

**Aktivierung phagozytierender Zellen durch  
"Advanced Glycation Endproducts" und  $\beta$ -Amyloid-  
Implikationen für die Pathogenese  
der Alzheimer' schen Demenz**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Arne Neumann  
aus  
Erlangen

Würzburg 2001

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Goebel

Gutachter : PD Dr. R. Schinzel

Gutachter: Prof. Dr. J. Kreft

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
Summary	1
Zusammenfassung	3
<b><u>I Einleitung</u></b>	<b>5</b>
I.1. Die Alzheimer'sche Erkrankung	5
I.2. Molekulare Hintergründe der AD	6
I.2.1. Extrazelluläre Plaques	6
I.2.1.1. Prozessierung des APP zu A $\beta$	6
I.2.1.2. Glykierungsreaktionen (AGEs)	8
I.2.2. Direkte und immunvermittelte Neurotoxizität	10
I.2.2.1. Direkt vermittelte Toxizität	10
I.2.2.2. Immunvermittelte Neurotoxizität	10
I.2.2.2.1. Aktivierung der Phagozyten und daraus resultierende zelluläre Reaktionen	10
I.2.2.2.2. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B	11
<b><u>II Material und Methoden</u></b>	<b>14</b>
II.1. Material	14
II.2. Methoden	17
II.2.1. Herstellung der AGEs	17
II.2.2. Herstellung der fibrillären A $\beta$ Peptide	18
II.2.3. Proteinbestimmung	18
II.2.4. Fluoreszenzmessung	18
II.2.5. Superoxidmessung	19
II.2.6. Zellkultur	19
II.2.6.1. Allgemeine Zellkulturtechniken	19
II.2.6.2. Transfektion eukaryontischer Zelllinien	21
II.2.6.3. Selektion auf homologe Rekombinanten	21
II.2.6.4. konditioniertes Medium	21
II.2.6.5. Zytotoxizitätstests	22
II.2.7. Molekularbiologische Methoden	23
II.2.7.1. Plasmide	23
II.2.7.2. Transformation von E.coli	23

II.2.7.3.	Plasmid-DNA Isolierung	24
II.2.7.4.	Restriktionsverdau der Plasmid-Fragmente	24
II.2.7.5.	Auftrennung von DNA-Fragmenten auf Agarosegelen durch Elektrophores	25
II.2.7.6.	Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	25
II.2.7.7.	Digoxigenin Markierung der DNA	25
II.2.7.8.	Hyaluronsäure-Agarosegel	25
II.2.7.9.	Gelretentionsanalyse ("Electrophoretic Mobility Shift Assay", EMSA)	26
II.2.7.10.	Analyse von Proteinen	29
II.2.7.11.	Immunoblot (Western Blot)	31
II.2.7.12.	Southern Blot	33
II.2.7.13.	RT-PCR	35

### **III Ergebnisse** 36

#### **III.1. Die Aktivierung phagozytierender Zellen** 36

III.1.1.	Indikatoren der Phagozytenaktivierung	38
III.1.2.	NF- $\kappa$ B als Indikator der zellulären Reaktion	39
III.1.3.	Einfluß der extrazellulären Matrix auf die NF- $\kappa$ B Aktivierbarkeit	41
III.1.3.1.	Beeinflussung der NF- $\kappa$ B Aktivierung durch Glycosaminoglykane	41
III.1.3.1.1.	Einfluß der HMW-HA auf die NF- $\kappa$ B Aktivierung	42
III.1.3.1.2.	HMW-HA verhindert die AGE induzierte Zytokinexpression	44
III.1.3.2.	Niedermolekulare HA Fragmente aktivieren NF- $\kappa$ B	45
III.1.3.3.	Die AGE induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierbarkeit ist umgekehrt proportional zu der HA-Größe	47
III.1.3.4.	Die A $\beta$ induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierung ist umgekehrt proportional zu der Größe der präinkubierten HA	48

#### **III.2. Veränderungen der Extrazellulären Matrix** 50

III.2.1.	Einfluß von AGE und A $\beta$ auf das durchschnittliche Molekulargewicht der HA	50
III.2.2.	AGE bedingte Aktivierung primärer Kardiofibroblasten und deren Einfluß auf Bestandteile der Extrazellulären Matrix	52

#### **III.3. Signaltransduktion in Mikrogliazellen** 54

III.3.1.	Inhibierung der AGE induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung	54
III.3.2.	Inhibierung verschiedener Signalkaskadengruppen in Bezug auf die Neurotoxizität im "in vitro Modell"	56
III.3.2.1.	Auswirkung der Hemmung der Transkription oder der Translation in Mikrogliazellen auf die neurotoxische Wirkung des mikroglia-konditionierten Mediums	57

