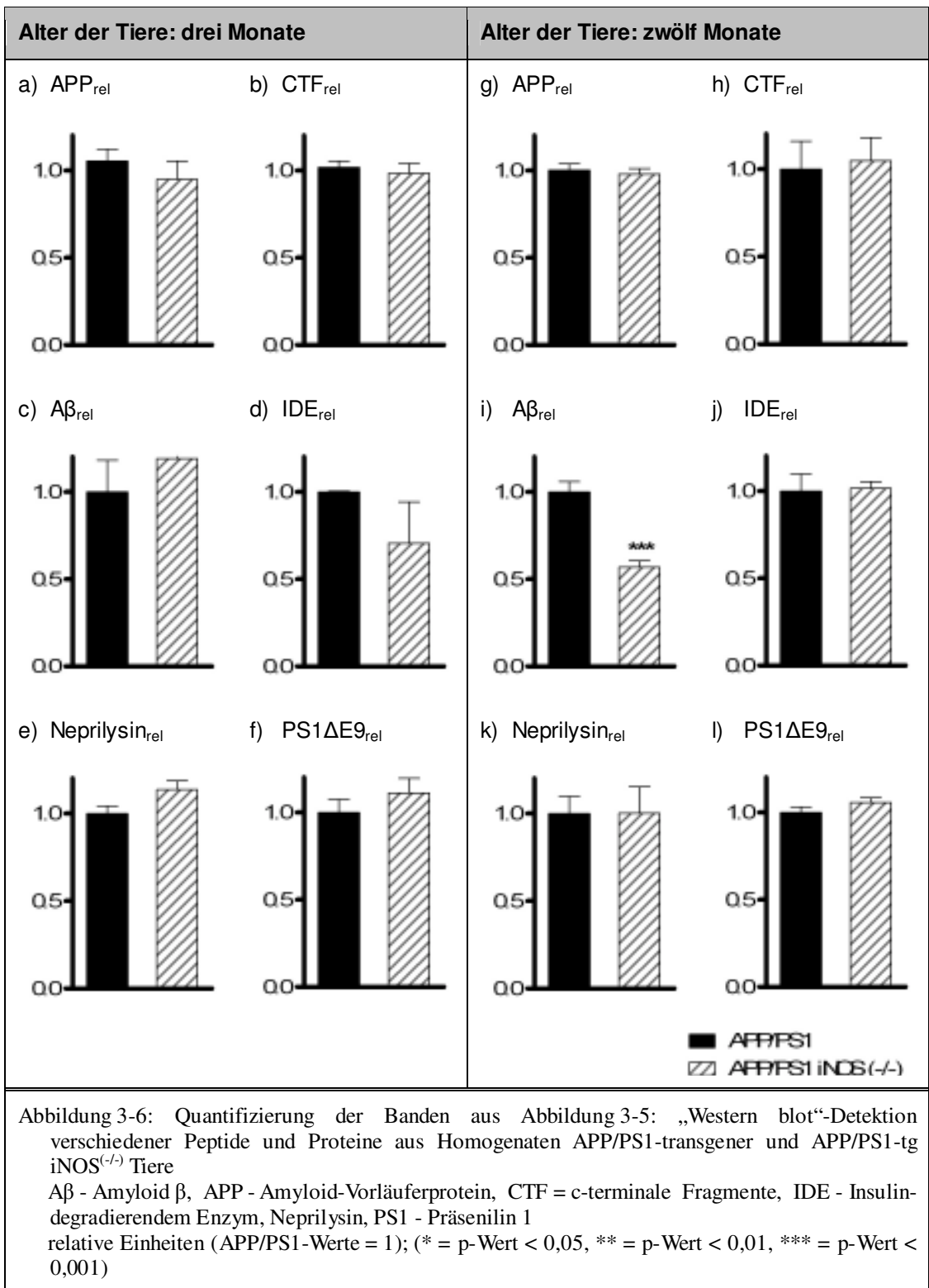
3.3.2 „Western blot“-Detektion

Amyloid β (A β), Amyloid-Vorläuferprotein (APP), c-terminale Fragmente (CTF), Insulin-degradierendes Enzym (IDE), Neprilysin, Präsenilin 1 (PS1) sowie Tubulin (zur Ladekontrolle) wurden mittels „Western blot“ in Gehirn-Homogenaten

drei und zwölf Monate alter APP/PS1-transgener und APP/PS1-tg iNOS^(-/-) Tiere detektiert [s. Abbildung 3-5: „Western blot“-Detektion verschiedener Peptide und Proteine aus Homogenaten APP/PS1-transgener und APP/PS1-tg iNOS^(-/-) Tiere].



Quantifizierungen der Chemilumineszenz der Banden sind für die untersuchten Tiergruppen in Abbildung 3-6 dargestellt. Lediglich die Aβ-Detektion der zwölf Monate alten, jedoch nicht der drei Monate alten Tiere zeigte hierbei eine signifikant geringere Menge in den iNOS^(-/-) APP/PS1-tg Tieren [Suppl. Tabelle 14: „Western blot“-Detektion von Aβ aus Homogenaten von APP/PS1-transgenen und APP/PS1-tg iNOS^(-/-) Tieren - „Paired two-tailed t-test“]. Die übrigen Proteine waren zu keinem der untersuchten Zeitpunkte in ihren Mengen signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen.



3.4 Histologische Charakterisierung

Gefrierschnitte zwölf Monate alter, APP/PS1-transgener sowie APP/PS1-tg iNOS^(-/-) Tiere wurden (immun-) histochemisch hinsichtlich möglicher Unterschiede in unlöslichen und löslichen A β -Leveln der mikroglialen Co-Lokalisation, dem Ausmaß der Astrogliose sowie des neuronalen Verlustes untersucht.

Hierzu wurden die Schnitte für die Auswertung der Thioflavin-S-, GFAP- sowie der NeuN-Färbung bei fünffacher Vergrößerung am Olympus BX61 dokumentiert und die Regionen von Interesse (ROI, „region of interest“; *Hippocampus* und *Cortex*) mit Hilfe der Analysesoftware cell^P (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster) analysiert.

3.4.1 A β -Level *in situ*

Im Folgenden sind exemplarisch Aufnahmen von *Hippocampi* und *Cortices* sowohl APP/PS1-transgener, als auch APP/PS1-tg iNOS^(-/-) Mäuse dargestellt [s. Abbildung 3-7: Thioflavin-S-gefärbte *Hippocampi* (Hc) und *Cortices* (Cx) zwölf Monate alter Tiere (APP/PS1 und APP/PS1 iNOS^(-/-)) *in situ*].

Exemplarische Aufnahmen der A β -Antikörperfärbung sind unterSowohl histochemische Färbungen spezifisch für lösliche und unlösliche Plaquekomponenten zeigten signifikant niedrigere Werte im *Cortex* sowie eine signifikante Reduktion thioflavinpositiver Plaques im *Hippocampus*.

A β / CD11b Co-Lokalisation *in situ* zu finden.

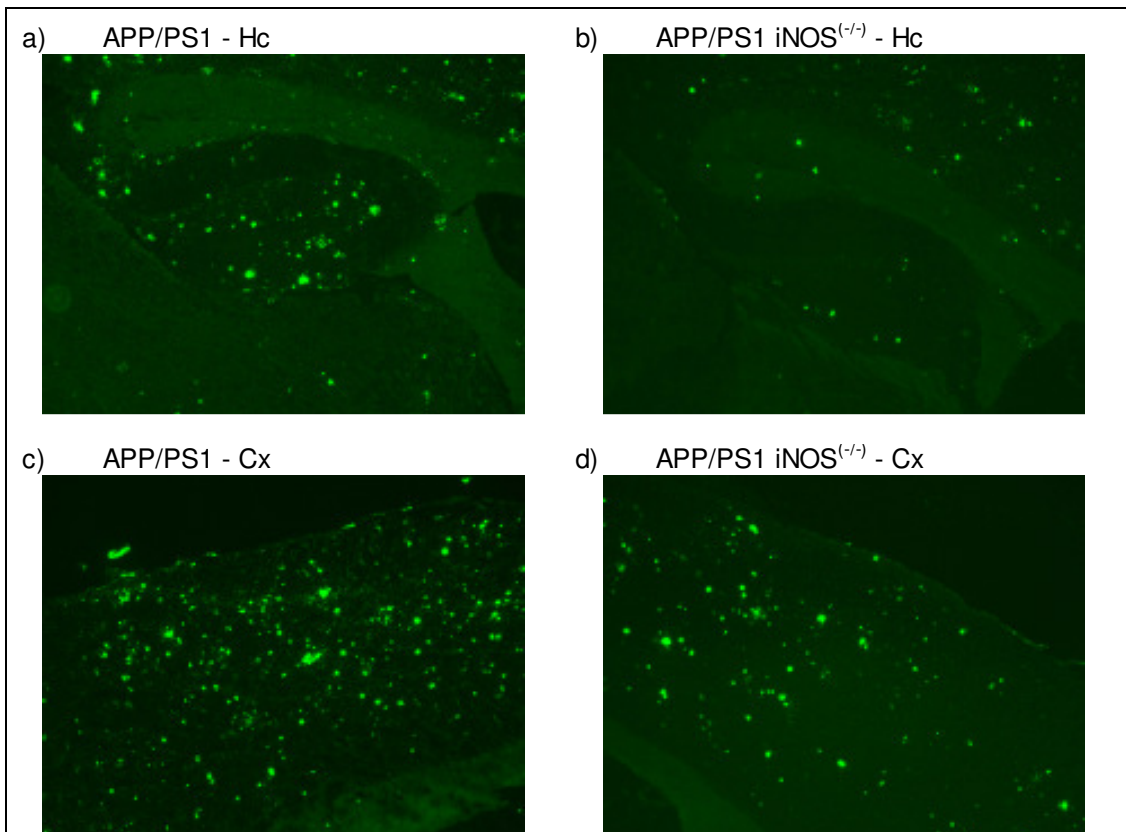


Abbildung 3-7: Thioflavin-S-gefärbte *Hippocampi* (Hc) und *Cortices* (Cx) zwölf Monate alter Tiere (APP/PS1 und APP/PS1 iNOS^(-/-)) *in situ*
 Siehe auch Suppl. Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Wahl der Regionen von Interesse (ROI, „region of interest“; rote Linie) an Thioflavin-S-gefärbten Schnitten zwölf Monate alter APP/PS1-transgener Tiere (a) Hippocampus (Hc), b) Cortex (Cx)

Die folgende Abbildung 3-8 zeigt die Anzahl Thioflavin-positiver Plaques sowie die Flächenanteile des Gesamt-A β in *Hippocampi* und *Cortices* der untersuchten Gruppen.

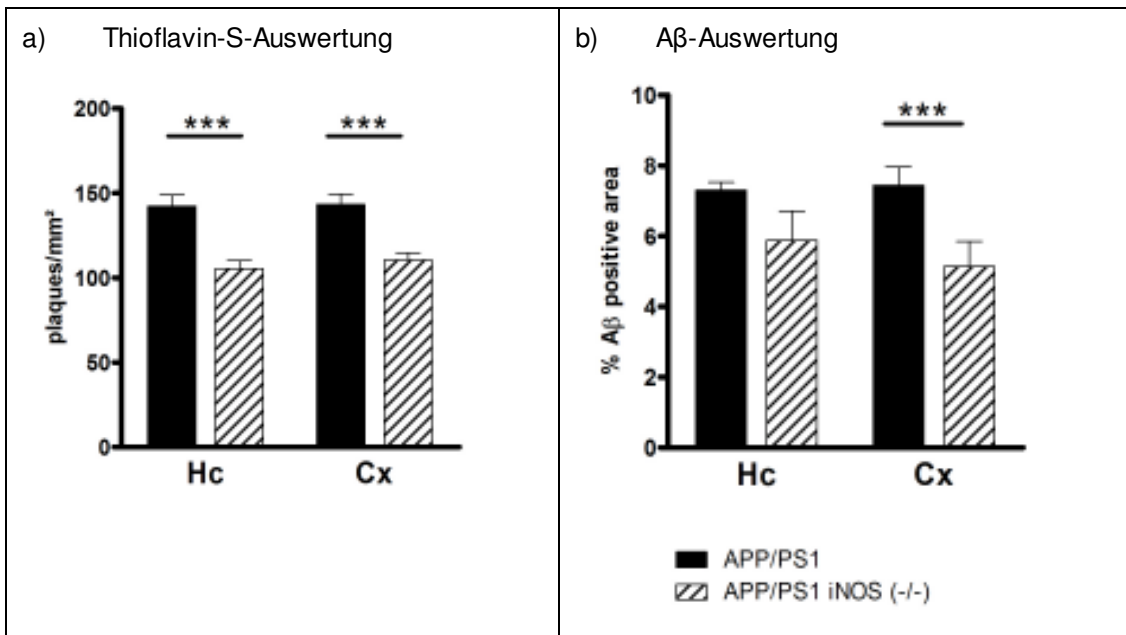


Abbildung 3-8: Unlösliche (a) Thioflavin-S) und lösliche (b) Aβ-Antikörper 2964) Aβ-Mengen zwölf Monate alter Tiere (APP/PS1 und APP/PS1 iNOS^(-/-)) *in situ*
Hc - *Hippocampus*; Cx - *Cortex*
[s. Suppl. Tabelle 15: (Immun)- histochemische Untersuchungen - „Student’s t-test“, MW und SEM der APP/PS1 und APP/PS1 iNOS^(-/-)] (* = p-Wert < 0,05, ** = p-Wert < 0,01, *** = p-Wert < 0,001)

Sowohl histochemische Färbungen spezifisch für lösliche und unlösliche Plaquekomponenten zeigten signifikant niedrigere Werte im *Cortex* sowie eine signifikante Reduktion thioflavinpositiver Plaques im *Hippocampus*.

3.4.2 Aβ / CD11b Co-Lokalisation *in situ*

Zur Bestimmung des Deckungsgrades der Aβ-Plaques wurden die Gefrierschnitte mit dem Aβ-Antikörper 2964 sowie eines polyklonalen anti-CD11b Antikörpers gefärbt.

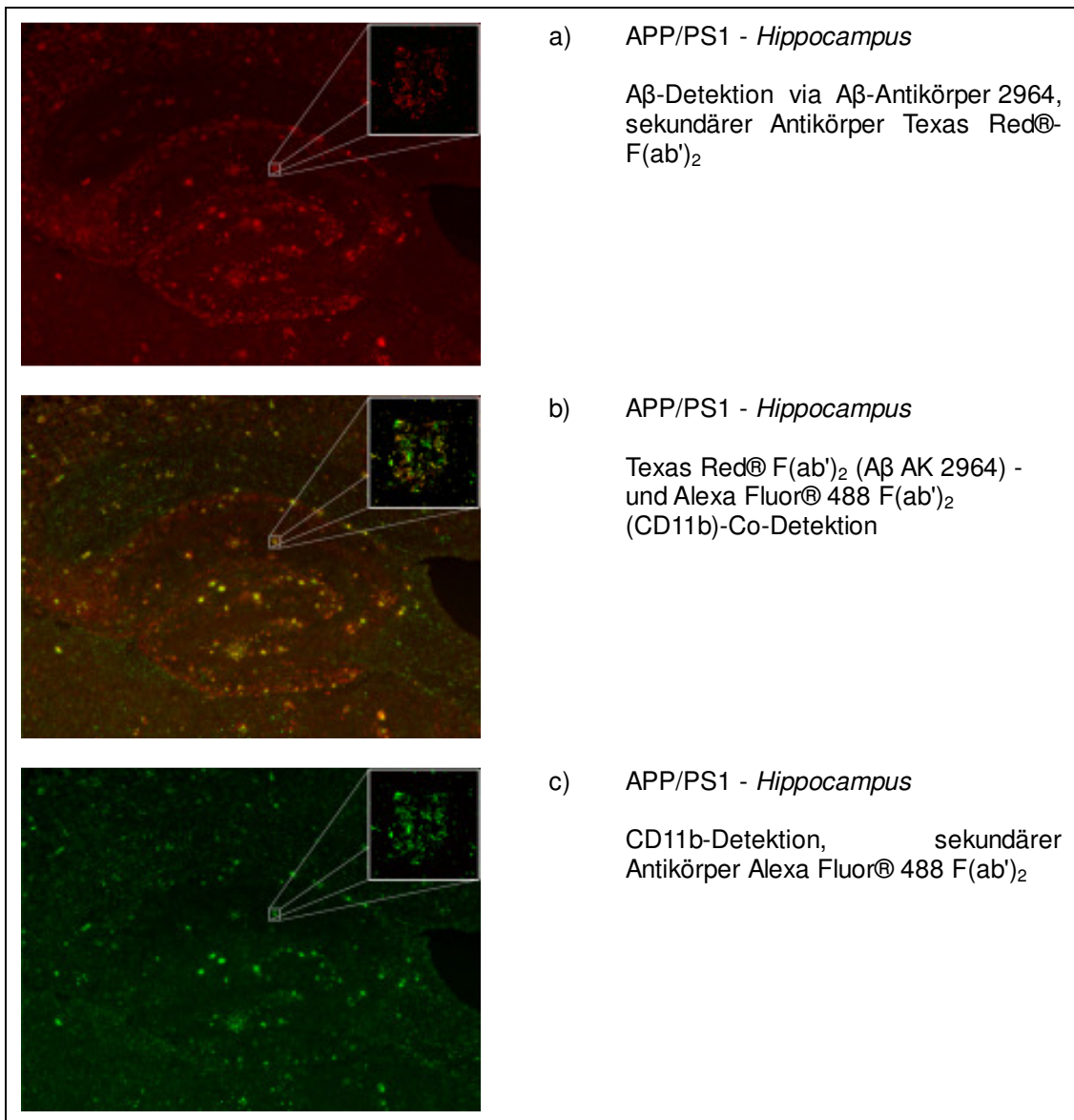
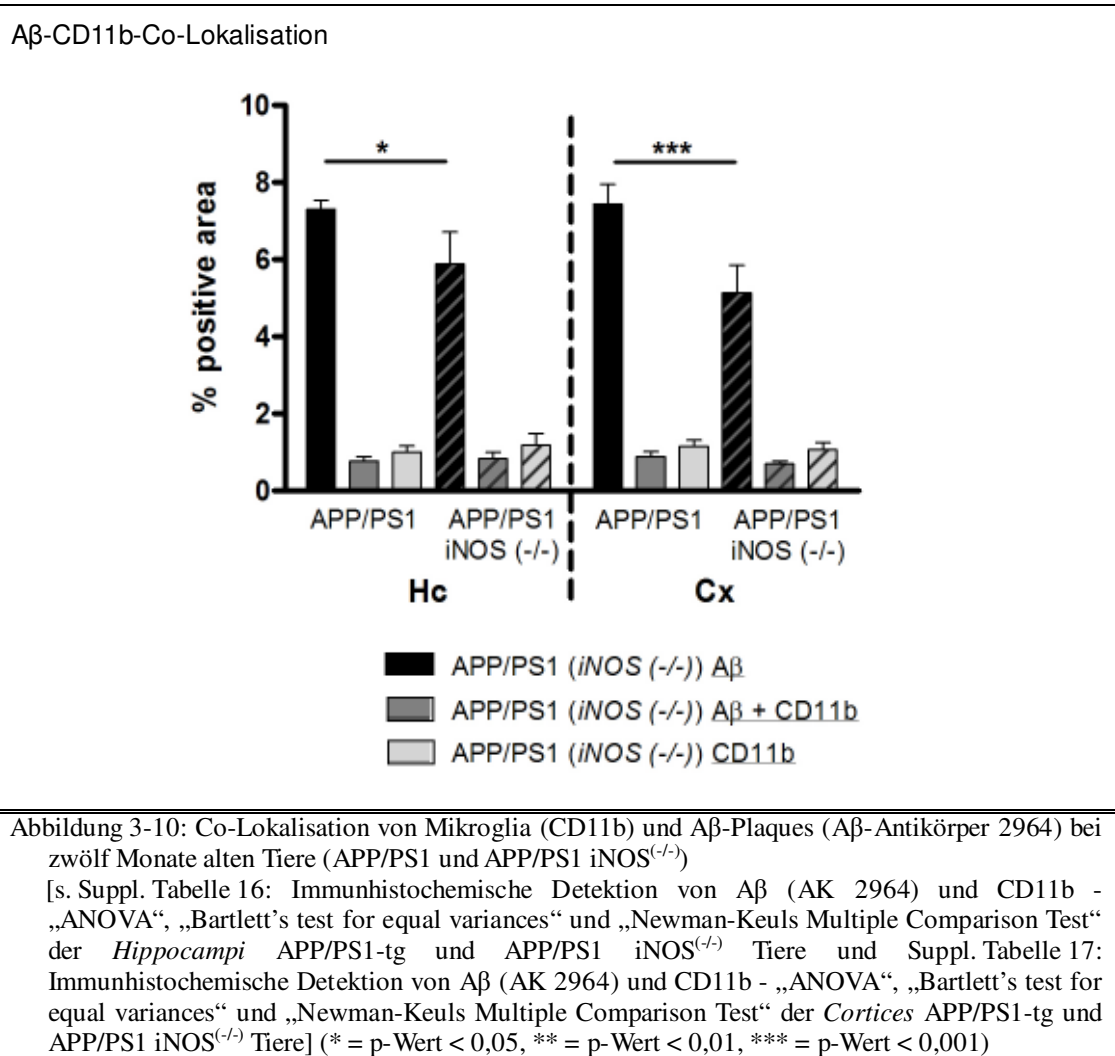


Abbildung 3-9: Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenzen von Aβ und CD11b eines zwölf Monate alten APP/PS1-transgenen Tieres *in situ*
 Siehe auch Suppl. Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Wahl der Regionen von Interesse (ROI, „region of interest“; rote Linie) an Thioflavin-S-gefärbten Schnitten zwölf Monate alter APP/PS1-transgener Tiere (a) Hippocampus (Hc), b) Cortex (Cx)

Die quantitative Auswertung der Aβ-CD11b-co-gefärbten Präparate erfolgte aus drei Bildern mit 20 × Vergrößerung (kleiner Bildausschnitt) je Tier und Hirnregion.

Die entsprechenden Werte für die untersuchten Gruppen zeigt die folgende Abbildung [s. Abbildung 3-10: Co-Lokalisation von Mikroglia (CD11b) und Aβ-Plaques (Aβ-Antikörper 2964) bei zwölf Monate alten Tiere (APP/PS1 und APP/PS1 iNOS^(-/-))].



3.4.3 Gliale und neuronale Immunreaktivität

Die folgende Abbildung zeigt die GFAP- und NeuN-positiven Flächenanteile in *Hippocampi* und *Cortices* der untersuchten Gruppen [s. Abbildung 3-11: Gliale [a) GFAP] und neuronale [b) NeuN] Immunreaktivität zwölf Monate alter Tiere (APP/PS1 und APP/PS1 *iNOS*^(-/-)) *in situ*].

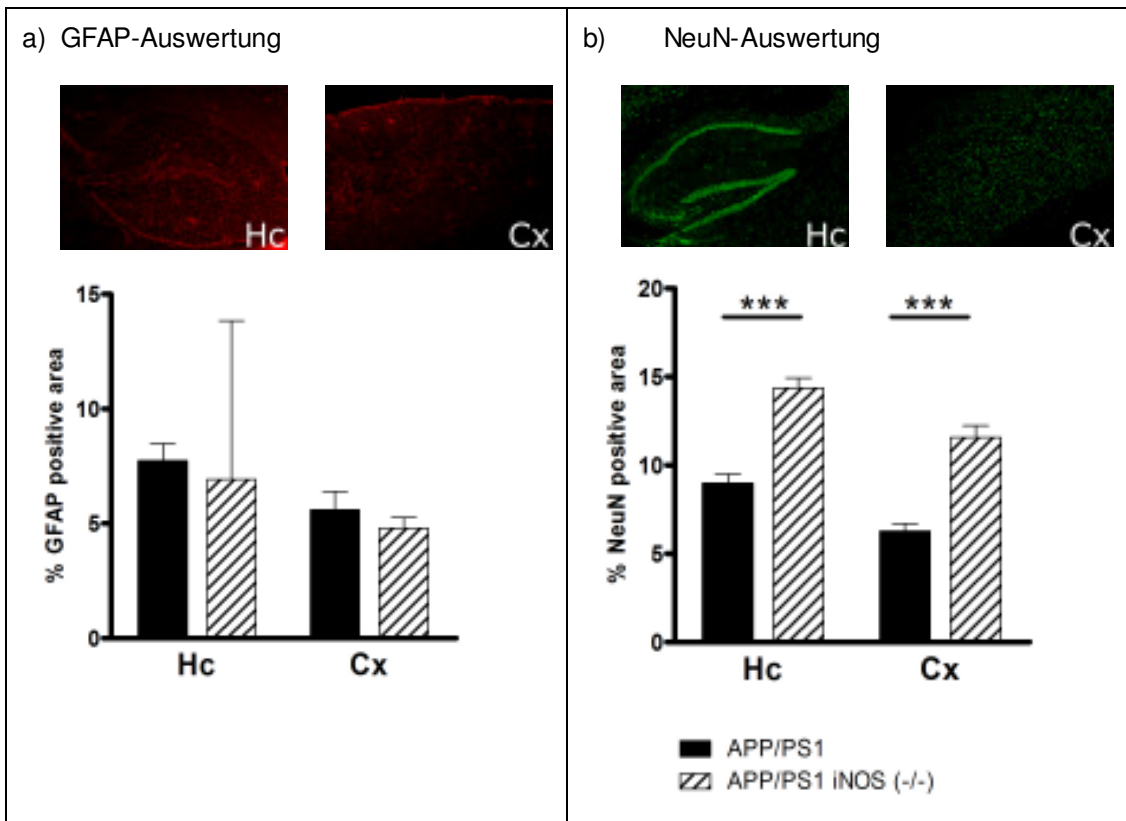


Abbildung 3-11: Gliale [a) GFAP] und neuronale [b) NeuN] Immunreaktivität zwölf Monate alter Tiere (APP/PS1 und APP/PS1 iNOS^(-/-)) *in situ*
 Hc - *Hippocampus*; Cx - *Cortex*
 [s. Suppl. Tabelle 15: (Immun)- histochemische Untersuchungen - „Student’s t-test“, MW und SEM der APP/PS1 und APP/PS1 iNOS^(-/-)] (* = p-Wert < 0,05, ** = p-Wert < 0,01, *** = p-Wert < 0,001)

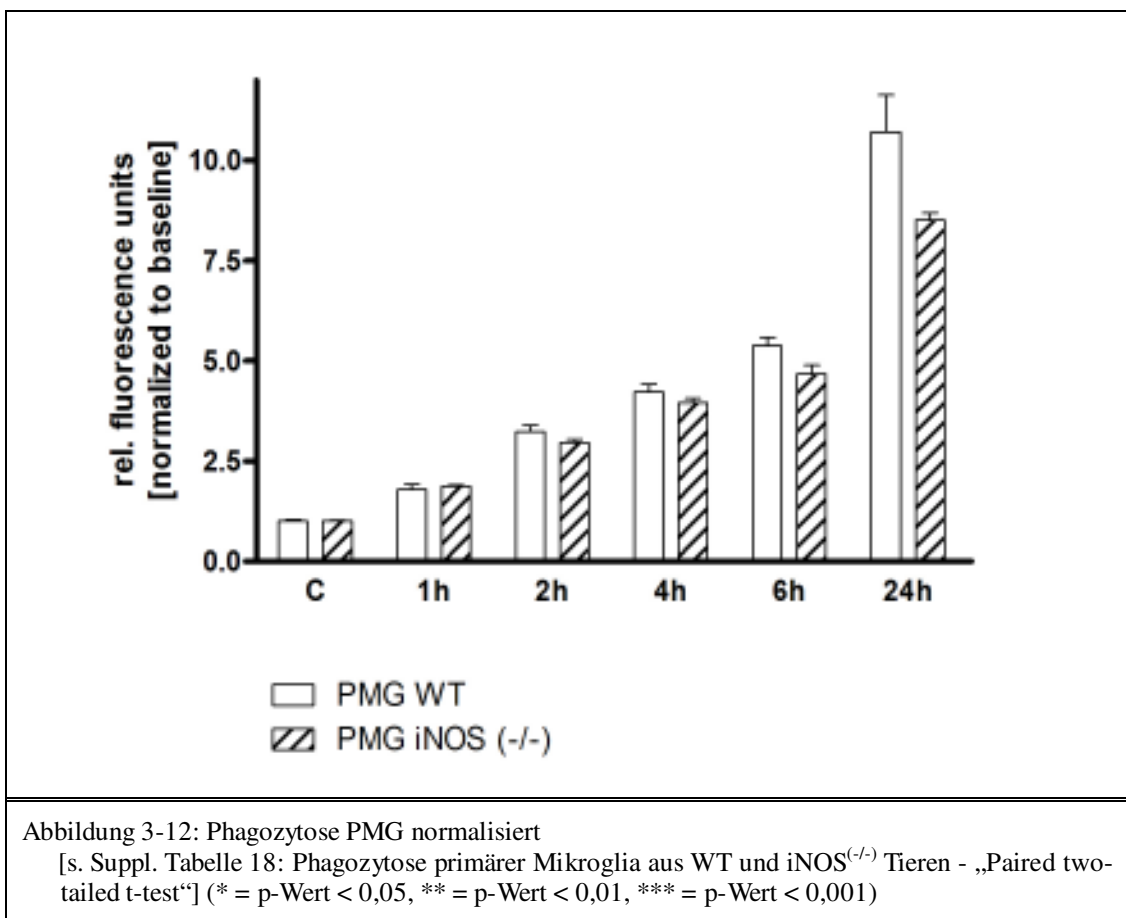
NeuN-positiven Flächenanteile waren in APP/PS1-transgenen Tieren signifikant reduziert, verglichen mit APP/PS1-tg iNOS^(-/-) Tieren, sowohl im *Hippocampus*, als auch im *Cortex*.

3.5 Degradation des A β

3.5.1 *In vitro* Phagozytose primärer Mikroglia

Zur Bestimmung potentieller Unterschiede in der phagozytotischen Aktivität iNOS-kompetenter (WT) und iNOS-defizienter primärer Mikroglia (PMG) wurden diese in schwarzen Zellkulturplatten ausgesät und mit Fluorescein-gekoppeltem A β inkubiert.

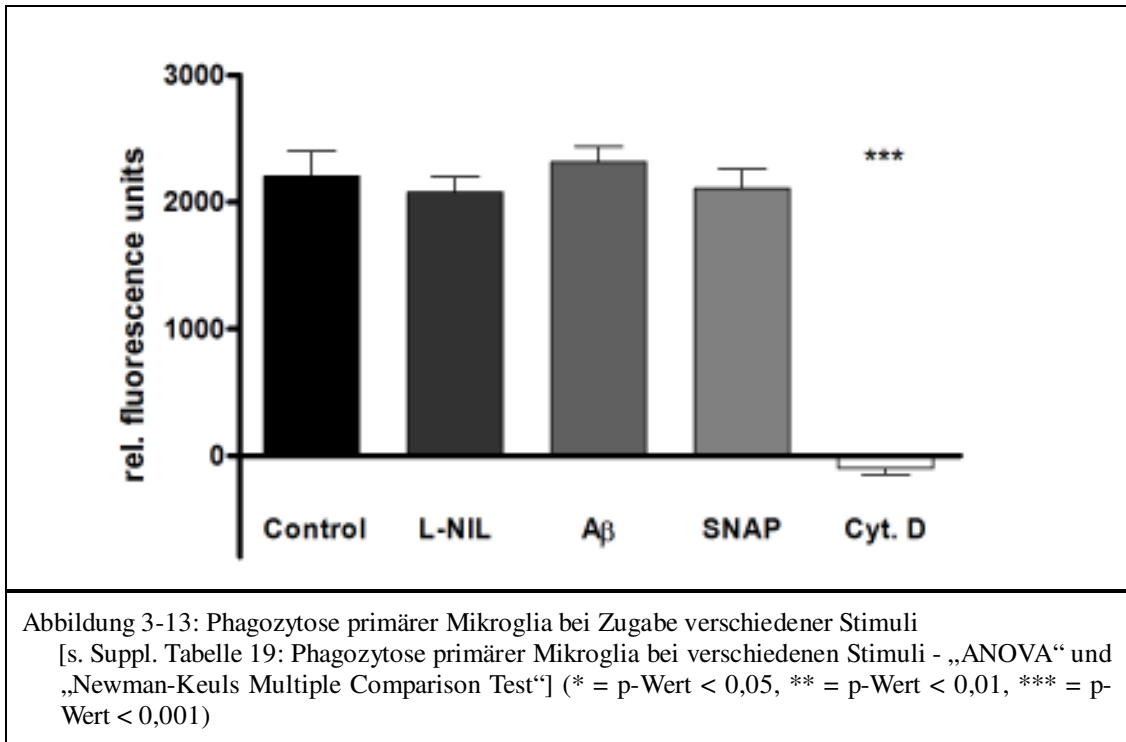
Die folgende Abbildung zeigt die relative Phagozytoseaktivität der primären Mikroglia der untersuchten Gruppen über 1 - 24 h [s. Abbildung 3-12: Phagozytose PMG normalisiert].



Eine Analyse der Wertepaare zeigte keinerlei Signifikanz bezüglich der festgestellten Unterschiede [s. Suppl. Tabelle 18: Phagozytose primärer Mikroglia aus WT und iNOS^(-/-) Tieren - „Paired two-tailed t-test“].

WT-PMG wurden zudem entweder 6 Stunden vor (A β) oder parallel zur FAM-gekoppelten A β ₁₋₄₂ Zugabe (L-NIL, SNAP, Cytochalasin D) stimuliert

[s. Abbildung 3-13: Phagozytose primärer Mikroglia bei Zugabe verschiedener Stimuli].



Mit Ausnahme von Cytochalasin D (Inhibitor der Aktinpolymerisation, Negativkontrolle) wurde die Phagozytose der PMG nicht beeinflusst..

3.5.2 Aktivität A β -degradierender Enzyme *in vitro*

Da weder NO-Donoren noch A β die Phagozytose der PMG und somit die A β -„Clearance“ signifikant beeinflussten, wurden die Aktivitäten der A β -degradierenden Enzyme Neprilysin sowie des Insulin-degradierenden Enzyms (IDE) wurden in Abwesenheit und in Anwesenheit ansteigender NO-Konzentrationen mit Hilfe enzymespezifischer, fluorogener Peptidsubstrate (Bachem Distribution Services, Weil am Rhein) im SpectraFluor Plus (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) 60 Minuten lang dokumentiert.

ⁱ 3.5.2 Freundlicherweise durchgeführt von Dr. Markus Kummer

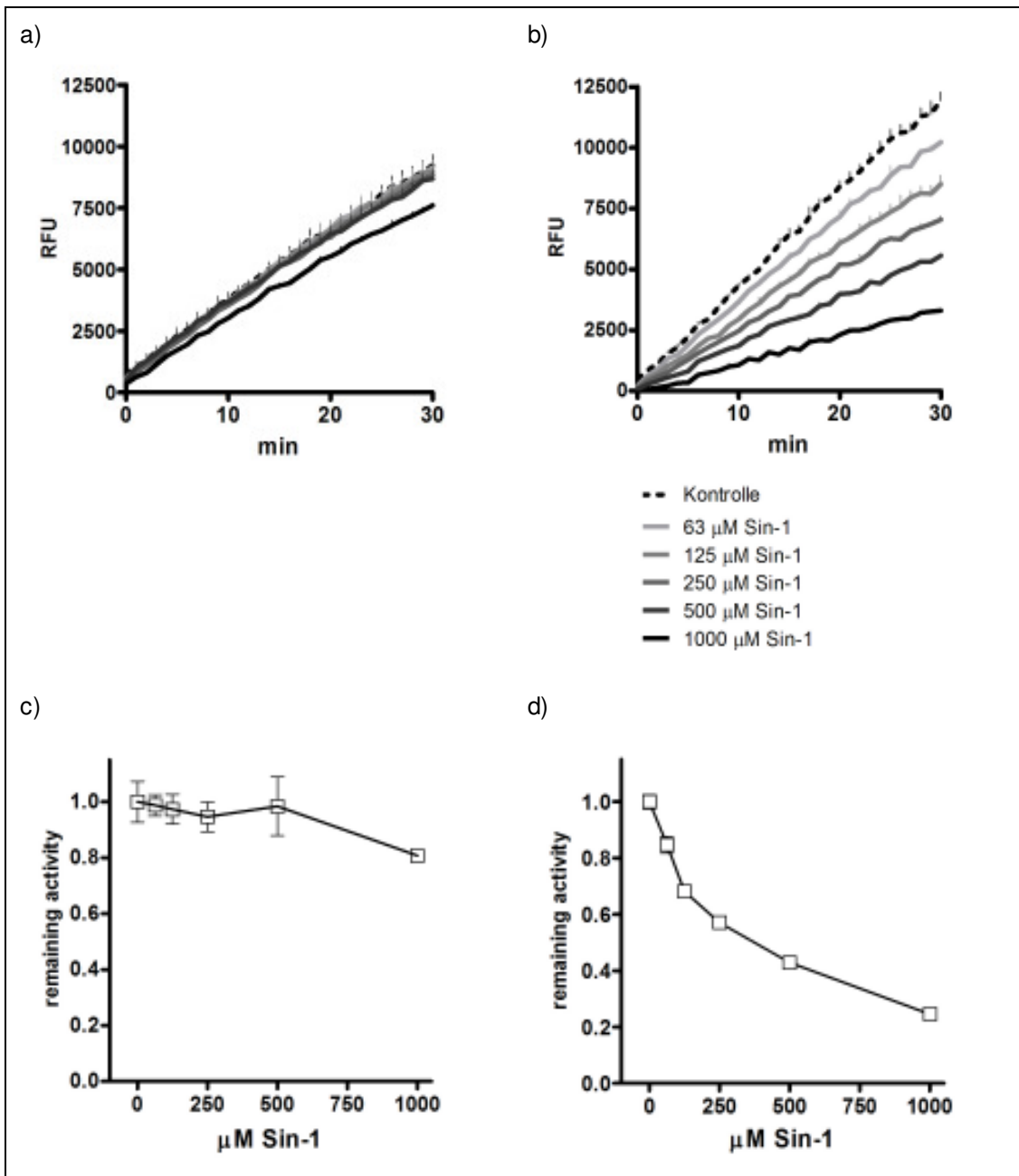


Abbildung 3-14: Enzymaktivität von Neprilysin und IDE unter NO

- a) Relative Fluoreszenz des degradierten, fluorogenen Substrat-Peptids für Neprilysin
- b) Relative Fluoreszenz des degradierten, fluorogenen Substrat-Peptids für IDE
- c) Relative Enzymaktivität von Neprilysin (normalisiert)
- d) Relative Enzymaktivität von IDE(normalisiert)

Während die Enzymaktivität von IDE mit zunehmender SIN-1-Konzentration konstant abnahm, zeigte sich, mit Ausnahme der höchsten SIN-1-Konzentration (1 mM), keinerlei Modifikation in der Enzymaktivität von Neprilysin.

3.6 Synaptosomale Modifikationen

3.6.1 Nitrierung und Nitrosylierung synaptosomaler Proteine

Nachdem „Western blot“-Untersuchungen der Nitrierungs- und Nitrosylierungs-Level verschiedener synaptosomaler Proteine [s. Suppl. Tabelle 20: Für Immunpräzipitationen synaptosomaler Proteine verwendete Antikörper] keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten, wurden Synaptosomen der untersuchten Gruppen geblottet und nitrosylierte Proteine mit Hilfe eines anti-SNO-Cystein Antikörper (Sigma Aldrich, München) detektiert [s. Abbildung 3-15: Separation nitrosylierter Proteine zur massenspektrometrischen Untersuchung a)].

Die Gelelektrophorese von 350 µg Protein / Probe wurde mit anti-Nitrotyrosin- sowie anti-SNO-Cystein-Antikörper-Immunpräzipitationen synaptosomaler Proteine wiederholt, die Gele Coomassie-gefärbt [s. Abbildung 3-15: Separation nitrosylierter Proteine zur massenspektrometrischen Untersuchung b)] und die Banden auf korrespondierender Höhe zur Maldi-TOF-Analyse ausgeschnitten.

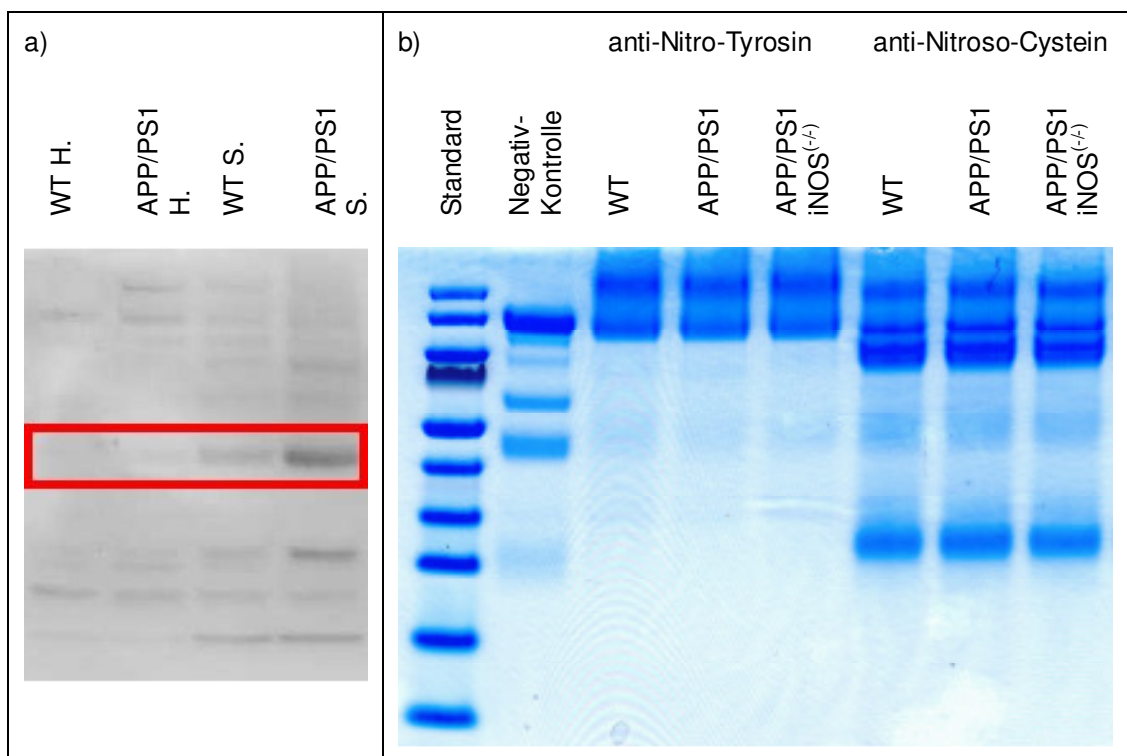
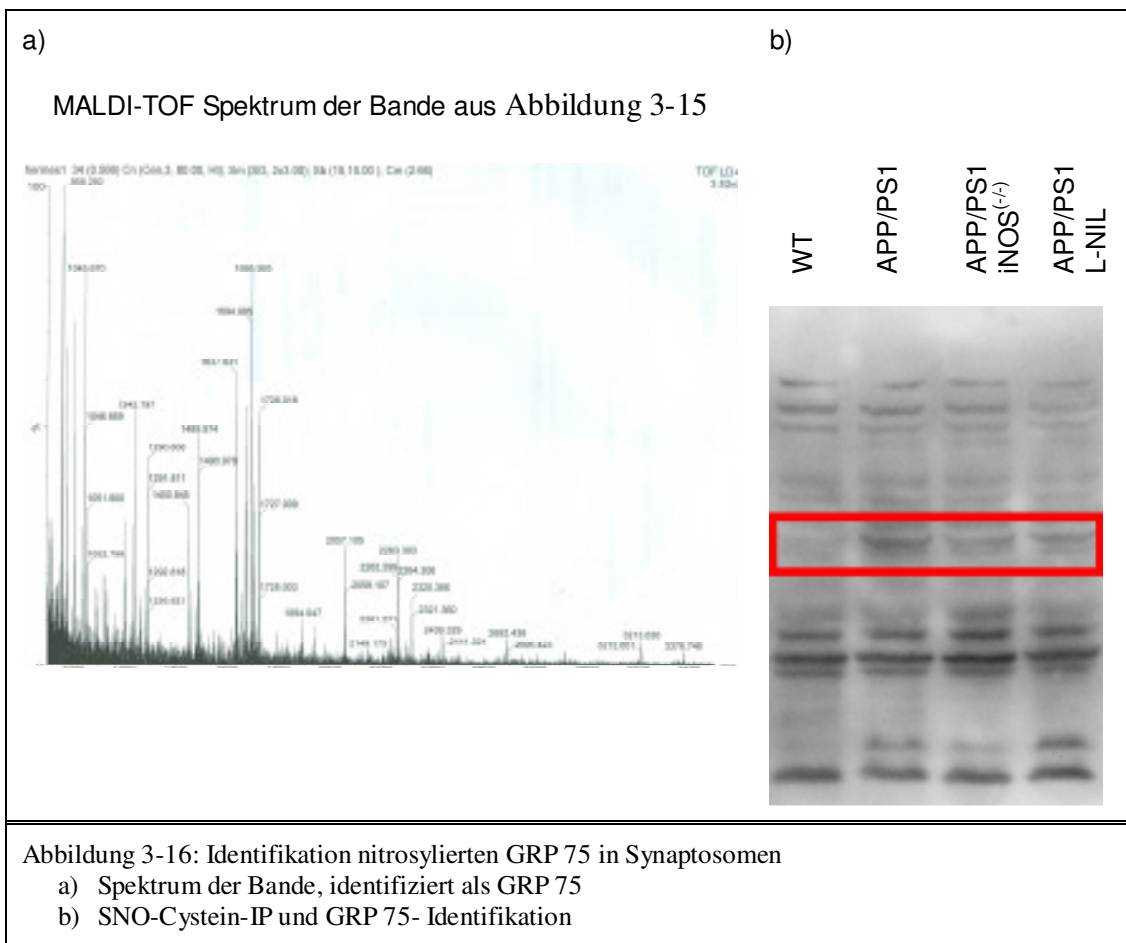


Abbildung 3-15: Separation nitrosylierter Proteine zur massenspektrometrischen Untersuchung
 a) „Western blot“ Detektion nitrosylierter, synaptosomaler Proteine (WT H. = Wildtyp Gehirnhomogenat, WT S. = Wildtyp Synaptosomen, APP/PS1 H. = APP/PS1-tg Gehirnhomogenat, APP/PS1 S. = APP/PS1-tg Synaptosomen)
 b) Coomassie-gefärbte Immunpräzipitationen mit anti-Nitrotyrosin- sowie anti-SNO-Cystein-Antikörper



Die Analyse der prominentesten, regulierten Bande bei ca. 70 kDa identifizierte als eines der enthaltenen Proteine das Glukose-reguliertes Protein 75 (GRP 75) [s. Abbildung 3-16: Identifikation nitrosylierten GRP 75 in Synaptosomen a)]. GRP 75 (auch: Mortalin, HSPA 9B) ist ein 75 kDa Protein und mitochondriales Mitglied der Hitze-Schock Protein (Hsp) 70-Familie (daher auch: mtHsp70)[Kaul *et al.*, 1995]. GRP 75 interagiert u.a. mit Hsp60 sowie Frataxin, einem mitochondrialen Protein der Eisen-Schwefel-Cluster und genetischer Faktor der Friedreich-Ataxie [Shan *et al.*, 2007; Wadhwa *et al.*, 2005].

Anti-SNO-Cystein-Immunpräzipitationen aus Gehirn-Homogenaten von WT, APP/PS1-tg, APP/PS1-tg iNOS^(-/-) sowie L-NIL-behandelte APP/PS1-tg Tieren, die mit dem detektiert wurden, zeigten u.a. auch erhöhte Mengen nitrosylierten Proteins auf Höhe der Bande von GRP 75 in APP/PS1-tg Tieren [s. Abbildung 3-16: Identifikation nitrosylierten GRP 75 in Synaptosomen b)].

3.6.2 Aktivität synaptosomaler Mitochondrien

Um den Einfluss der NO-abhängigen Nitrierung und Nitrosylierung mitochondrialer Proteine auf die Aktivität synaptosomaler Mitochondrien (3.6.1 Nitrierung und Nitrosylierung synaptosomaler Proteine) zu bestimmen, wurden in weiteren Experimenten ebendiese Mitochondrien von Wildtyp-Tieren isoliert und mit dem NO-Donor 3-Morpholino-Sydnomin (SIN-1) und dem Oxidant Peroxynitrit (ONOO) behandelt und ihr O₂-Verbrauch ermitteltⁱ [s. Abbildung 3-17: O₂-Verbrauch synaptosomaler Mitochondrien ohne Stimulation sowie nach Exposition gegenüber 10 µM SIN-1 oder 10 µM ONOO].

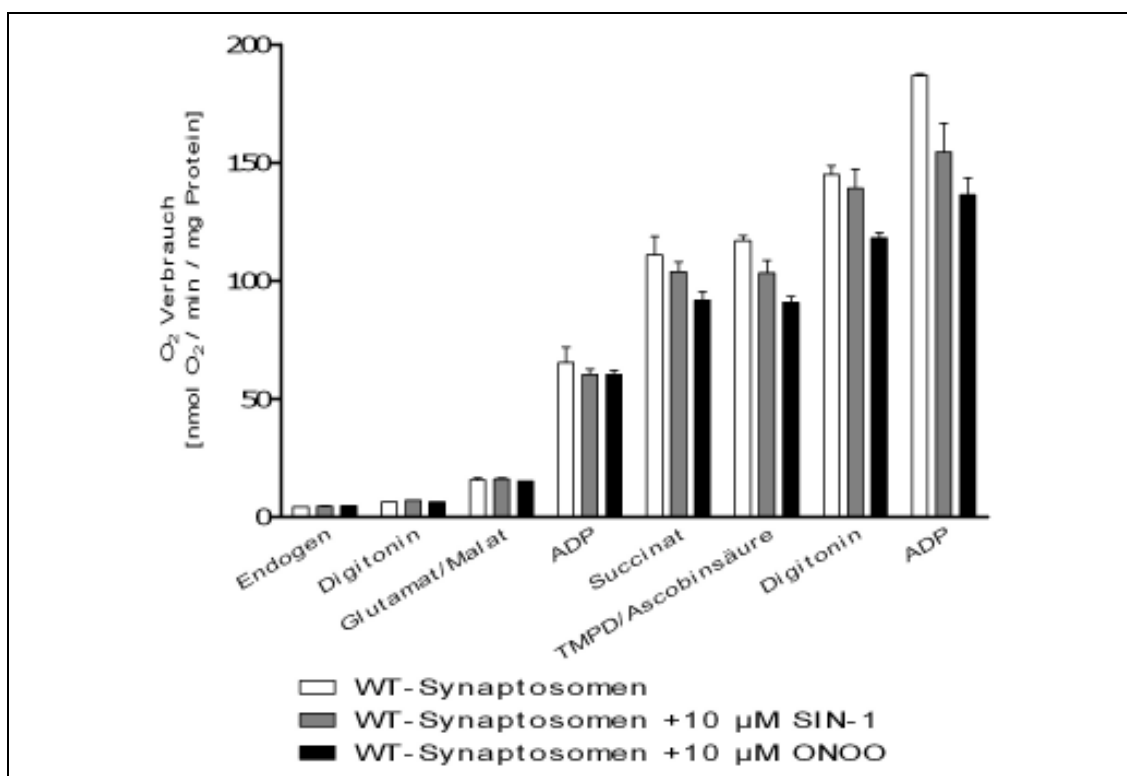


Abbildung 3-17: O₂-Verbrauch synaptosomaler Mitochondrien ohne Stimulation sowie nach Exposition gegenüber 10 µM SIN-1 oder 10 µM ONOO
Endogen = Endogener O₂-Verbrauch, danach sukzessive Zugabe von Digitonin (0,1 mg/ml), Glutamat / Malat (10 mM / 5 mM), ADP (2 mM), Succinat (10 mM), TMPD / Ascorbinsäure (50 mM / 100 mM), Digitonin (0,1 mg/ml), ADP (2 mM)

Deskriptiv lässt sich feststellen, dass die Behandlung der synaptosomalen Mitochondrien mit entweder SIN-1 oder ONOO zu einer Reduktion des O₂-Verbrauchs führte.

ⁱ Freundlicherweise durchgeführt von Dr. Alexey Kudin

4 Diskussion

4.1 NO-medierte, iNOS-abhängige Aspekte neurodegenerativer Erkrankungen

Stickstoffmonoxid (NO), unter inflammatorischen Bedingungen durch die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS, „inducible nitric oxide synthase“) u.a. im Gehirn produziert, besitzt auf Grund seines geringen Molekulargewichts und seiner hydrophoben Eigenschaften die Fähigkeit, über mehrere Zellen hinweg zu diffundieren (in einer Konzentration von bis zu 2,2 μM über 100 - 200 μm hinweg) [Malinski *et al.*, 1993; Meulemans, 1994; Schuman und Madison, 1991; Shaw und Vosper, 1977; zur Übersicht: Ledo *et al.*, 2004].