III.3.2.2.	Auswirkungen der Hemmung mitochondrialer Funktionen in Mikrogliazellen auf die Neurotoxizität des mikroglia-konditionierten Mediums	58
III.3.2.3.	Hemmung verschiedener Radikalbildner in Mikrogliazellen und deren Einfluß auf die neurotoxische Wirkung des mikroglia-konditionierten Mediums	59
III.3.2.4.	Hemmung aktivierender Signalkaskaden und daraus resultierende Veränderungen in der Neurotoxizität des mikroglia-konditionierten Mediums	61
III.3.2.5.	Bestätigung und Einstufung der Wirksamkeit der Inhibitoren auf Neurotoxizitätsänderungen des konditionierten Mediums	62
<b>III.4.</b>	<b><u>Eigenschaften des mikroglia-konditionierten Mediums</u></b>	64
III.4.1.	Zeitraum der Freisetzung des toxischen Agens in das konditionierte Medium	64
III.4.2.	Temperaturabhängigkeit der Neurotoxizität des konditionierten Mediums	66
III.4.3.	Größeneingrenzung des toxischen Agens	66
III.4.4.	Einflußnahme von Übergangsmetalle auf die Neurotoxizität des konditionierten Mediums	68
<b>III.5.</b>	<b><u>NADPH Oxidase</u></b>	69
III.5.1.	Deaktivierung der NADPH Oxidase	69
III.5.1.1.	Inaktivierung der gp91 <sup>phox</sup> Untereinheit der NADPH Oxidase	70
III.5.1.2.	Stimulierte N11/6 Zellen zeigen im Gegensatz zu N11 Zellen keine Superoxidanionenausschüttung	72
III.5.2.	Ursache der mikroglia-vermittelten Neurotoxizität	74
III.5.2.1.	AGE führt nur in Mikroglia mit einer funktionellen NADPH Oxidase zu einer NF-κB Aktivierung	74
III.5.2.2.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Stimulation führt sowohl in N11 als auch in N11/6 zu einer NF-κB Aktivierung	75
III.5.2.3.	Die mikroglia-vermittelte Neurotoxizität ist nicht von der NF-κB Aktivierung sondern von der NADPH Oxidase Aktivierung abhängig	75
III.5.2.4.	Unterschiede der NF-κB Aktivierung in Mikroglia nach Aβ <sub>(25-35)</sub> und nach H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Behandlung	76
III.5.2.5.	Die mikroglia-vermittelte Neurotoxizität nach Aβ <sub>(25-35)</sub> Behandlung beruht auf der NADPH Oxidase Aktivierung	78
<b>IV</b>	<b><u>Diskussion</u></b>	80
IV.1.	Voraussetzungen für die Phagozytenaktivierung und deren Bedeutung für neurodegenerative Prozesse	80
IV.2.	Signaltransduktion in aktivierten Mikrogliazellen	88
IV.3.	Die Bedeutung der NADPH Oxidase für die mikroglia-vermittelte Neurotoxizität	92
<b>V</b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	97
<b><u>Anhang</u></b>		108

## Summary

Senile plaques are a hallmark in Alzheimer's Disease progression. These plaques consist mainly of fibrillar  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ), which can be modified by glycation. In addition these plaques contain so called AGEs "Advanced Glycation Endproducts", emerging from nonenzymatic glycated proteins. Subsequent dehydration, condensation and oxidation produces a heterogenous group of heterocyclic, coloured and fluorescent compounds. These AGE modified proteins are resistant to proteases and their formation is irreversible. AGEs and  $A\beta$  are able to activate Microglia cells, resulting in a neurotoxic effect, with several hypothesis of how microglia contribute to neuronal cell death.

To investigate the neurotoxic effect murine microglia cells were used. The NF- $\kappa$ B translocation into the nucleus was taken as an indicator of microglial activation. In this work conditions were investigated, that are necessary to activate murine microglia cells by AGE stimulation. High molecular weight hyaluronic acid from extracellular matrix, in its native form, is inhibiting activation of microglia cells in vitro. In contrast NF- $\kappa$ B was activated in AGE stimulated microglia cells in the presence of low molecular weight hyaluronic acid fragments. Here it was shown that the ability to activate microglia cells is inversely proportional to the average size of the hyaluronic acid. The ability for activation of microglia cells was reduced only in parts by other extracellular matrix glycosaminoglycans, like D-glucuronic acid, N-acetylglucosaminoglycane or chondroitine-4-sulfate.  $A\beta$  and AGEs release reactive oxygen species during their development, which were shown to be able to cleave hyaluronic acid into small fragments.