Miki *et al.*, 1977 berichteten bereits früh, dass NO zur Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC, „soluble guanylate cyclase“) und somit zur Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP, „cyclic guanosine monophosphate“) führt. Bredt und Snyder, 1989 sowie Garthwaite *et al.*, 1989 erbrachten den Nachweis erhöhter NO- und cGMP-Mengen, woraufhin Moncada *et al.*, 1991 den L-Arginin-NO-„pathway“, dessen Regulation sowohl NO-abhängig als auch -unabhängig erfolgen kann [Baltrons *et al.*, 2003; Sardon *et al.*, 2004], formulierten. Gibb und Garthwaite, 2001 zeigten, dass die sGC, häufig auch synonym als NO-Rezeptor bezeichnet, in Rattengehirnen exprimiert wird. Unter anderem auf Grund der Einflüsse des Arginin-NO-„pathways“ auf die sukzessive Aktivierung des N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA)-Rezeptors schlugen Thatcher *et al.*, 2006 die Behandlung von Alzheimer-Patienten mit sGC-Stimulatoren vor. Sowohl NO-abhängige als auch NO-unabhängige sGC-Aktivatoren und -Stimulatoren stellen durch ihre vasodilatatorischen, antihypertensiven sowie antiinflammatorischen Effekte einen wichtigen Therapieansatz in einer Vielzahl von Indikationen wie pulmonaler Hypertonie, Herzinsuffizienz, Artherosklerose, Re-Stenose, Thrombose, Entzündung, erektiler Dysfunktion, Leberzirrhose, Nierenfibrose und Nierenversagen dar [zur Übersicht: Evgenov *et al.*, 2006].

Die Konzentration des NO und seiner Derivate unter pathophysiologischen Bedingungen wie der Alzheimer-Erkrankung (AD, „Alzheimer’s disease“) ist so hoch, dass sie ursächlich in Zusammenhang mit neurotoxischen Effekten der AD gebracht werden konnte [Akama *et al.*, 1998]. Diese hohen NO-Mengen sind unter

anderem auch mitverantwortlich für AD-charakteristische Proteinnitrierungen [Butterfield *et al.*, 2007; Nathan *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1997; Tohgi *et al.*, 1999].

Darüber hinaus könnten NO-induzierte Modifikationen synaptosomaler Proteine für die im Alter von zwölf Monaten festgestellten neurodegenerativen Pathologien ursächlich sein [Chung, 2006]: Die S-Nitrosylierung von Cys³⁹⁹ der NR2A-Untereinheit des NMDA-Rezeptors führt zur Reduzierung dessen Aktivität [Choi *et al.*, 2000; Lipton *et al.*, 2002]. Durch Blockierung des NMDA-Rezeptors u.a. durch Memantin inhibiert die NMDA-abhängige, intrazelluläre Aktivierung der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS, „neuronal nitric oxide synthase“) und macht die pharmakologische Modulation der NMDA-Rezeptor-Aktivität zu einem vielversprechenden therapeutischen Ziel [Lipton, 2007].

Darüber hinaus führt die S-Nitrosylierung des Dynamamin-ähnlichen Proteins 1 (Drp1, „dynamamin-related protein“) zu Störungen der mitochondrialen Teilung [Reddy *et al.*, 2010] und sekundär zu neuronalem Zelltod [Cho *et al.*, 2009; zur Übersicht: Nakamura und Lipton, 2010].

Die Modifikationen der mitochondrialen Aktivität haben zudem einen starken Einfluss auf die synaptische Plastizität [Beal, 2000; Bender *et al.*, 2006; Cassarino und Bennett, 1999; Di Stasi *et al.*, 1999; Fiala *et al.*, 2007; Lipton *et al.*, 1993; Querfurth und LaFerla, 2010; Riederer *et al.*, 2009; Sunico *et al.*, 2005; Tatton und Olanow, 1999; Uehara *et al.*, 2006]. Unterstützt werden diese Effekte u.a. auch durch A β -induzierte Reduzierung mitochondrialer Aktivität [Mungarro-Menachaca *et al.*, 2002; Reddy und Beal, 2008]. Wie Ahern *et al.*, 2002 zeigten, scheint NO und sein direkter Einfluss auf synaptosomale Ionenkanäle via S-Nitrosylierung eine fundamentale regulative Rolle bei der Konsolidierung der synaptischen Plastizität zuzukommen.

4.2 iNOS-Inhibitoren - Wirksamkeit und Sicherheit als humanmedizinische Arzneimittel

L-N⁶-(1-iminoethyl)-Lysin (L-NIL), ein L-Arginin-Derivat und kompetitives Substrat für Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS, „nitric oxide synthase“) [zur Übersicht: Marletta, 1993], ist ein selektiver Inhibitor der iNOS [Moore *et al.*, 1994]. Die selektive Wirksamkeit von L-NIL gegenüber humaner iNOS war im

Vergleich zur Inhibition von nNOS und der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) um das 13- resp. 30-fache höher [Moore *et al.*, 1996]. Die L-NIL-Vorstufe L-N⁶-(1-iminoethyl)-Lysin 5-Tetrazolamid (SC51) wurde bereits als inhalatives Arzneimittel an gesunden Probanden sowie Asthmapatienten getestet [Hansel *et al.*, 2003].

Derzeit sind zudem weitere iNOS-Inhibitoren wie Aminoguanidin [Corbett und McDaniel, 1996] oder synthetische Komponenten wie GW274150 [Alderton *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2000] und SD-6010 [Berenbaum, 2010] in klinischen Prüfungen der Phasen I-III. Die Indikationen sind hier u.a. *Asthma bronchiale* (Aminoguanidin und GW174150 [„clinicaltrials.gov identifiziert“ NCT00159380, NCT00273013]), chronisch obstruktive Lungenerkrankung (Aminoguanidin [NCT00180635]), Endotoxämie [Aminoguanidin; NCT00184990], Migräne [GW174150; NCT00242866, NCT00319137], Osteoarthritis [SD-6010; NCT00565812] sowie rheumatoider Arthritis (GW174150 [NCT00370435, NCT00379990]). Für GW274150 konnten u.a. in einem murinen Oxidopamine (6-OHDA)-Modell der Parkinson Erkrankung (PD, „Parkinson’s disease“) neuroprotektive Effekte nachgewiesen werden [Broom *et al.*,].

4.3 Reduzierung kognitiver Defizite

Zur Bestimmung kognitiver, räumlicher Fähigkeiten , insbesondere im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen, werden vornehmlich zwei Systeme im murinen Modell eingesetzt: Zum einen das Morris-Wasserlabyrinth (MWM, „Morris watermaze“ [Morris, 1984]), zum anderen das radiale 8-Arm-Labyrinth [Olton, 1987]. Beide Methoden bieten Beispiele räumlicher Aufgaben, die sich jedoch hinsichtlich verschiedener Aspekte wie zwanghafte Suche, die Anforderung präziser Lokalisierung und nicht zuletzt hinsichtlich der Motivation der Tiere unterscheiden [Hodges, 1996]. Während das Morris-Wasserlabyrinth an schnelle allozentrische Lernprozesse adaptiert ist , ermittelt das radiale 8-Arm-Labyrinth eher stabile asymptotische Arbeits- und Referenzgedächtnisfehler [ebd.]. Unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der kurzfristigen Lernerfolgs (bei simultaner Verwendung beider Methoden in verschiedenen Krankheitsmodellen [Bindu *et al.*, 2005; Enomoto *et al.*, 2008; Puolivali *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 1989] unterstreichen,

dass angeblich ähnliche Aufgaben durchaus unterschiedliche Prozesse betrachten können [Hodges, 1996].

Im Rahmen dieser Studie wurde zur Ermittlung sowohl der Arbeits- als auch der Referenzgedächtnisleistungen daher das radiale 8-Arm-Labyrinth [modifiziert nach Heneka, 2006] als Methode gewählt. Bisherige Daten zeigen kognitive Defizite Amyloid-Vorläuferprotein (APP, „amyloid precursor protein“)/Präsenilin 1(PS1)-transgener (APP/PS1tg) Mäuse frühestens ab einem Alter von fünf bis sieben Monaten [Arendash *et al.*, 2001; Gordon *et al.*, 2001; Heneka *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2002; Puolivali *et al.*, 2002]. Puolivali *et al.* untersuchten zwar ebenfalls eine Gruppe in einem Alter von drei bis vier Monaten mittels Morris-Wasserlabyrinths, die APP/PS1-tg Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt jedoch keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren hinsichtlich der beiden Zielparameter.

Die hier ermittelten Gedächtnisleistungen zeigen hingegen bereits Defizite APP/PS1-transgener Tiere im Alter von drei Monaten. Diese manifestierten sich nicht nur in einer signifikant höheren Fehlerrate des räumlichen Arbeitsgedächtnisses, sondern auch in einer erhöhten Referenzgedächtnis-Fehlerrate. APP/PS1-tg iNOS-defiziente (iNOS^(-/-)) Tiere hingegen zeigten zu diesem Zeitpunkt signifikante Verbesserungen der kognitiven Leitungen. Dieser Effekt wurde bereits durch orale Gabe von 8 mg/l L-NIL [Hampl *et al.*, 2006; Law *et al.*, 2001] vom zweiten Lebensmonat an erreicht. Wenn auch in etwas geringerem Ausmaß, so zeigen sich bei diesen Tieren ebenfalls signifikante Verbesserungen des Referenzgedächtnisses.

Im Alter von zwölf Monaten konnten die bereits beschriebenen Defizite der kognitiven Leistungen APP/PS1-tg Tiere bestätigt werden. Eine sechsmonatige Behandlung der Tiere mit L-NIL (8 mg/l) respektive eine genetische Depletion der iNOS führten zu diesem Zeitpunkt zur vollständigen Revertierung der Fehlerrate sowohl der Arbeitsgedächtnis-, als auch der Referenzgedächtnisfehlerrate. Während die reine Transgenität für PS1 allein nicht zu Defiziten hippocampaler Leistungen führt [Holcomb *et al.*, 1999], führen Janus und Westaway, 2001 die erhöhte Fehlerrate in doppeltransgenen APP/PS1-tg Tieren auf deren allgemein erhöhte Aktivität zurück, welche zu einer höheren Eintrittszahl führt. Dass Holcomb *et al.*, 1999 auch in doppeltransgenen APP/PS1-Tieren lediglich qualitative, jedoch statistisch nicht signifikante Unterschiede der Fehlerzahl im Morris-Wasserlabyrinth zwischen den untersuchten einzel-, doppel- und nicht-transgenen Gruppen

beobachteten, führen Higgins und Jacobsen, 2003 auf das Alter (i.e. drei, sechs und neun Monate) der untersuchten Tiere zurück.

4.4 Protektion der Langzeitpotenzierung

Nalbantoglu *et al.*, 1997 erbrachten erstmals den Nachweis reduzierter Langzeitpotenzierung (LTP, „long term potentiation“), einhergehend mit kognitiven Defiziten im MWM in Tieren, welche transgen für den humanen C-Terminus des APP waren.

Nachdem erstmals von Moechars *et al.*, 1999 die Überexpression von APP als ursächlich für die elektrophysiologischen Defizite der Alzheimer-Erkrankung identifiziert wurde, konnten in der Folgezeit Amyloid β (A β)-Oligomere, nicht jedoch Monomere, als Inhibitoren der LTP identifiziert werden [Walsh *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2005; zur Übersicht: Selkoe, 2008; Xia, 2010].

LTP-Messungen der drei Monate alten Tiere zeigten, dass sowohl die LTP der APP/PS1-tg Tiere nach zehn Minuten sowie 60 Minuten nach Stimulation im Vergleich zu nicht-transgenen Wurfgeschwistern signifikant reduziert war, aber auch, dass diese Defizite durch genetische und pharmakologische Inhibition der iNOS größtenteils revertiert werden konnten. Diese Ergebnisse stützen die bisherigen Hypothesen, dass von iNOS hergeleitetes NO, ebenso wie verschiedene Zytokine [Murray und Lynch, 1998; Tancredi *et al.*, 1992], maßgeblich an den frühen elektrophysiologischen Defiziten beteiligt ist [D'Ambrosio *et al.*, 1998; Hawkins, 1996; Hawkins *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 2001]. Zudem bestätigen sie die Ergebnisse von Wang *et al.*, 2004, dass A β -abhängige Inhibition der NMDA-vermittelten LTP durch genetische und/oder pharmakologische Depletion (Aminoguanidin sowie synthetischer iNOS-Inhibitor 1400W [Garvey *et al.*, 1997]) von iNOS-generiertem NO verhindert werden kann.

4.5 NO-bedingte synaptosomale Modifikationen

Analysen synaptosomaler Proteinfractionen dieser Tiere zeigten eine allgemein erhöhte NO-induzierte Modifikationsrate in APP/PS1-tg Tieren, sowohl verglichen mit nicht-transgenen Wurfgeschwistern, als auch im Vergleich zu genetisch oder

pharmakologisch iNOS-defizienten, APP/PS1-tg Tieren. Die massenspektrometrischen Untersuchungen der isolierten Proteinbande bei ca. 70 kDa identifizierten das Glukose-regulierte Protein (GRP) 75 (= Mortalin), ein mitochondriales Mitglied der Hitze-Schock-Protein (HSP) 70-Familie als eines der enthaltenen Proteine. Erhöhte Mengen nitrierten GRPs 75 konnten bereits in der zerebrospinalen Flüssigkeit und neurofibrillären „Tangles“ (NFT) von Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden [Smith *et al.*, 1997; Tohgi *et al.*, 1999]. Die Identifizierung dieses synaptosomal-mitochondrialen Zielproteins im Rahmen dieser Studie bietet jedoch darüber hinaus eine vielversprechende Arbeitshypothese, warum die Elektrophysiologie der APP/PS1-tg Tiere bereits zu einem Zeitpunkt beeinträchtigt ist, zu dem keine signifikanten Unterschiede, weder in der A β -Menge, noch in der Expression der A β -degradierenden Enzyme Neprilysin und dem Insulin-degradierenden Enzym (IDE), nachzuweisen war [Benzing *et al.*, 1999]. Auch mittels „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) konnten keine signifikanten Unterschiede, weder für A β ₁₋₄₀, noch für A β ₁₋₄₂, gezeigt werden.

Hingegen zeigten synaptosomale Mitochondrien aus vier Monate alten Wildtyp (WT)-Tieren in einem explorativen Ansatz eine Reduzierung des O₂-Verbrauchs sowohl durch 3-Morpholino-Sydnonimin (SIN-1), einen NO-Donor, als auch durch Peroxynitrit (ONOO).

4.6 A β -Reduktion und Prävention amyloider Ablagerungen

Zwar konnten bereits intrazelluläre Akkumulationen von A β -Peptiden bei APP- und PS1-transgenen Tiere für vor-Plaques-Zeitpunkte gezeigt werden [Wirh's, 2001], allerdings konnten die frühesten kognitiven Defizite bisher erst im Alter von etwa sechs Monaten nachgewiesen werden [Arendash *et al.*, 2001; Moran *et al.*, 1995]. Abhängig von der Art des verwendeten Tiermodells (doppel-transgen für APP/PS1 oder ineinander gekreuzte Einzeltransgene für APP und PS1) konnten diese Defizite zu diesem frühen Zeitpunkt entweder nur in geringerem Ausmaß und daher nicht signifikant, oder aber gar nicht nachgewiesen werden. Demgegenüber waren die kognitiven Leistungen zu Zeitpunkten von wenigstens zwölf Monaten in diesen Modellen verglichen mit nicht-transgenen Wurfgeschwistern in jedem der

verwendeten Modelle signifikant reduziert [Gordon *et al.*, 2001; Puolivali *et al.*, 2002].

Während die Inhibition der iNOS im Alter von drei Monaten keine signifikanten Änderungen der A β -Mengen zeigte, konnten konfirmatorisch sowohl mittels „Western blot“, als auch mittels ELISA eine signifikante Reduzierung der A β -Menge (sowohl der Gesamtmenge, als auch der jeweiligen Menge A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂) im Alter von zwölf Monaten nachgewiesen werden. Zudem zeigten sowohl klassisch-histochemische (Thioflavin-S) sowie immunfluoreszente (Antikörper 2964) Färbungen von Gefrierschnitten zwölf Monate alter Tiere eine signifikante Reduktion der Plaques verglichen mit gleichaltrigen APP/PS1-tg.

Während Colton *et al.* iNOS-depletionsbedingte A β -Reduzierungen in einem rein APP-transgenen Tiermodell nicht bestätigen konnten, sondern im Gegenteil von Erhöhungen der A β -Mengen der APP-tg iNOS-defizienten Tieren berichten [Colton *et al.*, 2006 Colton *et al.*, 2008; Wilcock *et al.*, 2008], bestätigen diese Ergebnisse die von Nathan *et al.*, 2005 mittels ELISA, „Western blot“ und Immunhistochemie nachgewiesenen A β -senkenden Effekte genetischer iNOS-Depletion in APP/PS1-tg iNOS^(-/-) Tieren. Hingegen konnte die Senkung des sauren Gliafaserproteins (GFAP, „glial fibrillary acidic protein“), welches insbesondere in Plaque-nahen Astrozyten exprimiert wird [Mehlhorn *et al.*, 2000], in APP/PS1-tg iNOS^(-/-) Tieren nicht nachvollzogen werden. Im Gegensatz zur nicht signifikant unterschiedlichen Immunreaktivität war die Immunreaktivität für „neuronal nuclei“ (NeuN) von APP/PS1-tg iNOS^(-/-) Tieren im Vergleich mit APP/PS1-tg Tieren höher.

Die Ursachen für die Reduzierung der A β -Menge in den iNOS-defizienten, APP/PS1-transgenen Tieren war, basierend auf den „Western blot“-Daten, nicht in der Menge der degradierenden Enzyme Neprilysin und IDE zu suchen, jedoch zeigten *in vitro*-Messungen der enzymatischen Aktivität der beiden Enzyme eine NO-konzentrationsabhängige Reduktion der IDE-Aktivität. Cordes *et al.*, 2009 konnten zeigen, dass S-Nitrosylierung von IDE durch NO-Donoren wie S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP), Natrium Nitroprussid (SNP, „sodium nitroprusside“) und (Z)-1-[N-3-aminopropyl]-N-(n-propyl)amino]diazonium-1,2-dolat (PAPA-NONOat) sowie durch iNOS- produziertes NO zu einer bis zu fünfzigprozentigen Inhibition der A β -Degradation führt. Die Autoren führen diese auf eine Dissoziation von IDE vom Proteasom nach NO-Bindung und sukzessiver

Inhibition des Ubiquitin-„pathways“ zurück, entsprechend dem Mechanismus nach IDE-Insulin-Bindung [Bennett *et al.*, 2000].

Die nun dargestellten Daten zur mikroglialer „Clearance“ zeigen hingegen, dass die Phagozytoserate iNOS^(-/-) primärer Mikroglia (PMG) mit der von WT-PMG vergleichbar ist. Auch konnte die Phagozytose von WT PMG weder durch Zugabe verschiedener NO-(Derivat-)Donoren, noch durch fibrilläres A β moduliert werden. Auch zeigten Co-Färbungen für A β und CD11b, einem mikroglialen Oberflächenprotein [Akiyama und McGeer, 1990], keinerlei Unterschiede hinsichtlich der Co-Lokalisation und somit hinsichtlich der mikroglialen Deckung der Amyloidplaques. Obwohl die mikrogliale Aktivierung einen wichtigen Faktor bei der Generation des NO im Rahmen der AD darstellt [Heneka *et al.*, 2000a; Heneka *et al.*, 2000b; Heneka *et al.*, 2000c; Heneka *et al.*, 2001b], konnte eine Modulation der phagozytotischen Aktivität der Mikroglia durch NO und/oder A β im Rahmen dieser Studie *in vitro* und *in situ* damit nahezu ausgeschlossen werden.

Auch die A β -Prozessierung war in den APP/PS1-tg Tieren durch iNOS-Defizienz in dieser Studie unbeeinflusst: Sowohl APP als auch c-terminale Fragmente (CTF) zeigten weder in drei Monate, noch in zwölf Monate alten Tieren nennenswerte Mengenunterschiede im „Western blot“. Die Mengen von A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ (ELISA) sowie des Gesamt-A β („Western blot“) waren zwischen den beiden untersuchten drei Monate alten Tiergruppen ebenfalls annähernd gleich, wohingegen sämtliche A β -Mengen in zwölf Monate alten APP/PS1-tg iNOS-defizienten Tieren signifikant reduziert waren.

4.7 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Bisher wurden iNOS-abhängige, NO-vermittelte Prozesse als sekundär durch A β -Ablagerungen hervorgerufene Entzündungsreaktion dargestellt [Akama *et al.*, 1998; Forstermann und Kleinert, 1995; Hardy und Higgins, 1992; Heneka *et al.*, 2000a; Heneka und Feinstein, 2001; Heneka *et al.*, 2000b; Heneka *et al.*, 2000c; Heneka *et al.*, 2001b; Ishii *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1999; Minc-Golomb *et al.*, 1996; Vodovotz *et al.*, 1996].

Auf Grund der hier gezeigten protektiven Effekte genetischer und pharmakologischer iNOS-Inhibition auf kognitive Leistungen und LTP sowie auf

Grund der Modulation der synaptosomalen Mitochondrienaktivität durch NO-Donoren und -Derivate zu einem Zeitpunkt, zu dem keinerlei Änderung in A β ₁₋₄₀- und A β ₁₋₄₂-Mengen vorliegt, muss eine ursächliche Rolle von NO für die Pathogenese der AD in Betracht gezogen werden.

Bemerkenswerterweise hielten zudem die Unterschiede in den Fehlerraten des Arbeits- und Referenzgedächtnisses der drei Monate alten Tiere der vier Gruppen zum Zeitpunkt von zwölf Monaten nicht nur an, sondern waren sogar für beide Parameter signifikanter als die Unterschiede der beiden Parameter bei den jüngeren Tiergruppen.

Die Reduzierung der A β -Mengen zum Zeitpunkt von zwölf Monaten in Gehirnen iNOS-defizienter APP/PS1-tg Tiere, die bereits von Nathan *et al.*, 2005 unter Verwendung eines anderen APP/PS1-tg Tiermodell beschrieben wurde, konnte im Rahmen dieser Studie sowohl mittels „Western blot“ Detektion, als auch per ELISA bestätigt werden. Proteinmengen der bekannten A β -degradierenden Enzyme Neprilysin und dem IDE waren zu beiden Zeitpunkten (drei und zwölf Monate) nicht unterschiedlich zwischen iNOS-kompetenten und -defizienten APP/PS1-tg Tieren. Jedoch zeigte die Enzymaktivität von IDE, nicht jedoch von Neprilysin, *in vitro* eine starke, NO-konzentrationsabhängige Reduktion. Da darüber hinaus weder eine erhöhte mikrogliale Deckung amyloider Plaques in Gefrierschnitten iNOS^(-/-) APP/PS1-tg Tiere, noch eine Modifikation der Phagozytose von PMG durch iNOS-Depletion, NO-, A β - oder ONOO-Stimulation nachgewiesen werden konnte, müssen neben der reinen Degradationsrate des A β weitere Mechanismen zur Plaque-Reduzierung in Betracht gezogen werden.

Die Tatsache, dass humanes A β im Gegensatz zur murinen Form an AS-Position 10 nitrierbares Tyrosin besitzt [Yamada *et al.*, 1987] und N-terminale Modifikationen Einfluss auf die Aggregation von A β haben [He und Barrow, 1999; Schilling *et al.*, 2008], mag eine mögliche Erklärung für die Abwesenheit von A β -Plaques sowohl in Wildtyp-Mäusen, als auch in Mäusen, die murines APP überexprimieren [Jankowsky *et al.*, 2007], sein. Hingegen entwickeln Spezies, deren endogenes A β Tyrosin enthält, amyloide Plaques [Inestrosa *et al.*, 2005]. Da für verschiedene Nitrierungen des Tau-Proteins eine verstärkte Aggregation gezeigt wurde [Chen *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2009; Reyes *et al.*, 2008; Reynolds *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005], könnte die Nitrierung von A β zudem eine Erklärung bieten, warum die Injektion

künstlichen A β s im Gegensatz zu *in vivo* produziertem und *post mortem* isoliertem A β keine Plaquebildung induziert [Eisele *et al.*, 2009; Meyer-Luehmann *et al.*, 2006] und die Aggregationsraten murinen und humanen A β s *in vitro* in Abwesenheit von NO keinerlei Unterschiede zeigten [Fung *et al.*, 2004; Hilbich *et al.*, 1991]. Der jüngst gelungene Nachweis nitrirten A β s in Plaques sowohl APP-, als auch APP/PS1-transgener Tiere sowie eine erhöhte Aggregation nitrirten A β s [Kummer *et al.*, 2011] unterstützen die Annahme, dass die Depletion von iNOS und somit eine Reduzierung des NO maßgeblich zur geringeren Plaquebildung beiträgt.

Auch wenn die von Nathan *et al.*, 2005 beschriebenen, A β -senkenden sowie die hier beschriebenen kognitiv-protektiven Effekte der iNOS-Depletion in APP/PS1-transgenen Mäusen von Colton *et al.*, 2006, Colton *et al.*, 2008 sowie Wilcock *et al.*, 2008 in rein APP-transgenen Tiermodellen nicht bestätigt werden konnten, so sollte die Wirksamkeit der pharmakologischen Inhibition der iNOS durch L-NIL vor dem Hintergrund bereits durchgeführter Studien mit weiteren iNOS-Inhibitoren im Rahmen einer klinischen Studie evaluiert werden, insbesondere da die Sicherheit von L-NIL an gesunden Probanden sowie Asthmapatienten [Hansel *et al.*, 2003] bereits nachgewiesen wurde.

Anhang

I - Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, über Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt) und Sigma Aldrich (München) bezogen.

Rezeptur 1: aCSF* - Medium für die LTP-Messungen

(s. 2.6 Langzeitpotenzierung in vitro)

	Finale Konzentration
NaCl	124 mM
KCl	4 mM
NaH ₂ PO ₄	1,24 mM
MgSO ₄	1,3 mM
NaHCO ₃	26 mM
D-Glucose	10 mM
CaCl ₂	1 mM
* artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit	

Rezeptur 2: Coomassie-Färbung - Anfärbung von Proteinbanden für die MalDI-TOF-MS

(s. 2.7.4 Coomassie-Färbung)

<u>Fixierlösung</u>	Masse resp. Volumen	Finale Konzentration
Ethanol reinst	500 ml	50 % (v/v)
Phosphorsäure	3 ml	3 % (v/v)
ddH ₂ O <i>ad</i>		1000 ml

<u>Färbelösung*</u>	Masse / Volumen	Finale Konzentration
Ammoniumsulfat**	170 g	17 % (w/v)
Phosphorsäure	3 ml	3 % (v/v)
Methanol reinst***	340 ml	34 % (v/v)
ddH ₂ O <i>ad</i>		1000 ml

* Angaben zur Herstellung der Lösung zur Equilibrierung des Gels; zur Färbung der Proteinbanden wurden 0,35 g/l Coomassie Brilliant-Blue G-250 zugegeben

** Ammoniumsulfat in ca. 500 ml ddH₂O lösen, erst danach mit der Zugabe der Phosphorsäure beginnen

*** Methanol unter konstantem Rühren zum Schluss zugeben

Rezeptur 3: Homogenisations- & Gradientenpuffer - Proteinbiochemie

(s. 2.3.2 Isolation von Synaptosomen für proteinchemische Untersuchungen)

	Masse resp. Volumen	Finale Konzentration
NaF	0,02 ml (2 M)	5 mM
NaVO ₃ *		2 mM
Pyrophosphate	0,11 g	5 mM
EDTA**	200 µl (500 mM)	1 mM
Tris Acetat	0,6 g	50 mM
PMSF***		1 mM
PIC****		1 : 500
Saccharose	10,00 % (w/v)	0,32 M
	31,25 % (w/v)	1,0 M
	43,75 % (w/v)	1,4 M
ddH ₂ O ad		100 ml
* Natriumorthovanadat		
** Ethylendiamintetraacetat		
*** Phenylmethylsulfonylfluorid		
**** Protease-Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich, München)		

Rezeptur 4: Homogenisationspuffer - synaptosomale Mitochondrien

(s. 2.3.3 Isolation synaptosomaler Mitochondrien zur Aktivitätsbestimmung)

	Masse resp. Volumen	Finale Konzentration
HEPES* pH 7,4	0,4 ml (1 M)	4 mM
Saccharose	10,00 % (w/v)	0,32 M
ddH ₂ O ad		100 ml
pH ad		7,3
* 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure		

Rezeptur 5: Lysispuffer (nicht-ionisch) - Proteinase K-Verdau* der Schwanzbiopsien

(s. 2.1.4.1 Isolation genomischer Desoxyribonukleinsäure (gDNA))

	Masse resp. Volumen	Finale Konzentration
KCl	1,25 ml (2 M)	50 mM
Tris HCl (pH 8,3)	0,5 ml (1 M)	10 mM
MgCl ₂	0,125 ml (1 M)	2,5 mM
Gelatine	5 mg	0,1 mg/ml
NP-40	0,225 ml	0,45 %
Tween-20	0,225 ml	0,45 %
ddH ₂ O ad		50 ml
* Nach Zubereitung sterilfiltrieren (Porengröße 0,2 µm), Proteinase K (finale Konzentration im Lysispuffer 10 mg/ml) erst unmittelbar vor Inkubation der Schwanzbiopsien zugeben.		

Rezeptur 6: PBS*(T)** - Trypsinisierung von Zellen in Kultur sowie für die Histologie
(s. 2.4.2 Isolation primärer Mikroglia & 2.5 Histologische Untersuchungen)

	Masse resp. Volumen	Finale Konzentration
NaCl	8 g	8 g/l
KCl	0,2 g	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,44 g	1,44 g/l
KH ₂ PO ₄	0,24 g	0,24 g/l
Triton® X-100	1 ml	0,1 %
ddH ₂ O <i>ad</i>		1000 ml
pH <i>ad</i>		7,2
* „phosphate buffered saline“, phosphatgepufferte Salzlösung		
** Mit (PBST) oder ohne (PBS) 0,1 % Triton® X-100 (Sigma-Aldrich, München)		

Rezeptur 7: RIPA* Puffer - Lysis der Proben für die PAGE
(s. 2.7.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

	Masse resp. Volumen	Finale Konzentration
NaCl	1,752 g	150 mM
NP-40	2 ml	1 %
DOC	1 g	0,5 %
SDS	1 ml (20 %)	0,1 %
Tris Acetat (pH 8,0)	6,67 ml (1,5 M)	25 mM
ddH ₂ O <i>ad</i>		200 ml
* „radio immunoprecipitation assay“, Röntgenimmunopräzipitations-Untersuchung		

Rezeptur 8: Synaptosomenpuffer zur Isolation synaptosomaler Fraktionen
(s. 2.1.4.3 Agarose-Gelelektrophorese)

	Finale Konzentration
NaF	5 mM
Na Va	2 mM
Pyrophosphat	5 mM
PMSF	1 mM
EDTA	1 mM
Tris Acetat (ad pH 8,0)	0,1 mM
Saccharose	0,32 M
PIC	1 : 500
ddH ₂ O <i>ad</i>	100 ml
* Tris-Borat-EDTA Puffer	

Rezeptur 9: TBE* - Laufpuffer und flüssige Phase des Agarose-Gels zur DNA-Separation
(s. 2.1.4.3 Agarose-Gelelektrophorese)

	Masse resp. Volumen	Finale Konzentration
Tris Base	10,8 g	50 mM
Borat	30,5 g	150 mM
EDTA	1,7 g	0,1 % (v/v)
ddH ₂ O <i>ad</i>		1000 ml
* Tris-Borat-EDTA Puffer		

Rezeptur 10: TBS*(T)** - Waschen und Blocken der Blot-Membranen

(s. 2.7.2 „Western blot“)

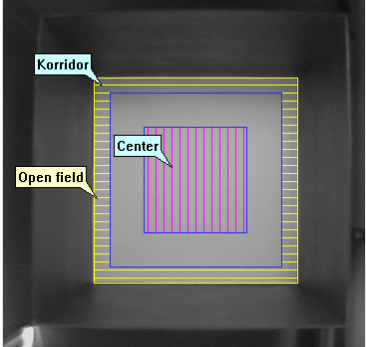
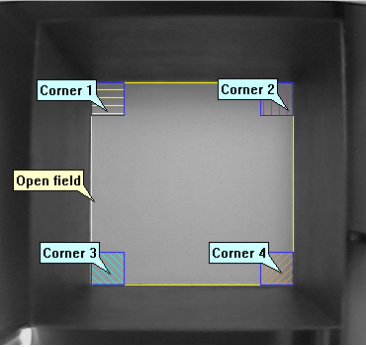
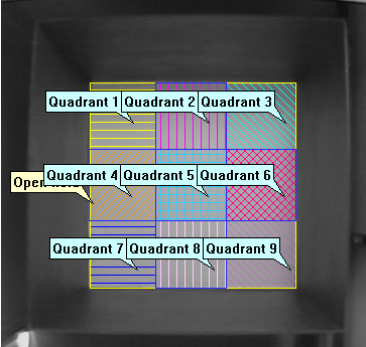
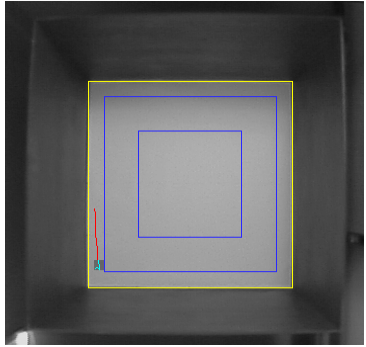
	Masse resp. Volumen	Finale Konzentration
Tris HCl (pH 7,4)	50 ml (1 M)	50 mM
NaCl	30 ml (5 M)	150 mM
(Tween-20)	1 ml	0,1 % (v/v)
ddH ₂ O <i>ad</i>		1000 ml
* „Tris buffered saline“, Tris-gepufferte Salzlösung		
** Mit (TBST) oder ohne (TBS) 0,1 % (v/v) Tween-20		

Rezeptur 11: TG* - “Western blot”-Transfer

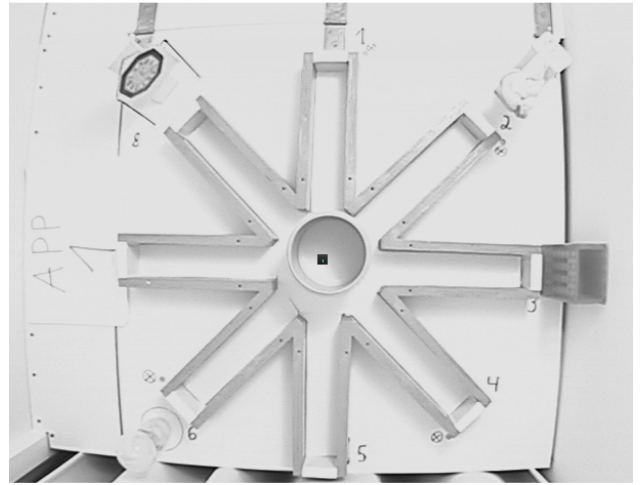
(s. 2.7.2 „Western blot“)

	Masse resp. Volumen	Finale Konzentration
Tris Base	3,03g	25 mM
NaCl	14,41g	192 mM
Methanol	200 ml	0,1 % (v/v)
ddH ₂ O <i>ad</i>		1000 ml
* Tris-Glycin Puffer		

II - Supplementäre Abbildungen

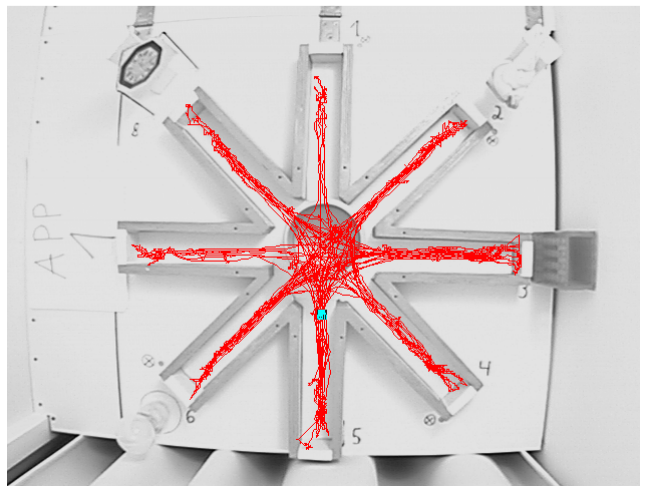
	<p>a) Aufnahme der „Open field“-Box (60 cm × 60 cm) sowie Overlay der Auswertezonen „Korridor“ (5 cm entlang der Wand, „Corridortime“ als Parameter der Angst der Tiere) und „Center“ (zentraler Bereich; 30 cm × 30 cm, „Centertime“ als Parameter des Explorationsverhaltens der Tiere) mittels der Aufnahme- und Analysesoftware EthoVision*</p>
	<p>b) Overlay der Auswertezonen „Corner 1“ - „Corner 4“ (Eckbereiche des „Open field“; 10 cm × 10 cm) zur Ermittlung der „Cornertime“ als Parameter der Angst der Tiere.</p>
	<p>c) Overlay der neun Quadranten (je 20 cm × 20 cm) zur Ermittlung der allgemeinen motorischen Aktivität der Tiere.</p>
	<p>d) Projektion eines im Rahmen einer „Open field“ Sitzung aufgenommenen Koordinatenverlaufs auf ein zuvor aufgenommenes Bild der „Open field“ Box.</p> <p>Gelbe Linie: Aussenmaße des „Open field“</p> <p>Blaue Linien: Overlay der Zonen „Korridor“ und „Center“</p> <p>Rote Linie: Projektion der Koordinaten eines 10 s Intervalls der entsprechenden Sitzung</p>
<p>Suppl. Abbildung 1: „Open field“ Untersuchung - Design und Auswerteparameter * Noldus Information Technology b.v., Wageningen, Die Niederlande</p>	

a) Aufnahme des 8-Arm-Labyrinths und des unabgedeckten Rohrs (\varnothing 120 mm) mittels der Aufnahme- und Analysesoftware EthoVision*



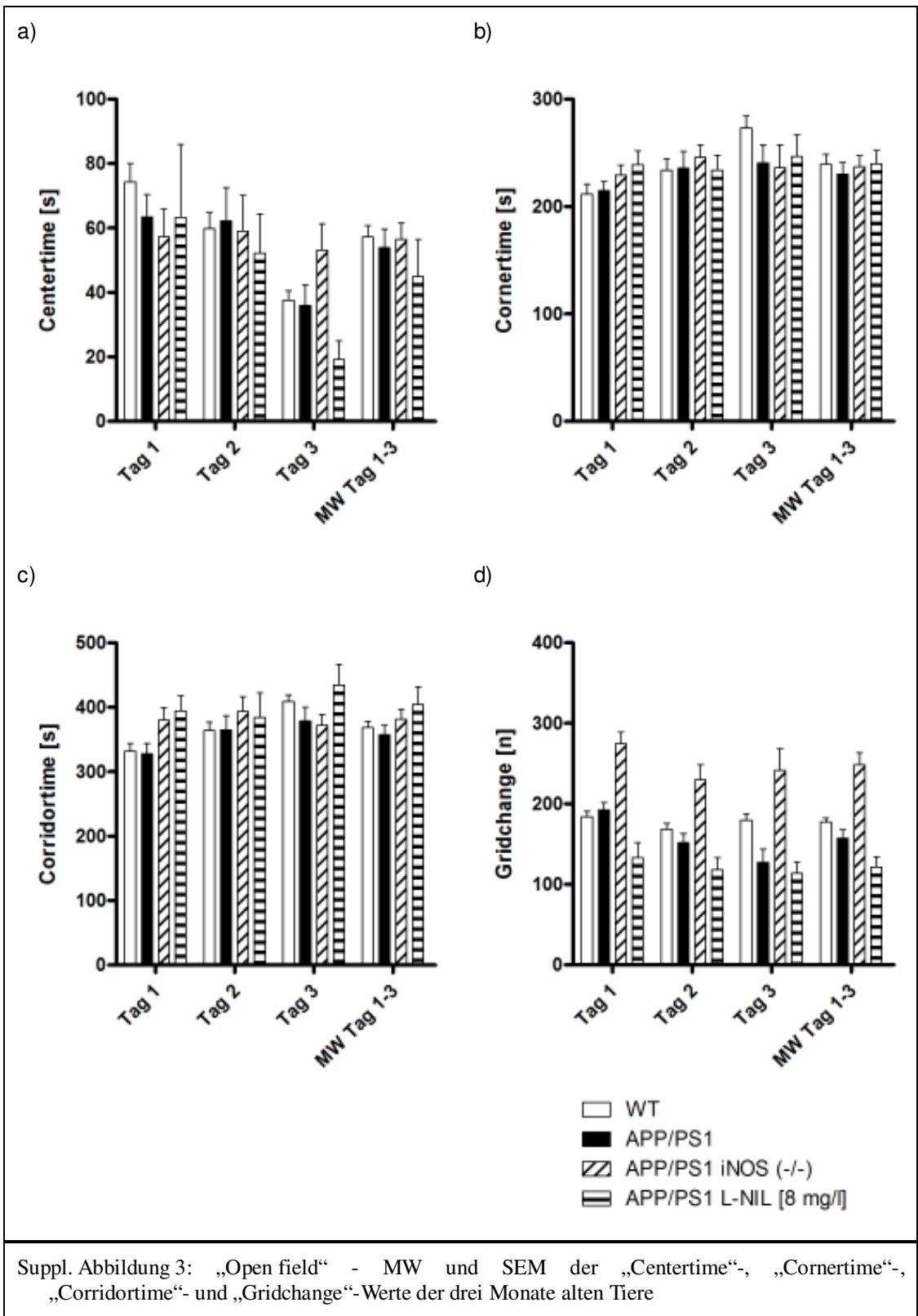
b) Projektion eines im Rahmen einer 8-Arm-Labyrinth-Sitzung aufgenommenen Koordinatenverlaufs auf ein zuvor aufgenommenes Bild des 8-Arm-Labyrinths.

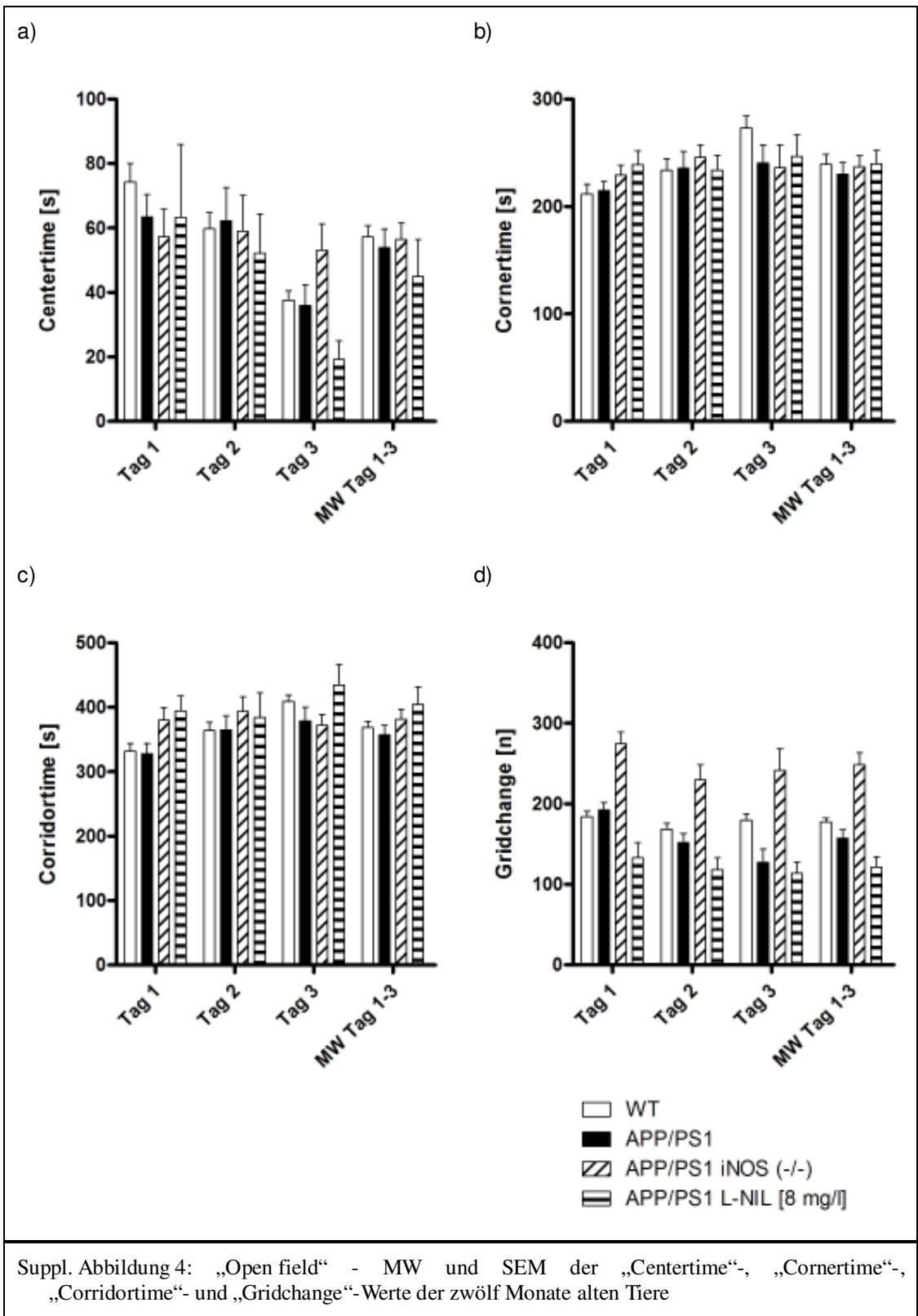
Rote Linie: Projektion der Tier-Koordinaten einer Sitzung

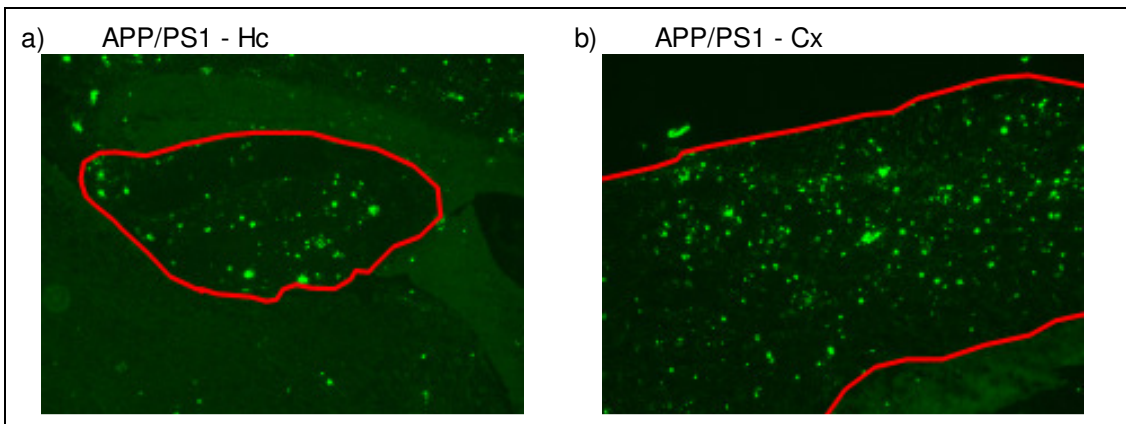


Suppl. Abbildung 2: Radiales 8-Arm-Labyrinth - Design und Projektion der Tier-Koordinaten einer Sitzung

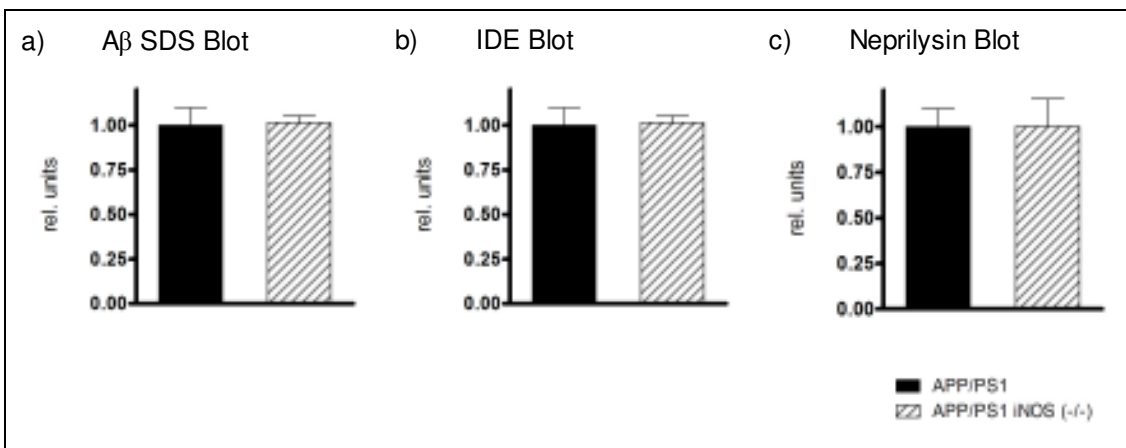
* Noldus Information Technology b.v., Wageningen, Die Niederlande







Suppl. Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Wahl der Regionen von Interesse (ROI, „region of interest“; rote Linie) an Thioflavin-S-gefärbten Schnitten zwölf Monate alter APP/PS1-transgener Tiere (a) *Hippocampus* (Hc), b) *Cortex* (Cx)



Suppl. Abbildung 6: Blotauswertungen der zwölf Monate alten Tiere

III - Supplementäre Tabellen

Suppl. Tabelle 1: Determination des durchschnittlichen Körpergewichts sowie des durchschnittlichen Wasserverbrauchs der mit L-NIL zu behandelnden APP/PS1-tg-Mäuse		
Determination des Wasserverbrauchs		
	Käfig 1 (n = 4)	Käfig 2 (n = 4)
Gewicht Wasserflasche 30. März 2006*	376,40 g	362,09 g
Gewicht Wasserflasche 31. März 2006*	356,24 g	342,16 g
$\Delta(\text{Gewicht Wasserflasche})/d \pm 5 \text{ min}$	20,16 g	19,93 g
$\Delta(\text{Gewicht Wasserflasche})/d/\text{Tier}$	5,04 g	4,98 g
Berechnung der individuell verabreichten L-NIL Konzentration		
MW $\Delta(\text{Gewicht Wasserflasche})$ pro Tag und Tier (\triangleq Wasserverbrauch [ml pro Tag und Tier])	5 g/d/Tier (\triangleq 5 ml/d/Tier)	
Gewicht pro Tier (MW; n = 8)	30 g	
Konzentration L-NIL im Trinkwasser**:	8 mg/l	
Konzentration L-NIL pro kg Körpergewicht (KG)	1,3 mg/kg KG/d 5,1 $\mu\text{M}/\text{kg KG/d}$	
* Wiegen der Flaschen jeweils zur selben Uhrzeit \pm 5 Minuten		
** Hampl <i>et al.</i> , 2006		

Suppl. Tabelle 2: PCR-Bedingungen zur Genotypisierung der verwendeten Genotypen				
Genotyp:	APP/PS1-Transgen	Temp [°C]	t [h:min:s]	Läufe [n]
Amplifikationstarget:	PrP-Region der Insertion	95	3:00	35 ×
Amplifikatsgröße:	608 bp	95	1:00	
		65	1:00	
„forward“-Primer (Primer Nr. 219 / oIMR1644)*:		72	1:00	
5' → 3':	AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA	72	7:00	
„reverse“-Primer (Primer Nr. 220 / oIMR1645)**:		4	[Pause]	
5' → 3':	GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT	Σ	2:06:00	lt. Gerät***
Genotyp: iNOS (+) Allel				
Amplifikationstarget:	Wildtyp-Sequenz des <i>iNOS</i> -E14/15-Locus	95	4:00	32 ×
Amplifikatsgröße:	108 bp	95	0:30	
		65	0:30	
„forward“-Primer (Primer Nr. 323 / oIMR1216)*:		72	0:45	
5' → 3':	ACA TGC AGA ATG AGT ACC GG	72	10:00	
„reverse“-Primer (Primer Nr. 324 / oIMR1217)**:		4	[Pause]	
5' → 3':	TCA ACA TCT CCT GGT GGA AC	Σ	1:34:00	lt. Gerät***
Genotyp: iNOS (-) Allel				
Amplifikationstarget:	Disruptionsinsert- Sequenz am <i>iNOS</i> -E14/15-Locus	95	4:00	32 ×
Amplifikatsgröße:	275 bp	95	0:30	
		65	0:30	
„forward“-Primer (Primer Nr. 323 / oIMR1216)*:		72	0:45	
5' → 3':	ACA TGC AGA ATG AGT ACC GG	72	10:00	
„reverse“-Primer (Primer Nr. 324 / oIMR1217)**:		4	[Pause]	
5' → 3':	AAT ATG CGA AGT GGA CCT CG	Σ	1:034:00	lt. Gerät***
*	Orientierung auf Template: 5' → 3'; oIMR - JAX® Mice Primer Nr.; 2,5 µl / 47 µl MM			
**	Orientierung auf Template: 3' → 5'; oIMR - JAX® Mice Primer Nr.; 2,5 µl / 47 µl MM			
***	T1 Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland)			