The signal transduction of AGE activated microglia cells was examined by measurement of NF- $\kappa$ B activation reduced by different inhibitors. A complex network of signaling pathways was detected, without revealing a certain receptor. Therefore an "in vitro model" was established, to find out the main neurotoxic component in the reaction of microglia cells. Again the signaling pathways were inhibited pharmacologically, using the cell free medium produced by these microglia cells as "conditioned medium" in neuronal cell culture. The murine neuronal cells were tested for their surviving in the conditioned medium, to correlate activated signal pathways with neurotoxicity.

Inhibition of translation or transcription in microglia cells led to no reduction of the neurotoxic effect of the conditioned medium, nor did the inhibition of the mitochondrial respiratory chain or the radical sources xanthine oxidase, lipoxygenase

or cyclooxygenase. Inhibition of NADPH oxidase was able to reduce the neurotoxicity of the conditioned medium down to 30%. The NADPH oxidase is an enzyme complex, releasing huge numbers of superoxide anion radicals during the "oxidative burst". The neurotoxic component was released 30 min after activation of microglia cells into the conditioned medium, was bigger than 50 kDa and was removed out of the conditioned medium by EDTA chelation followed by dialysis.

To proof the importance of NADPH oxidase activation for neurotoxicity, a part of the NADPH oxidase, the membranebound gp91<sup>phox</sup> was disrupted by gene targeting. As a consequence these cells did not react with superoxide release, when treated with A $\beta$  or AGE. Conditioned medium of these cells was not neurotoxic, in contrast to that of the microglia cells with a functional NADPH oxidase. The reactive oxygen species resulting from the NADPH oxidase activity are able to activate NF- $\kappa$ B. Because of the wide range of gene activation performed by NF- $\kappa$ B, there are various potential neurotoxic gene products to consider. For that reason NF- $\kappa$ B was stimulated successfully in microglia cells with exogenous hydrogen peroxide stimulation, without a neurotoxic result in the model system. Activated NF- $\kappa$ B seems not to be responsible for the microglia mediated neurotoxicity, whereas there is a direct correlation of NADPH oxidase activity and neurotoxicity.

## Zusammenfassung

Typisch für die Alzheimer'schen Erkrankung ist die Bildung unlöslicher Ablagerungen im Gehirn, sogenannter "seniler Plaques". Diese Plaques bestehen im Wesentlichen aus fibrillärem  $\beta$ -Amyloid ( $A\beta$ ), das durch Glykierungen verändert vorliegen kann. Außerdem beinhalten die Plaques, sogenannte AGEs "Advanced Glycation Endproducts", die aus nichtenzymatisch glykierten Proteinen entstehen. Als Folge von Dehydrierungs-, Kondensations- und Oxidationsprozessen entsteht ein heterogenes Gemisch aus farbigen, fluoreszierenden Ringverbindungen. Diese AGE-modifizierten Proteine sind unlöslich und proteaseresistent, und sind ebenso wie das fibrilläre  $A\beta$  in der Lage Mikrogliazellen zu aktivieren. Diese sessilen Gehirnmakrophagen wirken in aktiviertem Zustand neurotoxisch, wobei es verschiedene Hypothesen gibt, wie die Mikrogliazellen zu dem neuronalen Zelltod führen.

Um dieses zu untersuchen wurden murine Mikrogliazellen herangezogen, die als Merkmal ihrer Aktivierung auf die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Zellkern überprüft wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Rahmenbedingungen näher untersucht, die zu der AGE vermittelten Mikrogliaaktivierung führen. Es wurde in vitro gezeigt, daß die Mikrogliaaktivierung zunächst durch eine hochmolekulare Hyaluronsäure, wie sie nativ in der extrazellulären Matrix vorliegt, verhindert wird. Im Gegensatz dazu konnte NF- $\kappa$ B in Mikrogliazellen aktiviert werden, die in Gegenwart von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten mit AGE behandelt wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, daß die Mikrogliaaktivierbarkeit umgekehrt proportional zu der durchschnittlichen Hyaluronsäuremolekülgröße ist. Andere Glykosaminoglykane aus der extrazellulären Matrix, wie D-Glukuronsäure, N-Azetylglykosamin oder Chondroitin-4-sulfat reduzierten die Aktivierbarkeit der Mikrogliazellen nur geringfügig. Sowohl  $A\beta$ , als auch AGEs setzen während ihres Entstehungsprozesses reaktive Sauerstoffspezies frei, die wie sich zeigte die Hyaluronsäure in kleinere Bruchstücke zerschneiden können.