Suppl. Tabelle 3: „Open field“ - MW und SEM der drei Monate alten Tiere								
Alter: drei Monate	WT (n = 31)		APP/PS1-tg (n = 16)		APP/PS1-tg iNOS (-/-) (n = 6)		APP/PS1-tg L-NIL [8 mg/l] (n = 9)	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
Centertime [s]								
Tag 1	74,25	5,81	63,51	6,85	57,29	8,61	63,33	22,57
Tag 2	59,77	5,04	62,24	10,33	59,03	11,11	52,17	12,25
Tag 3	37,61	2,89	35,98	6,44	53,16	8,05	19,16	5,81
MW Tag 1-3	57,21	3,55	53,91	5,82	56,49	5,04	44,89	11,52
Cornertime [s]								
Tag 1	211,69	8,97	214,94	8,43	229,25	9,50	239,12	12,76
Tag 2	233,69	11,07	235,65	15,71	245,60	11,92	233,86	14,06
Tag 3	273,34	11,24	240,60	16,83	236,36	20,94	246,51	20,13
MW Tag 1-3	239,57	8,93	230,39	10,67	237,07	10,26	239,83	12,37
Corridortime [s]								
Tag 1	332,30	11,53	327,79	16,14	379,75	19,60	394,35	23,08
Tag 2	363,80	12,83	364,73	22,18	393,59	22,49	384,21	38,07
Tag 3	409,12	10,20	378,84	21,42	372,19	16,98	434,66	31,85
MW Tag 1-3	368,41	9,78	357,12	14,62	381,84	15,44	404,40	27,37
Gridchange [n]								
Tag 1	184,23	6,91	192,38	9,43	274,50	14,64	132,89	18,77
Tag 2	168,32	7,67	151,69	11,76	229,83	18,45	118,11	14,94
Tag 3	179,81	8,12	127,38	16,23	241,83	26,52	113,67	14,28
MW Tag 1-3	177,45	5,00	157,15	10,76	248,72	14,63	121,56	12,39

Suppl. Tabelle 4: „Open field“ - MW und SEM der zwölf Monate alten Tiere								
Alter: zwölf Monate	WT (n = 12)		APP/PS1-tg (n = 9)		APP/PS1-tg iNOS (-/-) (n = 6)		APP/PS1-tg L-NIL [8 mg/l] (n = 12)	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
Centertime [s]								
Tag 1	65,32	8,34	56,39	8,84	45,25	12,58	48,67	7,36
Tag 2	41,27	7,06	36,84	7,04	35,57	12,40	39,06	6,64
Tag 3	41,51	8,42	39,08	6,67	50,64	13,94	36,17	2,13
MW Tag 1-3	49,37	6,29	44,10	5,16	41,46	9,05	40,61	4,19
Cornertime [s]								
Tag 1	198,67	13,22	255,33	24,26	244,21	24,53	208,18	15,95
Tag 2	246,68	14,27	266,66	18,87	287,49	35,56	264,66	24,20
Tag 3	265,09	25,15	281,10	18,08	287,73	48,01	258,55	13,15
MW Tag 1-3	236,81	10,97	267,70	13,85	273,14	32,01	243,80	14,42
Corridortime [s]								
Tag 1	310,19	31,41	362,61	28,87	377,48	26,47	313,42	26,76
Tag 2	350,94	30,76	389,04	30,30	415,27	37,72	353,33	22,91
Tag 3	380,15	27,46	405,82	25,69	414,09	46,74	368,06	17,04
MW Tag 1-3	347,09	26,61	385,82	21,07	402,28	28,47	344,94	18,05
Gridchange [n]								
Tag 1	163,67	23,33	131,89	17,25	213,17	32,57	143,83	14,35
Tag 2	151,58	30,73	114,22	13,08	206,67	41,07	126,33	13,33
Tag 3	146,50	32,35	114,56	18,02	175,67	33,20	115,08	13,25
MW Tag 1-3	153,92	28,63	120,22	15,08	198,50	29,98	128,42	12,61

Suppl. Tabelle 5: Radiales 8-Arm-Labyrinth - „ANOVA“ und „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“ der WME-AUC-Werte der drei Monate alten Tiere					
"One-way analysis of variance (ANOVA)"					
p-Wert				0,0001	
p-Wert				***	
p-Wert < 0,05				Ja	
Anzahl Gruppen				4	
F-Wert				9,999	
R ²				0,5172	
Gruppenwerte			MW	SEM	
WT			3,11	0,41	
APP/PS1			5,60	0,33	
APP/PS1 iNOS (-/-)			2,50	0,75	
APP/PS1 L-NIL [8mg/l]			4,89	0,42	
ANOVA Tabelle		Σ^2	FG	MW ²	
Treatmentvarianz		43,94	3	14,65	
Fehlervarianz		41,02	28	1,465	
Gesamtvarianz		84,96	31		
"Newman-Keuls Multiple Comparison Test"		MW Differenz	q	p-Wert < 0,05?	Zusammenfassung
APP/PS1 iNOS (-/-) vs APP/PS1		-3,1000	5,503	Ja	**
APP/PS1 iNOS (-/-) vs APP/PS1 L-NIL [8mg/l]		-2,3890	4,187	Ja	*
APP/PS1 iNOS (-/-) vs WT		-0,6071	1,078	Nein	ns
WT vs APP/PS1		-2,4930	6,513	Ja	***
WT vs APP/PS1 L-NIL [8mg/l]		-1,7820	4,531	Ja	**
APP/PS1 L-NIL [8mg/l] vs APP/PS1		-0,7111	1,808	Nein	ns

Suppl. Tabelle 6: Radiales 8-Arm-Labyrinth - „ANOVA“ und „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“ der RME-AUC-Werte der drei Monate alten Tiere					
"One-way analysis of variance (ANOVA)"					
p-Wert				< 0,0001	
p-Wert				***	
p-Wert < 0,05				Ja	
Anzahl Gruppen				4	
F-Wert				30,14	
R ²				0,7635	
Gruppenwerte			MW	SEM	
WT			3,11	0,41	
APP/PS1			5,60	0,33	
APP/PS1 iNOS (-/-)			2,50	0,75	
APP/PS1 L-NIL [8mg/l]			4,89	0,42	
ANOVA Tabelle		Σ^2	FG	MW ²	
Treatmentvarianz		145	3	48,32	
Fehlervarianz		44,89	28	1,603	
Gesamtvarianz		189,8	31		
"Newman-Keuls Multiple Comparison Test"		MW Differenz	q	p-Wert < 0,05?	Zusammenfassung
APP/PS1 iNOS (-/-) vs APP/PS1		-5,2710	13,17	Ja	***
APP/PS1 iNOS (-/-) vs APP/PS1 L-NIL [8mg/l]		-2,3970	5,826	Ja	***
APP/PS1 iNOS (-/-) vs WT		-1,1190	1,899	Nein	ns
WT vs APP/PS1		-4,1520	7,045	Ja	***
WT vs APP/PS1 L-NIL [8mg/l]		-1,2780	2,141	Nein	ns
APP/PS1 L-NIL [8mg/l] vs APP/PS1		-2,8750	6,988	Ja	***

Suppl. Tabelle 7: Radiales 8-Arm-Labyrinth - „ANOVA“ und „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“ der WME-AUC-Werte der zwölf Monate alten Tiere					
"One-way analysis of variance (ANOVA)"					
p-Wert				< 0,0001	
p-Wert				***	
p-Wert < 0,05				Ja	
Anzahl Gruppen				4	
F-Wert				9,974	
R ²				0,4681	
Gruppenwerte			MW	SEM	
WT			4,29	0,48	
APP/PS1			9,06	1,06	
APP/PS1 iNOS (-/-)			5,81	0,81	
APP/PS1 L-NIL [8mg/l]			7,26	0,35	
ANOVA Tabelle		Σ^2	FG	MW ²	
Treatmentvarianz		127,2	3	42,39	
Fehlervarianz		144,5	34	4,25	
Gesamtvarianz		271,7	37		
"Newman-Keuls Multiple Comparison Test"		MW Differenz	q	p-Wert < 0,05?	Zusammenfassung
APP/PS1 iNOS (-/-) vs APP/PS1		-4,7780	7,432	Ja	***
APP/PS1 iNOS (-/-) vs APP/PS1 L-NIL [8mg/l]		-2,9740	4,887	Ja	**
APP/PS1 iNOS (-/-) vs WT		-1,5240	2,091	Nein	ns
WT vs APP/PS1		-3,2540	4,235	Ja	*
WT vs APP/PS1 L-NIL [8mg/l]		-1,4500	1,96	Nein	ns
APP/PS1 L-NIL [8mg/l] vs APP/PS1		-1,8040	2,753	Nein	ns

Suppl. Tabelle 8: Radiales 8-Arm-Labyrinth - „ANOVA“ und „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“ der RME-AUC-Werte der zwölf Monate alten Tiere					
"One-way analysis of variance (ANOVA)"					
p-Wert				< 0,0001	
p-Wert				***	
p-Wert < 0,05				Ja	
Anzahl Gruppen				4	
F-Wert				18,24	
R ²				0,6168	
Gruppenwerte			MW	SEM	
WT			7,09	0,56	
APP/PS1			10,40	0,60	
APP/PS1 iNOS (-/-)			5,87	0,68	
APP/PS1 L-NIL [8mg/l]			5,34	0,22	
ANOVA Tabelle		Σ^2	FG	MW ²	
Treatmentvarianz		141,1	3	47,03	
Fehlervarianz		87,64	34	2,578	
Gesamtvarianz		228,7	37		
"Newman-Keuls Multiple Comparison Test"		MW Differenz	q	p-Wert < 0,05?	Zusammenfassung
APP/PS1 iNOS (-/-) vs APP/PS1		-5,0610	9,918	Ja	***
APP/PS1 iNOS (-/-) vs APP/PS1 L-NIL [8mg/l]		-1,7450	3,683	Ja	*
APP/PS1 iNOS (-/-) vs WT		-0,5249	0,911	Nein	ns
WT vs APP/PS1		-4,5360	7,581	Ja	***
WT vs APP/PS1 L-NIL [8mg/l]		-1,2200	2,15	Nein	ns
APP/PS1 L-NIL [8mg/l] vs APP/PS1		-3,315	6,623	Ja	***

Suppl. Tabelle 9: Langzeitpotenzierung - „ANOVA“, „Bartlett’s test for equal variances“ und „Tukey’s Multiple Comparison Test“ der prozentualen Amplitudenänderung 10 Minuten nach Induktion				
"One-way analysis of variance (ANOVA)"				
p-Wert				0,0035
p-Wert				**
p-Wert < 0,05				Ja
Anzahl Gruppen				4
F-Wert				5,280
R ²				0,2738
„Bartlett’s test for equal variances“				
Bartlett’s Statistik (korrigiert)				5,629
p-Wert				0,1311
p-Wert Zusammenfassung				ns
p-Wert < 0,05				Nein
ANOVA Tabelle		Σ^2	FG	MW ²
Treatmentvarianz		27,510	3	9,169
Fehlervarianz		72,940	42	1,737
Gesamtvarianz		100,400	45	
"Tukey’s Multiple Comparison Test"	MW Differenz	q	p-Wert < 0,05?	Zusammenfassung
WT vs APP/PS1	66,40	5,357	Ja	**
WT vs APP/PS1 iNOS (-/-)	19,20	1,457	Nein	ns
WT vs APP/PS1 L-NIL [8 mg/l]	26,86	2,167	Nein	ns
APP/PS1 vs APP/PS1 iNOS (-/-)	-47,20	3,808	Ja	*
APP/PS1 vs APP/PS1 L-NIL [8 mg/l]	-39,54	3,421	Nein	ns
APP/PS1 iNOS (-/-) vs APP/PS1 L-NIL [8 mg/l]	7,662	0,6181	Nein	ns

Suppl. Tabelle 10: Langzeitpotenzierung - „ANOVA“, „Bartlett’s test for equal variances“ und „Tukey’s Multiple Comparison Test“ der prozentualen Amplitudenänderung 60 Minuten nach Induktion				
"One-way analysis of variance (ANOVA)"				
p-Wert				0,0049
p-Wert				**
p-Wert < 0,05				Ja
Anzahl Gruppen				4
F-Wert				4,975
R ²				0,2669
„Bartlett’s test for equal variances“				
Bartlett’s Statistik (korrigiert)				11,58
p-Wert				0,0090
p-Wert Zusammenfassung				**
p-Wert < 0,05				Ja
ANOVA Tabelle		Σ^2	FG	MW ²
Treatmentvarianz		44,680	3	14,890
Fehlervarianz		122,700	41	2,994
Gesamtvarianz		167,400	44	
"Tukey’s Multiple Comparison Test"	MW Differenz	q	p-Wert < 0,05?	Zusammenfassung
WT vs APP/PS1	69,00	4,240	Ja	*
WT vs APP/PS1 iNOS (-/-)	-9,600	0,5548	Nein	ns
WT vs APP/PS1 L-NIL [8 mg/l]	12,08	0,7294	Nein	ns
APP/PS1 vs APP/PS1 iNOS (-/-)	-78,60	4,830	Ja	**
APP/PS1 vs APP/PS1 L-NIL [8 mg/l]	-56,92	3,675	Nein	ns
APP/PS1 iNOS (-/-) vs APP/PS1 L-NIL [8 mg/l]	21,68	1,309	Nein	ns

Suppl. Tabelle 11: Langzeitpotenzierung - „ANOVA“, „Bartlett’s test for equal variances“ und „Turkey’s Multiple Comparison Test“ der prozentualen Steigungsänderung 10 Minuten nach Induktion				
"One-way analysis of variance (ANOVA)"				
p-Wert				0,0001
p-Wert				***
p-Wert < 0,05				Ja
Anzahl Gruppen				4
F-Wert				8,759
R ²				0,3906
„Bartlett’s test for equal variances“				
Bartlett’s Statistik (korrigiert)				11,08
p-Wert				0,0113
p-Wert Zusammenfassung				*
p-Wert < 0,05				Ja
ANOVA Tabelle		Σ^2	FG	MW ²
Treatmentvarianz		37.540	3	12.510
Fehlervarianz		58.570	41	1.429
Gesamtvarianz		96.110	44	
"Tukey’s Multiple Comparison Test"	MW Differenz	q	p-Wert < 0,05?	Zusammenfassung
WT vs APP/PS1	71,84	6,772	Ja	***
WT vs APP/PS1 iNOS (-/-)	15,91	1,324	Nein	ns
WT vs APP/PS1 L-NIL [8 mg/l]	27,51	2,356	Nein	ns
APP/PS1 vs APP/PS1 iNOS (-/-)	-55,93	4,964	Ja	**
APP/PS1 vs APP/PS1 L-NIL [8 mg/l]	-44,33	4,063	Ja	*
APP/PS1 iNOS (-/-) vs APP/PS1 L-NIL [8 mg/l]	11,60	0,9447	Nein	ns

Suppl. Tabelle 12: Langzeitpotenzierung - „ANOVA“, „Bartlett’s test for equal variances“ und „Turkey’s Multiple Comparison Test“ der prozentualen Steigungsänderung 60 Minuten nach Induktion				
"One-way analysis of variance (ANOVA)"				
p-Wert				0,0003
p-Wert				***
p-Wert < 0,05				Ja
Anzahl Gruppen				4
F-Wert				7,758
R ²				0,3678
„Bartlett’s test for equal variances“				
Bartlett’s Statistik (korrigiert)				0,3178
p-Wert				0,9567
p-Wert Zusammenfassung				ns
p-Wert < 0,05				Nein
ANOVA Tabelle		Σ^2	FG	MW ²
Treatmentvarianz		41.100	3	13.700
Fehlervarianz		70.630	40	1.766
Gesamtvarianz		111.700	43	
"Tukey’s Multiple Comparison Test"	MW Differenz	q	p-Wert < 0,05?	Zusammenfassung
WT vs APP/PS1	76,57	6,492	Ja	***
WT vs APP/PS1 iNOS (-/-)	20,14	1,508	Nein	ns
WT vs APP/PS1 L-NIL [8 mg/l]	40,03	2,997	Nein	ns
APP/PS1 vs APP/PS1 iNOS (-/-)	-56,43	4,504	Ja	*
APP/PS1 vs APP/PS1 L-NIL [8 mg/l]	-36,54	2,917	Nein	ns
APP/PS1 iNOS (-/-) vs APP/PS1 L-NIL [8 mg/l]	19,89	1,420	Nein	ns

Suppl. Tabelle 13: A β -ELISA - „Student's t-test“, MW und SEM der APP/PS1 und APP/PS1 iNOS ^(-/) Tiere						
	Alter drei Monate			Alter zwölf Monate		
	APP/PS1	APP/PS1 iNOS ^(-/)	t-Test	APP/PS1	APP/PS1 iNOS ^(-/)	t-Test
Aβnorm	11	7	0,4735	10	8	0,0007
MW	1,000	1,016		1,000	0,5525	
SEM	0,1672	0,1387		0,09586	4,76	
Aβ1-40	8	4	0,4248	5	4	0,0339
MW	50,64	54,12		6,241	3,130	
SEM	11,05	11,76		0,9818	0,4539	
Aβ1-42	3	3	0,4333	5	4	0,0207
MW	643,0	608,3		3,989	2,407	
SEM	167,8	96,45		0,5138	0,2867	

Suppl. Tabelle 14: „Western blot“-Detektion von A β aus Homogenaten von APP/PS1-trangenen und APP/PS1-tg iNOS ^(-/) Tieren - „Paired two-tailed t-test“						
"Paired two-tailed t-test"						
p-Wert						0,0007
p-Wert Zusammenfassung						***
p-Wert < 0,05						Ja
n pro Gruppe						4
t-Wert						6,309
FG						6
APP/PS1	n = 4	MW:	1,0000	SEM:	0,05739	
APP/PS1 iNOS ^(-/)	n = 4	MW:	0,5673	SEM:	0,03754	
Quantifizierung der Unterschiede						
MW der Unterschiede						0,4327
95%-Konfidenz Intervall						0,2649 - 0,6005
R ²						0,8690

Suppl. Tabelle 15: (Immun)- histochemische Untersuchungen - „Student’s t-test“, MW und SEM der APP/PS1 und APP/PS1 iNOS^(-/-) Tiere

	<i>Hippocampus</i>			<i>Cortex</i>		
	APP/PS1	APP/PS1 iNOS ^(-/-)	t-Test	APP/PS1	APP/PS1 iNOS ^(-/-)	t-Test
Thioflavin (n)	53	77	0,0001	51	75	0,0001
MW	142,30	105,42		143,32	110,42	
SEM	6,51	4,76		6,21	4,45	
Abeta (n)	68	95	0,0786	82	116	< 0,0001
MW	6,92	5,88		7,44	5,14	
SEM	0,17	0,29		0,21	0,25	
GFAP (n)	23	34	0,4398	28	36	0,3963
MW	7,75	6,92		5,59	4,80	
SEM	0,75	0,75		0,80	0,47	
NeuN (n)	23	33	< 0,0001	28	37	< 0,0001
MW	8,98	14,35		6,28	11,57	
SEM	0,52	0,57		0,43	0,66	

Suppl. Tabelle 16: Immunhistochemische Detektion von A β (AK 2964) und CD11b - „ANOVA“, „Bartlett's test for equal variances“ und „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“ der <i>Hippocampi</i> APP/PS1-tg und APP/PS1 iNOS ^(-/-) Tiere				
"One-way analysis of variance (ANOVA)"				
p-Wert	< 0,0001			
p-Wert	***			
p-Wert < 0,05	Ja			
Anzahl Gruppen	6			
F-Wert	40,33			
R ²	0,8521			
„Bartlett's test for equal variances“				
Bartlett's Statistik (korrigiert)	35,98			
p-Wert	< 0,0001			
p-Wert Zusammenfassung	***			
p-Wert < 0,05	Ja			
ANOVA Tabelle		Σ^2	FG	MW ²
Treatmentvarianz		272,9	5	54,59
Fehlervarianz		47,38	35	1,354
Gesamtvarianz		320,3	40	
"Newman-Keuls Multiple Comparison Test"	MW Differenz	q	p-Wert < 0,05?	Zusammenfassung
APP/PS1 iNOS (-/-) A β vs APP/PS1 A β	-1,419	3,026	Ja	*
APP/PS1 CD11b vs APP/PS1 iNOS (-/-) CD11b	-0,1796	---	Nein	ns
APP/PS1 Colocalization vs APP/PS1 A β	-6,532	13,11	Ja	***
APP/PS1 Colocalization vs APP/PS1 iNOS (-/-) A β	-5,113	11,51	Ja	***
APP/PS1 Colocalization vs APP/PS1 iNOS (-/-) CD11b	-0,4152	0,9346	Nein	ns
APP/PS1 Colocalization vs APP/PS1 CD11b	-0,2356	---	Nein	ns
APP/PS1 Colocalization vs APP/PS1 iNOS (-/-) Colocalization	-0,05764	---	Nein	ns

APP/PS1 iNOS (-/-) Colocalization vs APP/PS1 A β	-6,475	13,80	Ja	***
APP/PS1 iNOS (-/-) Colocalization vs APP/PS1 iNOS (-/-) A β	-5,056	12,29	Ja	***
APP/PS1 iNOS (-/-) Colocalization vs APP/PS1 iNOS (-/-) CD11b	-0,3576	---	Nein	ns
APP/PS1 iNOS (-/-) Colocalization vs APP/PS1 CD11b	-0,1780	---	Nein	ns
APP/PS1 CD11b vs APP/PS1 A β	-6,297	12,64	Ja	***
APP/PS1 CD11b vs APP/PS1 iNOS (-/-) A β	-4,878	10,98	Ja	***
APP/PS1 iNOS (-/-) CD11b vs APP/PS1 A β	-6,117	13,04	Ja	***
APP/PS1 iNOS (-/-) CD11b vs APP/PS1 iNOS (-/-) A β	-4,698	11,42	Ja	***

Suppl. Tabelle 17: Immunhistochemische Detektion von A β (AK 2964) und CD11b - „ANOVA“, „Bartlett’s test for equal variances“ und „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“ der Cortices APP/PS1-tg und APP/PS1 iNOS ^(-/-) Tiere				
"One-way analysis of variance (ANOVA)"				
p-Wert	< 0,0001			
p-Wert Zusammenfassung	***			
p-Wert < 0,05	Ja			
Anzahl Gruppen	6			
F-Wert	47,49			
R ²	0,8684			
„Bartlett’s test for equal variances“				
Bartlett’s Statistik (korrigiert)	39,74			
p-Wert	< 0,0001			
p-Wert Zusammenfassung	***			
p-Wert < 0,05	Ja			
ANOVA Tabelle		Σ^2	FG	MW ²
Treatmentvarianz		269,9	5	53,98
Fehlervarianz		40,92	36	1,137
Gesamtvarianz		310,8	41	
"Newman-Keuls Multiple Comparison Test"	MW Differenz	q	p-Wert < 0,05?	Zusammenfassung
APP/PS1 A β vs APP/PS1 iNOS (-/-) A β	-2,299	5,646	Ja	***
APP/PS1 CD11b vs APP/PS1 iNOS (-/-) CD11b	-0,07900	---	Nein	ns
APP/PS1 Colocalization vs APP/PS1 A β	-6,551	15,05	Ja	***
APP/PS1 Colocalization vs APP/PS1 iNOS (-/-) A β	-4,252	10,44	Ja	***
APP/PS1 Colocalization vs APP/PS1 CD11b	-0,2583	---	Nein	ns
APP/PS1 Colocalization vs APP/PS1 iNOS (-/-) CD11b	-0,1793	---	Nein	ns
APP/PS1 iNOS (-/-) Colocalization vs APP/PS1 A β	-6,741	16,56	Ja	***

APP/PS1 iNOS (-/-) Colocalization vs APP/PS1 iNOS (-/-) A β	-4,442	11,79	Ja	***
APP/PS1 iNOS (-/-) Colocalization vs APP/PS1 CD11b	-0,4484	1,101	Nein	ns
APP/PS1 iNOS (-/-) Colocalization vs APP/PS1 iNOS (-/-) CD11b	-0,3694	---	Nein	ns
APP/PS1 iNOS (-/-) Colocalization vs APP/PS1 Colocalization	-0,1900	---	Nein	ns
APP/PS1 iNOS (-/-) CD11b vs APP/PS1 A β	-6,371	15,65	Ja	***
APP/PS1 iNOS (-/-) CD11b vs APP/PS1 iNOS (-/-) A β	-4,073	10,81	Ja	***
APP/PS1 CD11b vs APP/PS1 A β	-6,292	14,46	Ja	***
APP/PS1 CD11b vs APP/PS1 iNOS (-/-) A β	-3,994	9,810	Ja	***

Suppl. Tabelle 18: Phagozytose primärer Mikroglia aus WT und iNOS ^(-/-) Tieren - „Paired two-tailed t-test“	
"Paired two-tailed t-test"	
p-Wert	0,1657
p-Wert Zusammenfassung	ns
p-Wert < 0,05	Nein
n Paare	6
t-Wert	1,622
FG	5
Quantifizierung der Unterschiede	
MW der Unterschiede	0,5589
95%-Konfidenz Intervall	-0,3269 - 1,445
R ²	0,3448

Suppl. Tabelle 19: Phagozytose primärer Mikroglia bei verschiedenen Stimuli - „ANOVA“ und „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“				
"One-way analysis of variance (ANOVA)"				
p-Wert	< 0,0001			
p-Wert	***			
p-Wert < 0,05	Ja			
Anzahl Gruppen	5			
F-Wert	54,56			
R ²	0,9356			
ANOVA Tabelle	Σ^2	FG	MW ²	
Treatmentvarianz	16.710.000	4	4.177.000	
Fehlervarianz	1.150.000	15	76.690	
Gesamtvarianz	17.860.000	19		
"Newman-Keuls Multiple Comparison Test"	MW Differenz	q	p-Wert < 0,05?	Zusammenfassung
Cyt. D vs A β	-2414	17,43	Ja	***
Cyt. D vs Control	-2305	16,64	Ja	***
Cyt. D vs SNAP	-2207	15,94	Ja	***
Cyt. D vs L-NIL	-2177	15,72	Ja	***
L-NIL vs A β	-237,5	1,715	Nein	ns
L-NIL vs Control	-128,0	---	Nein	ns
L-NIL vs SNAP	-30,50	---	Nein	ns
SNAP vs A β	-207,0	---	Nein	ns
SNAP vs Control	-97,50	---	Nein	ns
Control vs A β	-109,5	---	Nein	ns

Suppl. Tabelle 20: Für Immunpräzipitationen synaptosomaler Proteine verwendete Antikörper				
Zielprotein	Wirtsspezies	C _{WB}	Molekulargewicht	Hersteller
Arc	Kaninchen polyklonal	1:500	25 kDa	Cayman Chemicals
CamK II	Kaninchen polyklonal	1:200	52 kDa	Santa Cruz Biotechnology
Erk2 (MAPK 1)	Kaninchen polyklonal	1:200	42 kDa (Erk1 ~44 kDa)	Santa Cruz Biotechnology
JNK1	Kaninchen polyklonal	1:200	46/54 kDa (zwei Isoformen)	Santa Cruz Biotechnology
NMDA-R1	Maus monoklonal	1:1000	116 kDa	Synaptic Systems
NMDA-R2A/B	Kaninchen polyklonal	1:200	165/ 170 kDa	Chemicon
NMDA-R3B	Kaninchen polyklonal	1:400	115 kDa	Abcam Inc.
PKC	Maus monoklonal	1:1000	80-82 kDa	Calbiochem
PSD95	Kaninchen polyklonal	1:1000	95 kDa	Cell Signalling Technologies
Synaptobrevin 2 (VAMP 2)	Maus monoklonal	1:10.000	18 kDa (11-13 kDa)	Synaptic Systems
Synapsin I	Maus IgG	1:25.000	80 kDa	BD Transduction Labs
Syntaxin	Maus monoklonal	1:1000	35 kDa	Sigma-Aldrich
Synaptophysin	Maus monoklonal	1:350	38-48 kDa	Chemicon
Synaptotagmin	Kaninchen polyklonal	1:1000	65 kDa	Sigma-Aldrich
VAMP-1/2/3	Ziege polyklonal	1:200	18 kDa	Santa Cruz Biotechnology
Abcam Inc. (Cambridge, U.S.A.) BD Transduction Labs (Heidelberg) Calbiochem (via Merck KGaA, Darmstadt) Cayman Chemical (Ann Arbor, U.S.A.) Cell Signalling Technologies (Danvers, U.S.A.) Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg) Sigma-Aldrich (Steinheim) Synaptic Systems (Göttingen)				

Danksagung

Zunächst möchte ich Professor Michael Heneka für das spannende und interessante Thema meiner Doktorarbeit und Professor Dieter Fürst für die Beurteilung meiner Dissertation danken.

Zudem gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe: Dr. Markus Kummer für die Analyse der A β -Level sowie der Enzymaktivitäten, Dr. Dick Terwel für Rat und Tat bei der Anfertigung und Auswertung der histologischen Präparate, Dr. Thea Hammerschmidt für die LTP-Messungen meiner Tiere sowie Marc Weberpals, Ilka Wolff, Claudia Hülsmann, Marianne Clermont-Timmer, Elke Hoffmann, Annika Krause, Marius Krauthausen und Steffi Schwarz für die jederzeit hervorragende Zusammenarbeit und Unterstützung.

Ebenso dankbar bin ich Prof. Dr. Simone König für die Maldi-TOF-MS sowie Prof. Dr. Wolfram S. Kunz und Dr. Alexei P. Kudin für die Aktivitätsbestimmung synaptosomaler Mitochondrien.

Auch den Gästen unserer Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Beatriz Gomez Perez-Nieva und Dr. Alessio Papi, sei herzlich gedankt für schöne gemeinsame Zeit im Labor und außerhalb.

Nicht unerwähnt lassen möchte ich auch die wertvollen Freundschaften -beruflich wie privat-, die ich im Laufe der Zeit schließen beziehungsweise vertiefen durfte: Vielen Dank Nico Dankbar für die Vermittlung des „Erstkontakts“, die aufbauenden Gespräche und die Aushilfe in mancher Notlage, Dr. Lutz Haalck für die ansteckende, allzeit gute Laune und das entgegengebrachte Verständnis, wenn es mal nicht so „lief“, Dr. Michele Boiani für die geschätzten Ratschläge und insbesondere auch die außer-projektmäßige Hilfe, der gesamten Arbeitsgruppe de Cola (insbesondere Dr. Asgeir Konradsson, Dr. Michael Busby und Dr. Sandra Fibikar) für die nette „Integration“, Insa Waßmus für die Unterstützung und die Gesellschaft im „Kreuzgang“.

Ebenso möchte ich Mike Vellmanns, Simone Andrée, Dr. Christine Künzl, Dr. Ingo Rath und Dr. Burkhard Breuer der *proinnovera* GmbH danken, die mich in der Zeit der Anfertigung der Dissertationsschrift so nachhaltig unterstützt haben. Auch den Leuten, die sich Zeit genommen haben, ebendiese kritisch unter die Lupe zu nehmen -Dr. Uwe Leimer, Dr. Lars Tatenhorst, Dr. Dr. Marie-Pierre Manitz, Dr. Pia Nutt,

Dr. Alexander Ludwig, Marc Roller, Valerie Schmitt sowie der Familie Kirchner- sei herzlich gedankt.

„Last, but not least“ sei meiner Familie gedankt, sowohl meinen Eltern und meinem Bruder für die Unterstützung all die Jahre, als auch insbesondere meiner Frau Maria und meinen drei Töchtern Marie, Joana und Annika daheim für all die Geduld und das entgegengebrachte Verständnis, wenn mal wieder keine Zeit zum Spielen oder für gemeinsame Wochenenden blieb. Ich gelobe hiermit Besserung.

Ihnen und Euch allen herzlichen Dank!

Literatur

F Acquati, Accarino, M, Nucci, C, Fumagalli, P, Jovine, L, Ottolenghi, S, Taramelli, R, 2000. The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region. *FEBS Lett* 468, 59-64.

GP Ahern, Klyachko, VA, Jackson, MB, 2002. cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci* 25, 510-517.

KT Akama, Albanese, C, Pestell, RG, Van Eldik, LJ, 1998. Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFkappaB-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5795-5800.

H Akiyama, Barger, S, Barnum, S, Bradt, B, Bauer, J, Cole, GM, Cooper, NR, Eikelenboom, P, Emmerling, M, Fiebich, BL, Finch, CE, Frautschy, S, Griffin, WS, Hampel, H, Hull, M, Landreth, G, Lue, L, Mrak, R, Mackenzie, IR, McGeer, PL, O'Banion, MK, Pachter, J, Pasinetti, G, Plata-Salaman, C, Rogers, J, Rydel, R, Shen, Y, Streit, W, Strohmeyer, R, Tooyoma, I, Van Muiswinkel, FL, Veerhuis, R, Walker, D, Webster, S, Wegrzyniak, B, Wenk, G, Wyss-Coray, T, 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21, 383-421.

H Akiyama, McGeer, PL, 1990. Brain microglia constitutively express beta-2 integrins. *J Neuroimmunol* 30, 81-93.

WK Alderton, Angell, AD, Craig, C, Dawson, J, Garvey, E, Moncada, S, Monkhouse, J, Rees, D, Russell, LJ, Russell, RJ, Schwartz, S, Waslidge, N, Knowles, RG, 2005. GW274150 and GW273629 are potent and highly selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 145, 301-312.

TM Allinson, Parkin, ET, Turner, AJ, Hooper, NM, 2003. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 74, 342-352.

AC Alonso, Zaidi, T, Grundke-Iqbal, I, Iqbal, K, 1994. Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5562-5566.

A Alzheimer, 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiat. Psych.-Gerichtl. Med.* 64, 146-148.

K Ancolio, Dumanchin, C, Barelli, H, Warter, JM, Brice, A, Campion, D, Frebourg, T, Checler, F, 1999. Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4119-4124.

B Anliker, Muller, U, 2006. The functions of mammalian amyloid precursor protein and related amyloid precursor-like proteins. *Neurodegener Dis* 3, 239-246.

GW Arendash, King, DL, Gordon, MN, Morgan, D, Hatcher, JM, Hope, CE, Diamond, DM, 2001. Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain Res* 891, 42-53.

Z Arvanitakis, 2010. Update on frontotemporal dementia. *Neurologist* 16, 16-22.

BJ Bacskai, Kajdasz, ST, Christie, RH, Carter, C, Games, D, Seubert, P, Schenk, D, Hyman, BT, 2001. Imaging of amyloid-beta deposits in brains of living mice permits direct observation of clearance of plaques with immunotherapy. *Nat Med* 7, 369-372.

M Baggiolini, 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565-568.

M Baggiolini, Dewald, B, Moser, B, 1997. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15, 675-705.

MA Baltrons, Pedraza, C, Sardon, T, Navarra, M, Garcia, A, 2003. Regulation of NO-dependent cyclic GMP formation by inflammatory agents in neural cells. *Toxicol Lett* 139, 191-198.

F Bard, Cannon, C, Barbour, R, Burke, RL, Games, D, Grajeda, H, Guido, T, Hu, K, Huang, J, Johnson-Wood, K, Khan, K, Kholodenko, D, Lee, M, Lieberburg, I, Motter, R, Nguyen, M, Soriano, F, Vasquez, N, Weiss, K, Welch, B, Seubert, P, Schenk, D, Yednock, T, 2000. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6, 916-919.

C Bate, Veerhuis, R, Eikelenboom, P, Williams, A, 2004. Microglia kill amyloid-beta1-42 damaged neurons by a CD14-dependent process. *Neuroreport* 15, 1427-1430.

MF Beal, 2000. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 23, 298-304.

A Bender, Krishnan, KJ, Morris, CM, Taylor, GA, Reeve, AK, Perry, RH, Jaros, E, Hersheson, JS, Betts, J, Klopstock, T, Taylor, RW, Turnbull, DM, 2006. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* 38, 515-517.

RG Bennett, Hamel, FG, Duckworth, WC, 2000. Insulin inhibits the ubiquitin-dependent degrading activity of the 26S proteasome. *Endocrinology* 141, 2508-2517.

WC Benzing, Wujek, JR, Ward, EK, Shaffer, D, Ashe, KH, Younkin, SG, Brunden, KR, 1999. Evidence for glial-mediated inflammation in aged APP(SW) transgenic mice. *Neurobiol Aging* 20, 581-589.

F Berenbaum, 2010. Targeted therapies in osteoarthritis: a systematic review of the trials on www.clinicaltrials.gov. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24, 107-119.

BA Bergmans, Shariati, SA, Habets, RL, Verstreken, P, Schoonjans, L, Muller, U, Dotti, CG, De Strooper, B, 2010. Neurons Generated from APP/APLP1/APLP2 Triple Knockout Embryonic Stem Cells Behave Normally In Vitro and In Vivo: Lack of Evidence for a Cell Autonomous Role of APP in Neuronal Differentiation. *Stem Cells*.

L Bertram, Lill, CM, Tanzi, RE, 2010. The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron* 68, 270-281.

B Bindu, Rekha, J, Kutty, BM, 2005. Post insult enriched housing improves the 8-arm radial maze performance but not the Morris water maze task in ventral subicular lesioned rats. *Brain Res* 1063, 121-131.

D Blacker, Tanzi, RE, 1998. The genetics of Alzheimer disease: current status and future prospects. *Arch Neurol* 55, 294-296.

D Blacker, Wilcox, MA, Laird, NM, Rodes, L, Horvath, SM, Go, RC, Perry, R, Watson, B, Jr., Bassett, SS, McInnis, MG, Albert, MS, Hyman, BT, Tanzi, RE, 1998. Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 19, 357-360.

M Blacker, Noe, MC, Carty, TJ, Goodyer, CG, LeBlanc, AC, 2002. Effect of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) and metalloprotease inhibitor on amyloid precursor protein metabolism in human neurons. *J Neurochem* 83, 1349-1357.

MA Blom, van Twillert, MG, de Vries, SC, Engels, F, Finch, CE, Veerhuis, R, Eikelenboom, P, 1997. NSAIDS inhibit the IL-1 beta-induced IL-6 release from human post-mortem astrocytes: the involvement of prostaglandin E2. *Brain Res* 777, 210-218.

W Bondareff, Harrington, C, Wischik, CM, Hauser, DL, Roth, M, 1994. Immunohistochemical staging of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 53, 158-164.

DR Borchelt, Ratovitski, T, van Lare, J, Lee, MK, Gonzales, V, Jenkins, NA, Copeland, NG, Price, DL, Sisodia, SS, 1997. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 19, 939-945.

H Braak, Braak, E, 1991a. Morphological changes in the human cerebral cortex in dementia. *J Hirnforsch* 32, 277-282.

H Braak, Braak, E, 1991b. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-259.

H Braak, Braak, E, 1994. Morphological criteria for the recognition of Alzheimer's disease and the distribution pattern of cortical changes related to this disorder. *Neurobiol Aging* 15, 355-356; discussion 379-380.

H Braak, Braak, E, 1996. Development of Alzheimer-related neurofibrillary changes in the neocortex inversely recapitulates cortical myelogenesis. *Acta Neuropathol* 92, 197-201.

L Bracco, Piccini, C, Amaducci, L, 1998. Rate of progression of mental decline in Alzheimer disease: summary of European studies. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12, 347-355.

DS Brecht, Snyder, SH, 1989. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9030-9033.

T Breidert, Callebert, J, Heneka, MT, Landreth, G, Launay, JM, Hirsch, EC, 2002. Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 82, 615-624.

JP Brion, Couck, AM, Bruce, M, Anderton, B, Flament-Durand, J, 1991. Synaptophysin and chromogranin A immunoreactivities in senile plaques of Alzheimer's disease. *Brain Res* 539, 143-150.

JP Brion, Couck, AM, Passareiro, E, Flament-Durand, J, 1985. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J Submicrosc Cytol* 17, 89-96.

L Broom, Marinova-Mutafchieva, L, Sadeghian, M, Davis, JB, Medhurst, AD, Dexter, DT, Neuroprotection by selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson's. *Free Radic Biol Med*.

J Busciglio, Lorenzo, A, Yankner, BA, 1992. Methodological variables in the assessment of beta amyloid neurotoxicity. *Neurobiol Aging* 13, 609-612.

DA Butterfield, Reed, TT, Perluigi, M, De Marco, C, Coccia, R, Keller, JN, Markesbery, WR, Sultana, R, 2007. Elevated levels of 3-nitrotyrosine in brain from subjects with amnesic mild cognitive impairment: implications for the role of nitration in the progression of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1148, 243-248.

JD Buxbaum, Liu, KN, Luo, Y, Slack, JL, Stocking, KL, Peschon, JJ, Johnson, RS, Castner, BJ, Cerretti, DP, Black, RA, 1998. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273, 27765-27767.

XD Cai, Golde, TE, Younkin, SG, 1993. Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* 259, 514-516.

IE Camacho, Serneels, L, Spittaels, K, Merchiers, P, Dominguez, D, De Strooper, B, 2004. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma induces a clearance mechanism for the amyloid-beta peptide. *J Neurosci* 24, 10908-10917.

DS Cassarino, Bennett, JP, Jr., 1999. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev* 29, 1-25.

A Castegna, Thongboonkerd, V, Klein, JB, Lynn, B, Markesbery, WR, Butterfield, DA, 2003. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 85, 1394-1401.

F Chen, David, D, Ferrari, A, Gotz, J, 2004. Posttranslational modifications of tau--role in human tauopathies and modeling in transgenic animals. *Curr Drug Targets* 5, 503-515.

DH Cho, Nakamura, T, Fang, J, Cieplak, P, Godzik, A, Gu, Z, Lipton, SA, 2009. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* 324, 102-105.

YB Choi, Tenneti, L, Le, DA, Ortiz, J, Bai, G, Chen, HS, Lipton, SA, 2000. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci* 3, 15-21.

KK Chung, 2006. Say NO to neurodegeneration: role of S-nitrosylation in neurodegenerative disorders. *Neurosignals* 15, 307-313.

J Ciesielski-Treska, Ulrich, G, Taupenot, L, Chasserot-Golaz, S, Corti, A, Aunis, D, Bader, MF, 1998. Chromogranin A induces a neurotoxic phenotype in brain microglial cells. *J Biol Chem* 273, 14339-14346.

M Citron, Oltersdorf, T, Haass, C, McConlogue, L, Hung, AY, Seubert, P, Vigo-Pelfrey, C, Lieberburg, I, Selkoe, DJ, 1992. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 672-674.

M Citron, Westaway, D, Xia, W, Carlson, G, Diehl, T, Levesque, G, Johnson-Wood, K, Lee, M, Seubert, P, Davis, A, Kholodenko, D, Motter, R, Sherrington, R, Perry, B, Yao, H, Strome, R, Lieberburg, I, Rommens, J, Kim, S, Schenk, D, Fraser, P, St George Hyslop, P, Selkoe, DJ, 1997. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 3, 67-72.

CA Colton, Vitek, MP, Wink, DA, Xu, Q, Cantillana, V, Previti, ML, Van Nostrand, WE, Weinberg, JB, Dawson, H, 2006. NO synthase 2 (NOS2) deletion promotes multiple pathologies in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12867-12872.

CA Colton, Wilcock, DM, Wink, DA, Davis, J, Van Nostrand, WE, Vitek, MP, 2008. The effects of NOS2 gene deletion on mice expressing mutated human AbetaPP. *J Alzheimers Dis* 15, 571-587.

JA Corbett, McDaniel, ML, 1996. The Use of Aminoguanidine, a Selective iNOS Inhibitor, to Evaluate the Role of Nitric Oxide in the Development of Autoimmune Diabetes. *Methods* 10, 21-30.

CM Cordes, Bennett, RG, Siford, GL, Hamel, FG, 2009. Nitric oxide inhibits insulin-degrading enzyme activity and function through S-nitrosylation. *Biochem Pharmacol* 77, 1064-1073.

R D'Ambrosio, Maris, DO, Grady, MS, Winn, HR, Janigro, D, 1998. Selective loss of hippocampal long-term potentiation, but not depression, following fluid percussion injury. *Brain Res* 786, 64-79.

I Daigle, Li, C, 1993. *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 12045-12049.

B De Strooper, Saftig, P, Craessaerts, K, Vanderstichele, H, Guhde, G, Annaert, W, Von Figura, K, Van Leuven, F, 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391, 387-390.

B De Strooper, Simons, M, Multhaup, G, Van Leuven, F, Beyreuther, K, Dotti, CG, 1995. Production of intracellular amyloid-containing fragments in hippocampal neurons expressing human amyloid precursor protein and protection against amyloidogenesis by subtle amino acid substitutions in the rodent sequence. *EMBO J* 14, 4932-4938.

WF den Dunnen, Brouwer, WH, Bijlard, E, Kamphuis, J, van Linschoten, K, Eggens-Meijer, E, Holstege, G, 2008. No disease in the brain of a 115-year-old woman. *Neurobiol Aging* 29, 1127-1132.

AM Di Stasi, Mallozzi, C, Macchia, G, Petrucci, TC, Minetti, M, 1999. Peroxynitrite induces tyrosine nitration and modulates tyrosine phosphorylation of synaptic proteins. *J Neurochem* 73, 727-735.

TC Dickson, Saunders, HL, Vickers, JC, 1997. Relationship between apolipoprotein E and the amyloid deposits and dystrophic neurites of Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23, 483-491.

HF Dovey, Suomensaaari-Chrysler, S, Lieberburg, I, Sinha, S, Keim, PS, 1993. Cells with a familial Alzheimer's disease mutation produce authentic beta-peptide. *Neuroreport* 4, 1039-1042.

G Drewes, Trinczek, B, Illenberger, S, Biernat, J, Schmitt-Ulms, G, Meyer, HE, Mandelkow, EM, Mandelkow, E, 1995. Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J Biol Chem* 270, 7679-7688.

Y Du, Bales, KR, Dodel, RC, Liu, X, Glinn, MA, Horn, JW, Little, SP, Paul, SM, 1998. Alpha2-macroglobulin attenuates beta-amyloid peptide 1-40 fibril formation and associated neurotoxicity of cultured fetal rat cortical neurons. *J Neurochem* 70, 1182-1188.

RN Dubois, Abramson, SB, Crofford, L, Gupta, RA, Simon, LS, Van De Putte, LB, Lipsky, PE, 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12, 1063-1073.

YS Eisele, Bolmont, T, Heikenwalder, M, Langer, F, Jacobson, LH, Yan, ZX, Roth, K, Aguzzi, A, Staufenbiel, M, Walker, LC, Jucker, M, 2009. Induction of cerebral beta-amyloidosis: intracerebral versus systemic A β inoculation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12926-12931.

J El Khoury, Toft, M, Hickman, SE, Means, TK, Terada, K, Geula, C, Luster, AD, 2007. Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med* 13, 432-438.

T Enomoto, Ishibashi, T, Tokuda, K, Ishiyama, T, Toma, S, Ito, A, 2008. Lurasidone reverses MK-801-induced impairment of learning and memory in the Morris water maze and radial-arm maze tests in rats. *Behav Brain Res* 186, 197-207.

OV Evgenov, Pacher, P, Schmidt, PM, Hasko, G, Schmidt, HHHW, Stasch, J-P, 2006. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 5, 755-768.

F Fahrenholz, Postina, R, 2006. Alpha-secretase activation--an approach to Alzheimer's disease therapy. *Neurodegener Dis* 3, 255-261.

W Farris, Mansourian, S, Chang, Y, Lindsley, L, Eckman, EA, Frosch, MP, Eckman, CB, Tanzi, RE, Selkoe, DJ, Guenette, S, 2003. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4162-4167.

K Fassbender, Walter, S, Kuhl, S, Landmann, R, Ishii, K, Bertsch, T, Stalder, AK, Muehlhauser, F, Liu, Y, Ulmer, AJ, Rivest, S, Lentschat, A, Gulbins, E, Jucker, M, Staufenbiel, M, Brechtel, K, Walter, J, Multhaup, G, Penke, B, Adachi, Y, Hartmann, T, Beyreuther, K, 2004. The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J* 18, 203-205.

DL Feinstein, Galea, E, Gavrilyuk, V, Brosnan, CF, Whitacre, CC, Dumitrescu-Ozimek, L, Landreth, GE, Pershadsingh, HA, Weinberg, G, Heneka, MT, 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* 51, 694-702.

P Fernandez-Vizarra, Fernandez, AP, Castro-Blanco, S, Encinas, JM, Serrano, J, Bentura, ML, Munoz, P, Martinez-Murillo, R, Rodrigo, J, 2004. Expression of nitric oxide system in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 15, 287-305.

SH Ferris, Kluger, A, 1997. Assessing cognition in Alzheimer disease research. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 11 Suppl 6, 45-49.

JC Fiala, 2007. Mechanisms of amyloid plaque pathogenesis. *Acta Neuropathol* 114, 551-571.

JC Fiala, Feinberg, M, Peters, A, Barbas, H, 2007. Mitochondrial degeneration in dystrophic neurites of senile plaques may lead to extracellular deposition of fine filaments. *Brain Struct Funct* 212, 195-207.

BL Fiebich, Hull, M, Lieb, K, Gyufko, K, Berger, M, Bauer, J, 1997. Prostaglandin E2 induces interleukin-6 synthesis in human astrocytoma cells. *J Neurochem* 68, 704-709.

U Forstermann, Kleinert, H, 1995. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352, 351-364.

A Fossgreen, Bruckner, B, Czech, C, Masters, CL, Beyreuther, K, Paro, R, 1998. Transgenic Drosophila expressing human amyloid precursor protein show gamma-secretase activity and a blistered-wing phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13703-13708.

SA Frautschy, Yang, F, Irrizarry, M, Hyman, B, Saido, TC, Hsiao, K, Cole, GM, 1998. Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol* 152, 307-317.

M Fuhrmann, Bittner, T, Jung, CK, Burgold, S, Page, RM, Mitteregger, G, Haass, C, LaFerla, FM, Kretschmar, H, Herms, J, 2010. Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 13, 411-413.

H Fukumoto, Cheung, BS, Hyman, BT, Irizarry, MC, 2002. Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59, 1381-1389.

J Fung, Frost, D, Chakrabartty, A, McLaurin, J, 2004. Interaction of human and mouse Abeta peptides. *J Neurochem* 91, 1398-1403.

K Furukawa, Sopher, BL, Rydel, RE, Begley, JG, Pham, DG, Martin, GM, Fox, M, Mattson, MP, 1996. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem* 67, 1882-1896.

M Garcia-Alloza, Robbins, EM, Zhang-Nunes, SX, Purcell, SM, Betensky, RA, Raju, S, Prada, C, Greenberg, SM, Bacskai, BJ, Frosch, MP, 2006. Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiology of Disease* 24, 516-524.

J Garthwaite, Garthwaite, G, Palmer, RM, Moncada, S, 1989. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 172, 413-416.

EP Garvey, Oplinger, JA, Furfine, ES, Kiff, RJ, Laszlo, F, Whittle, BJ, Knowles, RG, 1997. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 272, 4959-4963.

DS Geldmacher, Whitehouse, PJ, Jr., 1997. Differential diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology* 48, S2-9.

BJ Gibb, Garthwaite, J, 2001. Subunits of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, expressed in rat brain. *Eur J Neurosci* 13, 539-544.

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

A Goate, Chartier-Harlin, MC, Mullan, M, Brown, J, Crawford, F, Fidani, L, Giuffra, L, Haynes, A, Irving, N, James, L, et al., 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.

M Goedert, Jakes, R, 2005. Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739, 240-250.

TE Golde, Estus, S, Usiak, M, Younkin, LH, Younkin, SG, 1990. Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron* 4, 253-267.

MN Gordon, King, DL, Diamond, DM, Jantzen, PT, Boyett, KV, Hope, CE, Hatcher, JM, DiCarlo, G, Gottschall, WP, Morgan, D, Arendash, GW, 2001. Correlation between cognitive deficits and Abeta deposits in transgenic APP+PS1 mice. *Neurobiol Aging* 22, 377-385.

WS Griffin, Sheng, JG, Royston, MC, Gentleman, SM, McKenzie, JE, Graham, DI, Roberts, GW, Mrak, RE, 1998. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol* 8, 65-72.

A Grudzien, Shaw, P, Weintraub, S, Bigio, E, Mash, DC, Mesulam, MM, 2007. Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 28, 327-335.

I Grundke-Iqbal, Iqbal, K, Tung, YC, Quinlan, M, Wisniewski, HM, Binder, LI, 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4913-4917.

Y Gu, Oyama, F, 1996. Tau Is Widely Expressed in Rat Tissues. *Journal of Neurochemistry* 67, 1235-1244.

JT Guo, Yu, J, Grass, D, de Beer, FC, Kindy, MS, 2002. Inflammation-dependent cerebral deposition of serum amyloid a protein in a mouse model of amyloidosis. *J Neurosci* 22, 5900-5909.

C Haass, Hung, AY, Schlossmacher, MG, Teplow, DB, Selkoe, DJ, 1993. beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* 268, 3021-3024.

C Haass, Hung, AY, Selkoe, DJ, Teplow, DB, 1994. Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem* 269, 17741-17748.

C Haass, Lemere, CA, Capell, A, Citron, M, Seubert, P, Schenk, D, Lannfelt, L, Selkoe, DJ, 1995. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med* 1, 1291-1296.

C Haass, Selkoe, DJ, 1993. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 75, 1039-1042.

C Haass, Selkoe, DJ, 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 101-112.

V Hampl, Bibova, J, Banasova, A, Uhlik, J, Mikova, D, Hnilickova, O, Lachmanova, V, Herget, J, 2006. Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L11-20.

C Hanisch, Konrad, K, Gunther, T, Herpertz-Dahlmann, B, 2004. Age-dependent neuropsychological deficits and effects of methylphenidate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: a comparison of pre- and grade-school children. *J Neural Transm* 111, 865-881.

UK Hanisch, Kettenmann, H, 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10, 1387-1394.

TT Hansel, Kharitonov, SA, Donnelly, LE, Erin, EM, Currie, MG, Moore, WM, Manning, PT, Recker, DP, Barnes, PJ, 2003. A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase inhibits exhaled breath nitric oxide in healthy volunteers and asthmatics. *FASEB J* 17, 1298-1300.

MR Hara, Agrawal, N, Kim, SF, Cascio, MB, Fujimuro, M, Ozeki, Y, Takahashi, M, Cheah, JH, Tankou, SK, Hester, LD, Ferris, CD, Hayward, SD, Snyder, SH, Sawa, A, 2005. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol* 7, 665-674.

J Hardy, 1997. The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis? *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2095-2097.

J Hardy, 2006. Amyloid double trouble. *Nat Genet* 38, 11-12.

JA Hardy, Higgins, GA, 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-185.

RD Hawkins, 1996. NO honey, I don't remember. *Neuron* 16, 465-467.

RD Hawkins, Son, H, Arancio, O, 1998. Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res* 118, 155-172.

W He, Barrow, CJ, 1999. The A beta 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. *Biochemistry* 38, 10871-10877.

S Heber, Herms, J, Gajic, V, Hainfellner, J, Aguzzi, A, Rulicke, T, von Kretschmar, H, von Koch, C, Sisodia, S, Tremml, P, Lipp, HP, Wolfer, DP, Muller, U, 2000. Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20, 7951-7963.

LE Hebert, Scherr, PA, Bienias, JL, Bennett, DA, Evans, DA, 2003. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol* 60, 1119-1122.

L Hendriks, Van Broeckhoven, C, 1996. A beta A4 amyloid precursor protein gene and Alzheimer's disease. *Eur J Biochem* 237, 6-15.

MT Heneka, Dumitrescu, L, Loschmann, PA, Wullner, U, Klockgether, T, 2000a. Temporal, regional, and cell-specific changes of iNOS expression after intrastriatal microinjection of interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Chem Neuroanat* 18, 167-179.

MT Heneka, Feinstein, DL, 2001. Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *J Neuroimmunol* 114, 8-18.

MT Heneka, Gavrilyuk, V, Landreth, GE, O'Banion, MK, Weinberg, G, Feinstein, DL, 2003. Noradrenergic depletion increases inflammatory responses in brain: effects on IkappaB and HSP70 expression. *J Neurochem* 85, 387-398.

MT Heneka, Klockgether, T, Feinstein, DL, 2000b. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce neuronal inducible nitric oxide synthase expression and cell death in vivo. *J Neurosci* 20, 6862-6867.

MT Heneka, Landreth, GE, 2007. PPARs in the brain. *Biochim Biophys Acta* 1771, 1031-1045.

MT Heneka, Loschmann, PA, Gleichmann, M, Weller, M, Schulz, JB, Wullner, U, Klockgether, T, 1998. Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor-alpha/lipopolysaccharide. *J Neurochem* 71, 88-94.

MT Heneka, O'Banion, MK, 2007. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 184, 69-91.

MT Heneka, Ramanathan, M, Jacobs, AH, Dumitrescu-Ozimek, L, Bilkei-Gorzo, A, Debeir, T, Sastre, M, Galldiks, N, Zimmer, A, Hoehn, M, Heiss, WD, Klockgether, T, Staufenbiel, M, 2006. Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J Neurosci* 26, 1343-1354.

MT Heneka, Sastre, M, Dumitrescu-Ozimek, L, Hanke, A, Dewachter, I, Kuiperi, C, O'Banion, K, Klockgether, T, Van Leuven, F, Landreth, GE, 2005. Acute treatment with the PPARgamma agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42 levels in APPV717I transgenic mice. *Brain* 128, 1442-1453.

MT Heneka, Sharp, A, Klockgether, T, Gavrilyuk, V, Feinstein, DL, 2000c. The heat shock response inhibits NF-kappaB activation, nitric oxide synthase type 2 expression, and macrophage/microglial activation in brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 800-811.

MT Heneka, Sharp, A, Murphy, P, Lyons, JA, Dumitrescu, L, Feinstein, DL, 2001a. The heat shock response reduces myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J Neurochem* 77, 568-579.

MT Heneka, Wiesinger, H, Dumitrescu-Ozimek, L, Riederer, P, Feinstein, DL, Klockgether, T, 2001b. Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 906-916.

J Herms, Anliker, B, Heber, S, Ring, S, Fuhrmann, M, Kretschmar, H, Sisodia, S, Muller, U, 2004. Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J* 23, 4106-4115.

GA Higgins, Jacobsen, H, 2003. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: phenotype and application. *Behav Pharmacol* 14, 419-438.

C Hilbich, Kisters-Woike, B, Reed, J, Masters, CL, Beyreuther, K, 1991. Human and rodent sequence analogs of Alzheimer's amyloid beta A4 share similar properties and can be solubilized in buffers of pH 7.4. *Eur J Biochem* 201, 61-69.

RM Hinson, Williams, JA, Shacter, E, 1996. Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4885-4890.

D Hirtz, Thurman, DJ, Gwinn-Hardy, K, Mohamed, M, Chaudhuri, AR, Zalutsky, R, 2007. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology* 68, 326-337.

H Hodges, 1996. Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Brain Res Cogn Brain Res* 3, 167-181.

LA Holcomb, Gordon, MN, Jantzen, P, Hsiao, K, Duff, K, Morgan, D, 1999. Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behav Genet* 29, 177-185.

M Hong, Zhukareva, V, Vogelsberg-Ragaglia, V, Wszolek, Z, Reed, L, Miller, BI, Geschwind, DH, Bird, TD, McKeel, D, Goate, A, Morris, JC, Wilhelmsen, KC, Schellenberg, GD, Trojanowski, JQ, Lee, VM, 1998. Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* 282, 1914-1917.

SJ Hopkins, Rothwell, NJ, 1995. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci* 18, 83-88.

DR Howlett, Jennings, KH, Lee, DC, Clark, MS, Brown, F, Wetzel, R, Wood, SJ, Camilleri, P, Roberts, GW, 1995. Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide. *Neurodegeneration* 4, 23-32.

Y Huang, 2010. Abeta-independent roles of apolipoprotein E4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 16, 287-294.

SR Hughes, Khorkova, O, Goyal, S, Knaeblein, J, Heroux, J, Riedel, NG, Sahasrabudhe, S, 1998. Alpha2-macroglobulin associates with beta-amyloid peptide and prevents fibril formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3275-3280.

I Hussain, Powell, D, Howlett, DR, Tew, DG, Meek, TD, Chapman, C, Gloger, IS, Murphy, KE, Southan, CD, Ryan, DM, Smith, TS, Simmons, DL, Walsh, FS, Dingwall, C, Christie, G, 1999. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* 14, 419-427.

M Hutton, Lendon, CL, Rizzu, P, Baker, M, Froelich, S, Houlden, H, Pickering-Brown, S, Chakraverty, S, Isaacs, A, Grover, A, Hackett, J, Adamson, J, Lincoln, S, Dickson, D, Davies, P, Petersen, RC, Stevens, M, de Graaff, E, Wauters, E, van Baren, J, Hillebrand, M, Joosse, M, Kwon, JM, Nowotny, P, Che, LK, Norton, J, Morris, JC, Reed, LA, Trojanowski, J, Basun, H, Lannfelt, L, Neystat, M, Fahn, S, Dark, F, Tannenberg, T, Dodd, PR, Hayward, N, Kwok, JB, Schofield, PR, Andreadis, A, Snowden, J, Craufurd, D, Neary, D, Owen, F, Oostra, BA, Hardy, J, Goate, A, van Swieten, J, Mann, D, Lynch, T, Heutink, P, 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702-705.

BA in t' Veld, Ruitenber, A, Hofman, A, Launer, LJ, van Duijn, CM, Stijnen, T, Breteler, MM, Stricker, BH, 2001. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 345, 1515-1521.

NC Inestrosa, Reyes, AE, Chacon, MA, Cerpa, W, Villalon, A, Montiel, J, Merabachvili, G, Aldunate, R, Bozinovic, F, Aboitiz, F, 2005. Human-like rodent amyloid-beta-peptide determines Alzheimer pathology in aged wild-type Octodon degu. *Neurobiol Aging* 26, 1023-1028.

K Iqbal, Alonso, AC, Gong, CX, Khatoon, S, Singh, TJ, Grundke-Iqbal, I, 1994. Mechanism of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 9, 119-123.

K Iqbal, Alonso Adel, C, Chen, S, Chohan, MO, El-Akkad, E, Gong, CX, Khatoon, S, Li, B, Liu, F, Rahman, A, Tanimukai, H, Grundke-Iqbal, I, 2005. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739, 198-210.

K Ishii, Muelhauser, F, Liebl, U, Picard, M, Kuhl, S, Penke, B, Bayer, T, Wiessler, M, Hennerici, M, Beyreuther, K, Hartmann, T, Fassbender, K, 2000. Subacute NO generation induced by Alzheimer's beta-amyloid in the living brain: reversal by inhibition of the inducible NO synthase. *FASEB J* 14, 1485-1489.

S Itagaki, McGeer, PL, Akiyama, H, Zhu, S, Selkoe, D, 1989. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol* 24, 173-182.

N Iwata, Tsubuki, S, Takaki, Y, Shirotani, K, Lu, B, Gerard, NP, Gerard, C, Hama, E, Lee, HJ, Saido, TC, 2001. Metabolic regulation of brain Aβ by neprilysin. *Science* 292, 1550-1552.

JL Jankowsky, Slunt, HH, Ratovitski, T, Jenkins, NA, Copeland, NG, Borchelt, DR, 2001. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng* 17, 157-165.

JL Jankowsky, Younkin, LH, Gonzales, V, Fadale, DJ, Slunt, HH, Lester, HA, Younkin, SG, Borchelt, DR, 2007. Rodent Aβ modulates the solubility and distribution of amyloid deposits in transgenic mice. *J Biol Chem* 282, 22707-22720.

C Janus, Westaway, D, 2001. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Physiology & Behavior* 73, 873-886.

H Kanemitsu, Tomiyama, T, Mori, H, 2003. Human neprilysin is capable of degrading amyloid β peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci Lett* 350, 113-116.

DE Kang, Pietrzik, CU, Baum, L, Chevallier, N, Merriam, DE, Kounnas, MZ, Wagner, SL, Troncoso, JC, Kawas, CH, Katzman, R, Koo, EH, 2000. Modulation of amyloid β-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J Clin Invest* 106, 1159-1166.

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

SC Kaul, Wadhwa, R, Matsuda, Y, Hensler, PJ, Pereira-Smith, OM, Komatsu, Y, Mitsui, Y, 1995. Mouse and human chromosomal assignments of mortalin, a novel member of the murine hsp70 family of proteins. *FEBS Lett* 361, 269-272.

J Kennedy, Kelner, GS, Kleyensteuber, S, Schall, TJ, Weiss, MC, Yssel, H, Schneider, PV, Cocks, BG, Bacon, KB, Zlotnik, A, 1995. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J Immunol* 155, 203-209.

J Kim, Basak, JM, Holtzman, DM, 2009. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 63, 287-303.

N Kitaguchi, Takahashi, Y, Tokushima, Y, Shiojiri, S, Ito, H, 1988. Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331, 530-532.

I Klyubin, Betts, V, Welzel, AT, Blennow, K, Zetterberg, H, Wallin, A, Lemere, CA, Cullen, WK, Peng, Y, Wisniewski, T, Selkoe, DJ, Anwyl, R, Walsh, DM, Rowan, MJ, 2008. Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J Neurosci* 28, 4231-4237.

H Koike, Tomioka, S, Sorimachi, H, Saido, TC, Maruyama, K, Okuyama, A, Fujisawa-Sehara, A, Ohno, S, Suzuki, K, Ishiura, S, 1999. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J* 343 Pt 2, 371-375.

MZ Kounnas, Moir, RD, Rebeck, GW, Bush, AI, Argraves, WS, Tanzi, RE, Hyman, BT, Strickland, DK, 1995. LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* 82, 331-340.

S Krishnaswamy, Verdile, G, Groth, D, Kanyenda, L, Martins, RN, 2009. The structure and function of Alzheimer's gamma secretase enzyme complex. *Crit Rev Clin Lab Sci* 46, 282-301.

MP Kummer, Heneka, MT, 2008. PPARs in Alzheimer's Disease. *PPAR Res* 2008.

MP Kummer, Hermes, M, Delekate, A, Hammerschmidt, T, Kumar, S, Terwel, D, Walter, J, Pape, HC, Koenig, S, Roeber, S, Jessen, F, Klockgether, T, Korte, M, Heneka, MT, 2011. Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid β aggregation and plaque formation. *Neuron* 71, 833-844.

R Lalonde, Kim, HD, Maxwell, JA, Fukuchi, K, 2005. Exploratory activity and spatial learning in 12-month-old APP(695)SWE/co+PS1/DeltaE9 mice with amyloid plaques. *Neurosci Lett* 390, 87-92.

S Lammich, Kojro, E, Postina, R, Gilbert, S, Pfeiffer, R, Jasionowski, M, Haass, C, Fahrenholz, F, 1999. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3922-3927.

GE Landreth, Heneka, MT, 2001. Anti-inflammatory actions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22, 937-944.

VE Laubach, Shesely, EG, Smithies, O, Sherman, PA, 1995. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10688-10692.

A Law, Gauthier, S, Quirion, R, 2001. Neuroprotective and neurorescuing effects of isoform-specific nitric oxide synthase inhibitors, nitric oxide scavenger, and antioxidant against beta-amyloid toxicity. *Br J Pharmacol* 133, 1114-1124.

A Ledo, Frade, J, Barbosa, RM, Laranjinha, J, 2004. Nitric oxide in brain: diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions. *Mol Aspects Med* 25, 75-89.

SC Lee, Zhao, ML, Hirano, A, Dickson, DW, 1999. Inducible nitric oxide synthase immunoreactivity in the Alzheimer disease hippocampus: association with Hirano bodies, neurofibrillary tangles, and senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 1163-1169.

VMY Lee, Trojanowski, JQ, 1999. Neurodegenerative Tauopathies: Human Disease and Transgenic Mouse Models. *Neuron* 24, 507-510.

MA Leissring, Farris, W, Chang, AY, Walsh, DM, Wu, X, Sun, X, Frosch, MP, Selkoe, DJ, 2003. Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 40, 1087-1093.

CA Lemere, Lopera, F, Kosik, KS, Lendon, CL, Ossa, J, Saido, TC, Yamaguchi, H, Ruiz, A, Martinez, A, Madrigal, L, Hincapie, L, Arango, JC, Anthony, DC, Koo, EH, Goate, AM, Selkoe, DJ, 1996. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med* 2, 1146-1150.

E Levy-Lahad, Bird, TD, 1996. Genetic factors in Alzheimer's disease: a review of recent advances. *Ann Neurol* 40, 829-840.

E Levy-Lahad, Wijsman, EM, Nemens, E, Anderson, L, Goddard, KA, Weber, JL, Bird, TD, Schellenberg, GD, 1995. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269, 970-973.

E Levy, Carman, MD, Fernandez-Madrid, IJ, Power, MD, Lieberburg, I, van Duinen, SG, Bots, GT, Luyendijk, W, Frangione, B, 1990. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 248, 1124-1126.

M Li, Chen, L, Lee, DH, Yu, LC, Zhang, Y, 2007. The role of intracellular amyloid beta in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 83, 131-139.

R Li, Lindholm, K, Yang, LB, Yue, X, Citron, M, Yan, R, Beach, T, Sue, L, Sabbagh, M, Cai, H, Wong, P, Price, D, Shen, Y, 2004. Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3632-3637.

Y Ling, Morgan, K, Kalsheker, N, 2003. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 1505-1535.

SA Lipton, 2007. Pathologically-activated therapeutics for neuroprotection: mechanism of NMDA receptor block by memantine and S-nitrosylation. *Curr Drug Targets* 8, 621-632.

SA Lipton, Choi, YB, Pan, ZH, Lei, SZ, Chen, HS, Sucher, NJ, Loscalzo, J, Singel, DJ, Stamler, JS, 1993. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364, 626-632.

SA Lipton, Choi, YB, Takahashi, H, Zhang, D, Li, W, Godzik, A, Bankston, LA, 2002. Cysteine regulation of protein function--as exemplified by NMDA-receptor modulation. *Trends Neurosci* 25, 474-480.

L Liu, Ikonen, S, Heikkinen, T, Heikkilä, M, Puoliväli, J, van Groen, T, Tanila, H, 2002. Effects of fimbria-fornix lesion and amyloid pathology on spatial learning and memory in transgenic APP+PS1 mice. *Behavioural Brain Research* 134, 433-445.

A Lleo, Waldron, E, von Arnim, CA, Herl, L, Tangredi, MM, Peltan, ID, Strickland, DK, Koo, EH, Hyman, BT, Pietrzik, CU, Berezovska, O, 2005. Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) interacts with presenilin 1 and is a competitive substrate of the amyloid precursor protein (APP) for gamma-secretase. *J Biol Chem* 280, 27303-27309.

A Lorenzo, Yankner, BA, 1994. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12243-12247.

HJ Luth, Munch, G, Arendt, T, 2002. Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation. *Brain Res* 953, 135-143.

T Maas, Eidenmuller, J, Brandt, R, 2000. Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *J Biol Chem* 275, 15733-15740.

T Malinski, Bailey, F, Zhang, ZG, Chopp, M, 1993. Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 13, 355-358.

DM Mann, Prinja, D, Davies, CA, Ihara, Y, Delacourte, A, Defossez, A, Mayer, RJ, Landon, M, 1989. Immunocytochemical profile of neurofibrillary tangles in Down's syndrome patients of different ages. *J Neurol Sci* 92, 247-260.

MA Marletta, 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 268, 12231-12234.

A Martinez, Portero-Otin, M, Pamplona, R, Ferrer, I, 2009. Protein Targets of Oxidative Damage in Human Neurodegenerative Diseases with Abnormal Protein Aggregates. *Brain Pathol.*

CL Masters, Multhaup, G, Simms, G, Pottgiesser, J, Martins, RN, Beyreuther, K, 1985. Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J* 4, 2757-2763.

MP Mattson, Barger, SW, Cheng, B, Lieberburg, I, Smith-Swintosky, VL, Rydel, RE, 1993. beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 16, 409-414.

MP Mattson, Guo, ZH, Geiger, JD, 1999. Secreted form of amyloid precursor protein enhances basal glucose and glutamate transport and protects against oxidative impairment of glucose and glutamate transport in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism. *J Neurochem* 73, 532-537.

EG McGeer, McGeer, PL, 1998. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. *Exp Gerontol* 33, 371-378.

PL McGeer, Klegeris, A, Walker, DG, Yasuhara, O, McGeer, EG, 1994. Pathological proteins in senile plaques. *Tohoku J Exp Med* 174, 269-277.

PL McGeer, McGeer, EG, 2002. The possible role of complement activation in Alzheimer disease. *Trends Mol Med* 8, 519-523.

PL McGeer, Rogers, J, 1992. Anti-inflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Neurology* 42, 447-449.

G Mehlhorn, Hollborn, M, Schliebs, R, 2000. Induction of cytokines in glial cells surrounding cortical beta-amyloid plaques in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer pathology. *Int J Dev Neurosci* 18, 423-431.

M Menendez-Gonzalez, Perez-Pinera, P, Martinez-Rivera, M, Calatayud, MT, Blazquez Menes, B, 2005. APP processing and the APP-KPI domain involvement in the amyloid cascade. *Neurodegener Dis* 2, 277-283.

A Merlos-Suarez, Fernandez-Larrea, J, Reddy, P, Baselga, J, Arribas, J, 1998. Pro-tumor necrosis factor-alpha processing activity is tightly controlled by a component that does not affect notch processing. *J Biol Chem* 273, 24955-24962.

A Meulemans, 1994. Diffusion coefficients and half-lives of nitric oxide and N-nitroso-L-arginine in rat cortex. *Neurosci Lett* 171, 89-93.

M Meyer-Luehmann, Coomaraswamy, J, Bolmont, T, Kaeser, S, Schaefer, C, Kilger, E, Neuenschwander, A, Abramowski, D, Frey, P, Jaton, AL, Vigouret, JM, Paganetti, P, Walsh, DM, Mathews, PM, Ghiso, J, Staufenbiel, M, Walker, LC, Jucker, M, 2006. Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* 313, 1781-1784.

H Meziane, Dodart, JC, Mathis, C, Little, S, Clemens, J, Paul, SM, Ungerer, A, 1998. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12683-12688.

N Miki, Kawabe, Y, Kuriyama, K, 1977. Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 75, 851-856.

DL Miller, Papayannopoulos, IA, Styles, J, Bobin, SA, Lin, YY, Biemann, K, Iqbal, K, 1993. Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* 301, 41-52.

EA Milward, Papadopoulos, R, Fuller, SJ, Moir, RD, Small, D, Beyreuther, K, Masters, CL, 1992. The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron* 9, 129-137.

D Minc-Golomb, Yadid, G, Tsarfaty, I, Resau, JH, Schwartz, JP, 1996. In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in cerebellar neurons. *J Neurochem* 66, 1504-1509.

D Moechars, Dewachter, I, Lorent, K, Reverse, D, Baekelandt, V, Naidu, A, Tesseur, I, Spittaels, K, Haute, CV, Checler, F, Godaux, E, Cordell, B, Van Leuven, F, 1999. Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem* 274, 6483-6492.

S Moncada, Higgs, EA, Hodson, HF, Knowles, RG, Lopez-Jaramillo, P, McCall, T, Palmer, RMJ, Radomski, MW, Rees, DD, Schulz, R, 1991. The L-Arginine: Nitric Oxide Pathway. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 17, S1‐S9.

AH Moore, O'Banion, MK, 2002. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 1627-1656.

WM Moore, Webber, RK, Fok, KF, Jerome, GM, Connor, JR, Manning, PT, Wyatt, PS, Misko, TP, Tjoeng, FS, Currie, MG, 1996. 2-Iminopiperidine and other 2-iminoazaheterocycles as potent inhibitors of human nitric oxide synthase isoforms. *J Med Chem* 39, 669-672.

WM Moore, Webber, RK, Jerome, GM, Tjoeng, FS, Misko, TP, Currie, MG, 1994. L-N6-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem* 37, 3886-3888.

PM Moran, Higgins, LS, Cordell, B, Moser, PC, 1995. Age-related learning deficits in transgenic mice expressing the 751-amino acid isoform of human beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5341-5345.

H Mori, Takio, K, Ogawara, M, Selkoe, DJ, 1992. Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 267, 17082-17086.

K Mori, Togashi, H, Ueno, KI, Matsumoto, M, Yoshioka, M, 2001. Aminoguanidine prevented the impairment of learning behavior and hippocampal long-term potentiation following transient cerebral ischemia. *Behav Brain Res* 120, 159-168.

RG Morris, 1989. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci* 9, 3040-3057.

M Mullan, Crawford, F, Axelman, K, Houlden, H, Lilius, L, Winblad, B, Lannfelt, L, 1992. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1, 345-347.

T Muller, Meyer, HE, Egensperger, R, Marcus, K, 2008. The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 85, 393-406.

U Muller, Cristina, N, Li, ZW, Wolfer, DP, Lipp, HP, Rulicke, T, Brandner, S, Aguzzi, A, Weissmann, C, 1994. Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Cell* 79, 755-765.

X Mungarro-Menchaca, Ferrera, P, Moran, J, Arias, C, 2002. beta-Amyloid peptide induces ultrastructural changes in synaptosomes and potentiates mitochondrial dysfunction in the presence of ryanodine. *J Neurosci Res* 68, 89-96.

CA Murray, Lynch, MA, 1998. Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. *J Neurosci* 18, 2974-2981.

RG Nagele, D'Andrea, MR, Lee, H, Venkataraman, V, Wang, HY, 2003. Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res* 971, 197-209.

T Nakamura, Lipton, SA, 2009. Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Apoptosis* 14, 455-468.

T Nakamura, Lipton, SA, 2010. Redox regulation of mitochondrial fission, protein misfolding, synaptic damage, and neuronal cell death: potential implications for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Apoptosis* 15, 1354-1363.

J Nalbantoglu, Tirado-Santiago, G, Lahsaini, A, Poirier, J, Goncalves, O, Verge, G, Momoli, F, Welner, SA, Massicotte, G, Julien, JP, Shapiro, ML, 1997. Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature* 387, 500-505.

M Narita, Holtzman, DM, Schwartz, AL, Bu, G, 1997. Alpha2-macroglobulin complexes with and mediates the endocytosis of beta-amyloid peptide via cell surface low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Neurochem* 69, 1904-1911.

C Nathan, Calingasan, N, Nezezon, J, Ding, A, Lucia, MS, La Perle, K, Fuortes, M, Lin, M, Ehrt, S, Kwon, NS, Chen, J, Vodovotz, Y, Kipiani, K, Beal, MF, 2005. Protection from Alzheimer's-like disease in the mouse by genetic ablation of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 202, 1163-1169.

B Nazer, Hong, S, Selkoe, DJ, 2008. LRP promotes endocytosis and degradation, but not transcytosis, of the amyloid-beta peptide in a blood-brain barrier in vitro model. *Neurobiol Dis* 30, 94-102.

RL Neve, Finch, EA, Dawes, LR, 1988. Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain. *Neuron* 1, 669-677.

I Nishimoto, Okamoto, T, Matsuura, Y, Takahashi, S, Murayama, Y, Ogata, E, 1993. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature* 362, 75-79.

MK O'Banion, 1999. COX-2 and Alzheimer's disease: potential roles in inflammation and neurodegeneration. *Expert Opin Investig Drugs* 8, 1521-1536.

MK O'Banion, Miller, JC, Chang, JW, Kaplan, MD, Coleman, PD, 1996. Interleukin-1 beta induces prostaglandin G/H synthase-2 (cyclooxygenase-2) in primary murine astrocyte cultures. *J Neurochem* 66, 2532-2540.

S Oddo, Vasilevko, V, Caccamo, A, Kitazawa, M, Cribbs, DH, LaFerla, FM, 2006. Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem* 281, 39413-39423.

MI Olson, Shaw, CM, 1969. Presenile dementia and Alzheimer's disease in mongolism. *Brain* 92, 147-156.

DS Olton, 1987. The radial arm maze as a tool in behavioral pharmacology. *Physiol Behav* 40, 793-797.

T Owens, Babcock, AA, Millward, JM, Toft-Hansen, H, 2005. Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS. *Brain Res Brain Res Rev* 48, 178-184.

R Pardossi-Piquard, Petit, A, Kawarai, T, Sunyach, C, Alves da Costa, C, Vincent, B, Ring, S, D'Adamio, L, Shen, J, Muller, U, St George Hyslop, P, Checler, F, 2005. Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46, 541-554.

J Perez-Tur, Wavrant-De Vrieze, F, Lambert, JC, Chartier-Harlin, MC, 1996. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. The Alzheimer's Study Group. *Lancet* 347, 1560-1561.

CJ Pike, Burdick, D, Walencewicz, AJ, Glabe, CG, Cotman, CW, 1993. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* 13, 1676-1687.

CJ Pike, Cummings, BJ, Cotman, CW, 1992. beta-Amyloid induces neuritic dystrophy in vitro: similarities with Alzheimer pathology. *Neuroreport* 3, 769-772.

SW Pimplikar, 2009. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 1261-1268.

NJ Pollock, Mirra, SS, Binder, LI, Hansen, LA, Wood, JG, 1986. Filamentous aggregates in Pick's disease, progressive supranuclear palsy, and Alzheimer's disease share antigenic determinants with microtubule-associated protein, tau. *Lancet* 2, 1211.

DL Price, Sisodia, SS, 1998. Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu Rev Neurosci* 21, 479-505.

DL Price, Sisodia, SS, Borchelt, DR, 1998. Alzheimer disease--when and why? *Nat Genet* 19, 314-316.

M Prince, Jackson, J, Ferri, CP, Sousa, R, Albanese, E, Ribeiro, WS, Honyashiki, M, 2009. World Alzheimer Report 2009. World Alzheimer Report.

J Puolivali, Wang, J, Heikkinen, T, Heikkila, M, Tapiola, T, van Groen, T, Tanila, H, 2002. Hippocampal A beta 42 levels correlate with spatial memory deficit in APP and PS1 double transgenic mice. *Neurobiol Dis* 9, 339-347.

WQ Qiu, Borth, W, Ye, Z, Haass, C, Teplow, DB, Selkoe, DJ, 1996. Degradation of amyloid beta-protein by a serine protease-alpha2-macroglobulin complex. *J Biol Chem* 271, 8443-8451.

WQ Qiu, Walsh, DM, Ye, Z, Vekrellis, K, Zhang, J, Podlisny, MB, Rosner, MR, Safavi, A, Hersh, LB, Selkoe, DJ, 1998. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem* 273, 32730-32738.

HW Querfurth, LaFerla, FM, 2010. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362, 329-344.

RJ Quigg, 2002. Use of complement inhibitors in tissue injury. *Trends Mol Med* 8, 430-436.

AD Randall, Witton, J, Booth, C, Hynes-Allen, A, Brown, JT, 2010. The functional neurophysiology of the amyloid precursor protein (APP) processing pathway. *Neuropharmacology*.

RM Ransohoff, 2009. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity* 31, 711-721.

GW Rebeck, Harr, SD, Strickland, DK, Hyman, BT, 1995. Multiple, diverse senile plaque-associated proteins are ligands of an apolipoprotein E receptor, the alpha 2-macroglobulin receptor/low-density-lipoprotein receptor-related protein. *Ann Neurol* 37, 211-217.

PH Reddy, Beal, MF, 2008. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 14, 45-53.

PH Reddy, Reddy, TP, Manczak, M, Calkins, MJ, Shirendeb, U, Mao, P, 2010. Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*.

B Reisberg, 1996. Behavioral intervention approaches to the treatment and management of Alzheimer's disease: a research agenda. *Int Psychogeriatr* 8 Suppl 1, 38-44.

RS Reiserer, Harrison, FE, Syverud, DC, McDonald, MP, 2007. Impaired spatial learning in the APPSwe + PSEN1DeltaE9 bigenic mouse model of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav* 6, 54-65.

JF Reyes, Reynolds, MR, Horowitz, PM, Fu, Y, Guillozet-Bongaarts, AL, Berry, R, Binder, LI, 2008. A possible link between astrocyte activation and tau nitration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 31, 198-208.

MR Reynolds, Berry, RW, Binder, LI, 2005. Site-specific nitration and oxidative dityrosine bridging of the tau protein by peroxynitrite: implications for Alzheimer's disease. *Biochemistry* 44, 1690-1700.

M Ricote, Li, AC, Willson, TM, Kelly, CJ, Glass, CK, 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391, 79-82.

IM Riederer, Schiffrin, M, Kovari, E, Bouras, C, Riederer, BM, 2009. Ubiquitination and cysteine nitrosylation during aging and Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 80, 233-241.

WA Rocca, Hofman, A, Brayne, C, Breteler, MM, Clarke, M, Copeland, JR, Dartigues, JF, Engedal, K, Hagnell, O, Heeren, TJ, et al., 1991. The prevalence of vascular dementia in Europe: facts and fragments from 1980-1990 studies. EURODEM-Prevalence Research Group. *Ann Neurol* 30, 817-824.

JJ Rodriguez, Olabarria, M, Chvatal, A, Verkhatsky, A, 2009. Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ* 16, 378-385.

EI Rogaev, Sherrington, R, Rogaeva, EA, Levesque, G, Ikeda, M, Liang, Y, Chi, H, Lin, C, Holman, K, Tsuda, T, et al., 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376, 775-778.

J Rogers, Cooper, NR, Webster, S, Schultz, J, McGeer, PL, Styren, SD, Civin, WH, Brachova, L, Bradt, B, Ward, P, et al., 1992. Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10016-10020.

M Roghani, Becherer, JD, Moss, ML, Atherton, RE, Erdjument-Bromage, H, Arribas, J, Blackburn, RK, Weskamp, G, Tempst, P, Blobel, CP, 1999. Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem* 274, 3531-3540.

AE Roher, Lowenson, JD, Clarke, S, Woods, AS, Cotter, RJ, Gowing, E, Ball, MJ, 1993a. beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10836-10840.

AE Roher, Palmer, KC, Yurewicz, EC, Ball, MJ, Greenberg, BD, 1993b. Morphological and biochemical analyses of amyloid plaque core proteins purified from Alzheimer disease brain tissue. *J Neurochem* 61, 1916-1926.

DR Rosen, Martin-Morris, L, Luo, LQ, White, K, 1989. A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2478-2482.

A Rot, von Andrian, UH, 2004. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 22, 891-928.

JM Rozemuller, Eikelenboom, P, Pals, ST, Stam, FC, 1989. Microglial cells around amyloid plaques in Alzheimer's disease express leucocyte adhesion molecules of the LFA-1 family. *Neurosci Lett* 101, 288-292.

T Saitoh, Sundsmo, M, Roch, JM, Kimura, N, Cole, G, Schubert, D, Oltersdorf, T, Schenk, DB, 1989. Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* 58, 615-622.

K Santacruz, Lewis, J, Spires, T, Paulson, J, Kotilinek, L, Ingelsson, M, Guimaraes, A, DeTure, M, Ramsden, M, McGowan, E, Forster, C, Yue, M, Orne, J, Janus, C, Mariash, A, Kuskowski, M, Hyman, B, Hutton, M, Ashe, KH, 2005. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309, 476-481.

A Santoso, 2006. Cell proliferation and cell survival in the dentate gyrus of adult mice under naturalistic conditions. *Ludwig-Maximilians-Universität München*.

T Sardon, Baltrons, MA, Garcia, A, 2004. Nitric oxide-dependent and independent down-regulation of NO-sensitive guanylyl cyclase in neural cells. *Toxicol Lett* 149, 75-83.

M Sastre, Dewachter, I, Landreth, GE, Willson, TM, Klockgether, T, van Leuven, F, Heneka, MT, 2003. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase. *J Neurosci* 23, 9796-9804.

S Sato, Kamino, K, Miki, T, Doi, A, Ii, K, St George-Hyslop, PH, Ogihara, T, Sakaki, Y, 1998. Splicing mutation of presenilin-1 gene for early-onset familial Alzheimer's disease. *Hum Mutat Suppl* 1, S91-94.

AJ Saunders, Kim, T-W, Tanzi, RE, 1999. BACE Maps to Chromosome 11 and a BACE Homolog, BACE2, Reside in the Obligate Down Syndrome Region of Chromosome 21. *Science* 286, 1255.

GD Schellenberg, Bird, TD, Wijsman, EM, Orr, HT, Anderson, L, Nemens, E, White, JA, Bonnycastle, L, Weber, JL, Alonso, ME, et al., 1992. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258, 668-671.

D Schenk, Barbour, R, Dunn, W, Gordon, G, Grajeda, H, Guido, T, Hu, K, Huang, J, Johnson-Wood, K, Khan, K, Kholodenko, D, Lee, M, Liao, Z, Lieberburg, I, Motter, R, Mutter, L, Soriano, F, Shopp, G, Vasquez, N, Vandeventer, C, Walker, S, Wogulis, M, Yednock, T, Games, D, Seubert, P, 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173-177.

D Scheuner, Eckman, C, Jensen, M, Song, X, Citron, M, Suzuki, N, Bird, TD, Hardy, J, Hutton, M, Kukull, W, Larson, E, Levy-Lahad, E, Viitanen, M, Peskind, E, Poorkaj, P, Schellenberg, G, Tanzi, R, Wasco, W, Lannfelt, L, Selkoe, D, Younkin, S, 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2, 864-870.

S Schilling, Zeitschel, U, Hoffmann, T, Heiser, U, Francke, M, Kehlen, A, Holzer, M, Hutter-Paier, B, Prokesch, M, Windisch, M, Jagla, W, Schlenzig, D, Lindner, C, Rudolph, T, Reuter, G, Cynis, H, Montag, D, Demuth, HU, Rossner, S, 2008. Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Abeta and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Med* 14, 1106-1111.

DE Schmechel, Saunders, AM, Strittmatter, WJ, Crain, BJ, Hulette, CM, Joo, SH, Pericak-Vance, MA, Goldgaber, D, Roses, AD, 1993. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9649-9653.

EM Schuman, Madison, DV, 1991. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254, 1503-1506.

DJ Selkoe, 1989. Molecular pathology of amyloidogenic proteins and the role of vascular amyloidosis in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 10, 387-395.

DJ Selkoe, 1998. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8, 447-453.

DJ Selkoe, 2008. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res* 192, 106-113.

P Seubert, Vigo-Pelfrey, C, Esch, F, Lee, M, Dovey, H, Davis, D, Sinha, S, Schlossmacher, M, Whaley, J, Swindlehurst, C, et al., 1992. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359, 325-327.

Y Shan, Napoli, E, Cortopassi, G, 2007. Mitochondrial frataxin interacts with ISD11 of the NFS1/ISCU complex and multiple mitochondrial chaperones. *Hum Mol Genet* 16, 929-941.

AW Shaw, Vosper, AJ, 1977. Solubility of nitric oxide in aqueous and nonaqueous solvents. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* 73, 1239-1244.

C Shepherd, McCann, H, Halliday, GM, 2009. Variations in the neuropathology of familial Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 118, 37-52.

R Sherrington, Rogaev, EI, Liang, Y, Rogaeva, EA, Levesque, G, Ikeda, M, Chi, H, Lin, C, Li, G, Holman, K, et al., 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.

M Shoji, Golde, TE, Ghiso, J, Cheung, TT, Estus, S, Shaffer, LM, Cai, XD, McKay, DM, Tintner, R, Frangione, B, et al., 1992. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258, 126-129.

S Sinha, Anderson, JP, Barbour, R, Basi, GS, Caccavello, R, Davis, D, Doan, M, Dovey, HF, Frigon, N, Hong, J, Jacobson-Croak, K, Jewett, N, Keim, P, Knops, J, Lieberburg, I, Power, M, Tan, H, Tatsuno, G, Tung, J, Schenk, D, Seubert, P, Suomensaaari, SM, Wang, S, Walker, D, Zhao, J, McConlogue, L, John, V, 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402, 537-540.

SS Sisodia, Koo, EH, Beyreuther, K, Unterbeck, A, Price, DL, 1990. Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* 248, 492-495.

MA Smith, Richey Harris, PL, Sayre, LM, Beckman, JS, Perry, G, 1997. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 17, 2653-2657.

SW Snyder, Wang, GT, Barrett, L, Lador, US, Casuto, D, Lee, CM, Krafft, GA, Holzman, RB, Holzman, TF, 1994. Complement C1q does not bind monomeric beta-amyloid. *Exp Neurol* 128, 136-142.

S Sorbi, Forleo, P, Tedde, A, Cellini, E, Ciantelli, M, Bagnoli, S, Nacmias, B, 2001. Genetic risk factors in familial Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 122, 1951-1960.

JM Souza, Peluffo, G, Radi, R, 2008. Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker? *Free Radic Biol Med* 45, 357-366.

MG Spillantini, Goedert, M, 1998. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 21, 428-433.

CA Sprecher, Grant, FJ, Grimm, G, O'Hara, PJ, Norris, F, Norris, K, Foster, DC, 1993. Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry* 32, 4481-4486.

PH St George-Hyslop, 2000. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry* 47, 183-199.

H Steiner, Capell, A, Leimer, U, Haass, C, 1999a. Genes and mechanisms involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249, 266-270.

H Steiner, Romig, H, Pesold, B, Philipp, U, Baader, M, Citron, M, Loetscher, H, Jacobsen, H, Haass, C, 1999b. Amyloidogenic function of the Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in the absence of endoproteolysis. *Biochemistry* 38, 14600-14605.

A Stephan, Mateos, JM, Kozlov, SV, Cinelli, P, Kistler, AD, Hettwer, S, Rulicke, T, Streit, P, Kunz, B, Sonderegger, P, 2008. Neurotrypsin cleaves agrin locally at the synapse. *FASEB J* 22, 1861-1873.

J Stewart, Mitchell, J, Kalant, N, 1989. The effects of life-long food restriction on spatial memory in young and aged Fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the Morris water mazes. *Neurobiol Aging* 10, 669-675.

WF Stewart, Kawas, C, Corrada, M, Metter, EJ, 1997. Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology* 48, 626-632.

JH Stockley, O'Neill, C, 2007. The proteins BACE1 and BACE2 and beta-secretase activity in normal and Alzheimer's disease brain. *Biochem Soc Trans* 35, 574-576.

WJ Strittmatter, Saunders, AM, Schmechel, D, Pericak-Vance, M, Enghild, J, Salvesen, GS, Roses, AD, 1993. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1977-1981.

CR Sunico, Portillo, F, Gonzalez-Forero, D, Moreno-Lopez, B, 2005. Nitric-oxide-directed synaptic remodeling in the adult mammal CNS. *J Neurosci* 25, 1448-1458.

V Tancredi, D'Arcangelo, G, Grassi, F, Tarroni, P, Palmieri, G, Santoni, A, Eusebi, F, 1992. Tumor necrosis factor alters synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 146, 176-178.

RE Tanzi, 1996. Neuropathology in the Down's syndrome brain. *Nat Med* 2, 31-32.

RE Tanzi, McClatchey, AI, Lamperti, ED, Villa-Komaroff, L, Gusella, JF, Neve, RL, 1988. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 331, 528-530.

WG Tatton, Olanow, CW, 1999. Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1410, 195-213.

L Taupenot, Ciesielski-Treska, J, Ulrich, G, Chasserot-Golaz, S, Aunis, D, Bader, MF, 1996. Chromogranin A triggers a phenotypic transformation and the generation of nitric oxide in brain microglial cells. *Neuroscience* 72, 377-389.

DB Teplow, 1998. Structural and kinetic features of amyloid beta-protein fibrillogenesis. *Amyloid* 5, 121-142.

DR Thal, Capetillo-Zarate, E, Del Tredici, K, Braak, H, 2006. The development of amyloid beta protein deposits in the aged brain. *Sci Aging Knowledge Environ* 2006, re1.

GR Thatcher, Bennett, BM, Reynolds, JN, 2006. NO chimeras as therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 3, 237-245.

G Thinakaran, Teplow, DB, Siman, R, Greenberg, B, Sisodia, SS, 1996. Metabolism of the "Swedish" amyloid precursor protein variant in neuro2a (N2a) cells. Evidence that cleavage at the "beta-secretase" site occurs in the golgi apparatus. *J Biol Chem* 271, 9390-9397.

H Tohgi, Abe, T, Yamazaki, K, Murata, T, Ishizaki, E, Isobe, C, 1999. Alterations of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 269, 52-54.

T Tomita, Maruyama, K, Saido, TC, Kume, H, Shinozaki, K, Tokuhiro, S, Capell, A, Walter, J, Grunberg, J, Haass, C, Iwatsubo, T, Obata, K, 1997. The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2025-2030.

EE Tuppo, Arias, HR, 2005. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 289-305.

T Uehara, Nakamura, T, Yao, D, Shi, ZQ, Gu, Z, Ma, Y, Masliah, E, Nomura, Y, Lipton, SA, 2006. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* 441, 513-517.

J Van Beek, Elward, K, Gasque, P, 2003. Activation of complement in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 992, 56-71.

C Van Broeckhoven, Backhovens, H, Cruts, M, De Winter, G, Bruyland, M, Cras, P, Martin, JJ, 1992. Mapping of a gene predisposing to early-onset Alzheimer's disease to chromosome 14q24.3. *Nat Genet* 2, 335-339.

D Van Dam, De Deyn, PP, 2006. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nat Rev Drug Discov* 5, 956-970.

R Vassar, 2004. BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 23, 105-114.

R Vassar, Bennett, BD, Babu-Khan, S, Kahn, S, Mendiaz, EA, Denis, P, Teplow, DB, Ross, S, Amarante, P, Loeloff, R, Luo, Y, Fisher, S, Fuller, J, Edenson, S, Lile, J, Jarosinski, MA, Biere, AL, Curran, E, Burgess, T, Louis, JC, Collins, F, Treanor, J, Rogers, G, Citron, M, 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.

R Vassar, Kovacs, DM, Yan, R, Wong, PC, 2009. The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci* 29, 12787-12794.

S Vasto, Candore, G, Listi, F, Balistreri, CR, Colonna-Romano, G, Malavolta, M, Lio, D, Nuzzo, D, Mocchegiani, E, Di Bona, D, Caruso, C, 2008. Inflammation, genes and zinc in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 58, 96-105.

G Verdile, Gandy, SE, Martins, RN, 2007. The role of presenilin and its interacting proteins in the biogenesis of Alzheimer's beta amyloid. *Neurochem Res* 32, 609-623.

Y Vodovotz, Lucia, MS, Flanders, KC, Chesler, L, Xie, QW, Smith, TW, Weidner, J, Mumford, R, Webber, R, Nathan, C, Roberts, AB, Lippa, CF, Sporn, MB, 1996. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J Exp Med* 184, 1425-1433.

G Vogel, 1998. Tau protein mutations confirmed as neuron killers. *Science* 280, 1524-1525.

CS Von Koch, Zheng, H, Chen, H, Trumbauer, M, Thinakaran, G, van der Ploeg, LH, Price, DL, Sisodia, SS, 1997. Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging* 18, 661-669.

R Wadhwa, Takano, S, Kaur, K, Aida, S, Yaguchi, T, Kaul, Z, Hirano, T, Taira, K, Kaul, SC, 2005. Identification and characterization of molecular interactions between mortalin/mtHsp70 and HSP60. *Biochem J* 391, 185-190.

T Wahle, Thal, DR, Sastre, M, Rentmeister, A, Bogdanovic, N, Famulok, M, Heneka, MT, Walter, J, 2006. GGA1 is expressed in the human brain and affects the generation of amyloid beta-peptide. *J Neurosci* 26, 12838-12846.

MN Wallace, Geddes, JG, Farquhar, DA, Masson, MR, 1997. Nitric oxide synthase in reactive astrocytes adjacent to beta-amyloid plaques. *Exp Neurol* 144, 266-272.

DM Walsh, Klyubin, I, Fadeeva, JV, Cullen, WK, Anwyl, R, Wolfe, MS, Rowan, MJ, Selkoe, DJ, 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535-539.

DM Walsh, Selkoe, DJ, 2007. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101, 1172-1184.

DM Walsh, Townsend, M, Podlisny, MB, Shankar, GM, Fadeeva, JV, El Agnaf, O, Hartley, DM, Selkoe, DJ, 2005. Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (A β) fibrillogenesis block oligomerization of natural A β and thereby rescue long-term potentiation. *J Neurosci* 25, 2455-2462.

H Wang, Song, L, Laird, F, Wong, PC, Lee, HK, 2008. BACE1 knock-outs display deficits in activity-dependent potentiation of synaptic transmission at mossy fiber to CA3 synapses in the hippocampus. *J Neurosci* 28, 8677-8681.

Q Wang, Rowan, MJ, Anwyl, R, 2004. Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide. *J Neurosci* 24, 6049-6056.

W Wasco, Bupp, K, Magendantz, M, Gusella, JF, Tanzi, RE, Solomon, F, 1992. Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10758-10762.

W Wasco, Gurubhagavatula, S, Paradis, MD, Romano, DM, Sisodia, SS, Hyman, BT, Neve, RL, Tanzi, RE, 1993a. Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* 5, 95-100.

W Wasco, Peppercorn, J, Tanzi, RE, 1993b. Search for the genes responsible for familial Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 695, 203-208.

M Weberpals, Hermes, M, Hermann, S, Kummer, MP, Terwel, D, Semmler, A, Berger, M, Schafers, M, Heneka, MT, 2009. NOS2 gene deficiency protects from sepsis-induced long-term cognitive deficits. *J Neurosci* 29, 14177-14184.

A Weidemann, Konig, G, Bunke, D, Fischer, P, Salbaum, JM, Masters, CL, Beyreuther, K, 1989. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57, 115-126.

DT Weldon, Rogers, SD, Ghilardi, JR, Finke, MP, Cleary, JP, O'Hare, E, Esler, WP, Maggio, JE, Mantyh, PW, 1998. Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS in vivo. *J Neurosci* 18, 2161-2173.

GL Wenk, McGann, K, Hauss-Wegrzyniak, B, Rosi, S, 2003. The toxicity of tumor necrosis factor-alpha upon cholinergic neurons within the nucleus basalis and the role of norepinephrine in the regulation of inflammation: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 121, 719-729.

DM Wilcock, Lewis, MR, Van Nostrand, WE, Davis, J, Previti, ML, Gharkholonarehe, N, Vitek, MP, Colton, CA, 2008. Progression of amyloid pathology to Alzheimer's disease pathology in an amyloid precursor protein transgenic mouse model by removal of nitric oxide synthase 2. *J Neurosci* 28, 1537-1545.

CJ Wilson, Finch, CE, Cohen, HJ, 2002. Cytokines and cognition--the case for a head-to-toe inflammatory paradigm. *J Am Geriatr Soc* 50, 2041-2056.

O Wirths, 2001. Intraneuronal A β accumulation precedes plaque formation in β -amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neuroscience Letters* 306, 116.

O Wirths, Multhaup, G, Bayer, TA, 2004. A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide--the first step of a fatal cascade. *J Neurochem* 91, 513-520.

T Wisniewski, Dowjat, WK, Buxbaum, JD, Khorkova, O, Efthimiopoulos, S, Kulczycki, J, Lojkowska, W, Wegiel, J, Wisniewski, HM, Frangione, B, 1998. A novel Polish presenilin-1 mutation (P117L) is associated with familial Alzheimer's disease and leads to death as early as the age of 28 years. *Neuroreport* 9, 217-221.

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

W Xia, 2010. Brain amyloid beta protein and memory disruption in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* 6, 605-611.

W Xia, Zhang, J, Kholodenko, D, Citron, M, Podlisny, MB, Teplow, DB, Haass, C, Seubert, P, Koo, EH, Selkoe, DJ, 1997. Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins. *J Biol Chem* 272, 7977-7982.

H Xin, Stephans, JC, Duan, X, Harrowe, G, Kim, E, Grieshammer, U, Kingsley, C, Giese, K, 2000. Identification of a novel aspartic-like protease differentially expressed in human breast cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1501, 125-137.

T Yamada, Sasaki, H, Furuya, H, Miyata, T, Goto, I, Sakaki, Y, 1987. Complementary DNA for the mouse homolog of the human amyloid beta protein precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 149, 665-671.

Q Yan, Zhang, J, Liu, H, Babu-Khan, S, Vassar, R, Biere, AL, Citron, M, Landreth, G, 2003. Anti-inflammatory drug therapy alters beta-amyloid processing and deposition in an animal model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 23, 7504-7509.

R Yan, Bienkowski, MJ, Shuck, ME, Miao, H, Tory, MC, Pauley, AM, Brashier, JR, Stratman, NC, Mathews, WR, Buhl, AE, Carter, DB, Tomasselli, AG, Parodi, LA, Heinrikson, RL, Gurney, ME, 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533-537.

LB Yang, Lindholm, K, Yan, R, Citron, M, Xia, W, Yang, XL, Beach, T, Sue, L, Wong, P, Price, D, Li, R, Shen, Y, 2003. Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med* 9, 3-4.

BA Yankner, 1996. New clues to Alzheimer's disease: unraveling the roles of amyloid and tau. *Nat Med* 2, 850-852.

D Yao, Gu, Z, Nakamura, T, Shi, ZQ, Ma, Y, Gaston, B, Palmer, LA, Rockenstein, EM, Zhang, Z, Masliah, E, Uehara, T, Lipton, SA, 2004. Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10810-10814.

RJ Young, Beams, RM, Carter, K, Clark, HA, Coe, DM, Chambers, CL, Davies, PI, Dawson, J, Drysdale, MJ, Franzman, KW, French, C, Hodgson, ST, Hodson, HF, Kleanthous, S, Rider, P, Sanders, D, Sawyer, DA, Scott, KJ, Shearer, BG, Stocker, R, Smith, S, Tackley, MC, Knowles, RG, 2000. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by acetamidine derivatives of hetero-substituted lysine and homolysine. *Bioorg Med Chem Lett* 10, 597-600.

C Zarow, Lyness, SA, Mortimer, JA, Chui, HC, 2003. Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch Neurol* 60, 337-341.

YJ Zhang, Xu, YF, Chen, XQ, Wang, XC, Wang, JZ, 2005. Nitration and oligomerization of tau induced by peroxynitrite inhibit its microtubule-binding activity. *FEBS Lett* 579, 2421-2427.

H Zheng, Jiang, M, Trumbauer, ME, Sirinathsinghji, DJ, Hopkins, R, Smith, DW, Heavens, RP, Dawson, GR, Boyce, S, Conner, MW, Stevens, KA, Slunt, HH, Sisoda, SS, Chen, HY, Van der Ploeg, LH, 1995. beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81, 525-531.