Die Signaltransduktion der AGE-aktivierten Mikrogliazellen wurde mittels unterschiedlicher Inhibitoren gehemmt und die Auswirkung auf die NF- $\kappa$ B Aktivierung untersucht. Hier zeigte sich ein komplexes Netzwerk an aktivierten Signalwegen, so daß kein Rückschluß auf einen bestimmten Rezeptor möglich war. Daher wurde ein "in vitro



Modell" entwickelt, um die ausschlaggebende neurotoxischen Komponenten der Mikrogliareaktion aufzufinden. Darin wurden die Signalkaskaden der aktivierten Mikroglia erneut durch pharmakologische Inhibierung unterbrochen, das zellfreie Medium das von diesen Mikrogliazellen sezerniert wurde, wurde als "konditioniertes Medium" für die Kultur muriner Neuronen eingesetzt. Diese wurden bezüglich ihrer Überlebensrate in diesem konditionierten Medium untersucht, so daß eine Korrelation zwischen aktiven Signalkaskaden und der neurotoxischen Wirkung hergestellt werden konnte.

Die Hemmung der Transkription oder der Translation in den Mikrogliazellen zeigte keine Reduktion der neurotoxischen Wirkung des konditionierten Mediums. Ebenso wenig wirkten Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette, der Radikalquellen Xanthin Oxidase, Lipoxygenase oder Cyclooxygenase. Die Hemmung der NADPH Oxidase hingegen, reduzierte die Neurotoxizität des konditionierten Mediums auf etwa 30%. Die NADPH Oxidase ist ein Enzymkomplex, der im Rahmen des "oxidativen bursts" große Mengen Superoxidanionen freisetzt. Die gesuchte neurotoxische Komponente wurde innerhalb der ersten 30 min nach Aktivierung der Mikrogliazellen in das konditionierte Medium abgeben, war größer als 50 kDa und konnte durch EDTA-Komplexierung mit anschließender Dialyse aus dem konditionierten Medium entfernt werden.

Um die Bedeutung der NADPH Oxidase Aktivierung für die neurotoxische Wirkung nachzuweisen, wurde eine Untereinheit der NADPH Oxidase, das membranständige gp91<sup>phox</sup> in den Mikrogliazellen deaktiviert. Dies führte dazu, daß diese Zellen kein Superoxid auf die Stimulation mit A $\beta$  oder AGE hin abgaben, im Gegensatz zu den Mikrogliazellen mit funktioneller NADPH Oxidase. Das konditionierte Medium der NADPH Oxidase defizienten Zellen war nicht mehr neurotoxisch.

Die freien Sauerstoffradikale die aufgrund der NADPH Oxidase Aktivierung entstehen, können zu einer NF- $\kappa$ B Aktivierung führen. Aufgrund der breitgefächerten Genaktivierung, die durch NF- $\kappa$ B bewirkt wird, gibt es viele mögliche Kandidaten die eine neurotoxische Wirkung haben könnten. Daher wurde NF- $\kappa$ B erfolgreich in den Mikroglia durch exogenes Wasserstoffperoxid stimuliert, wobei aber keine neurotoxische Wirkung im Modellsystem festgestellt wurde. NF- $\kappa$ B scheint damit nicht für die mikrogliavermittelte Neurotoxizität verantwortlich zu sein, im Gegensatz zu der NADPH Oxidase, deren Aktivität unmittelbar mit der Neurotoxizität korreliert ist.

# I Einleitung

## I.1. Die Alzheimer'sche Erkrankung

Die Alzheimer Demenz (AD) ist eine der häufigsten, bisher nur symptomatisch behandelbare, degenerative Alterskrankheit des Zentralnervensystems. Sie stellt noch vor der Multiinfarktdemenz die verbreitetste Form der senilen Demenzen dar. Die Krankheit tritt mit zunehmendem Alter häufiger auf und verläuft schleichend in mehreren Stufen. Sie äußert sich zunächst in leichtem, dann in immer stärker werdendem Gedächtnisverlust, was schließlich zum vollständigen Persönlichkeitsverlust führen kann. In Deutschland sind rund 0,8 Millionen Menschen von der Alzheimer'schen Erkrankung betroffen. Mit zunehmendem Durchschnittsalter der Bevölkerung ist ein Anstieg in den nächsten Jahren bis auf 1,2 Millionen Patienten zu erwarten. Alzheimer-Patienten sind bis zu ihrem Lebensende besonders pflegebedürftig, was nicht nur eine große Belastung der pflegenden Angehörigen verursacht, sondern auch entsprechend hohe Sozialkosten. Die Diagnose dieser Erkrankung war bisher durch Ausschlußverfahren erst in weit fortgeschrittenem Stadium möglich, mit definitiver Sicherheit jedoch erst im Biopsiematerial anhand der Plaques. Diese typischen Ablagerungen, die sogenannten " $\beta$ -Amyloid-Plaques" (A $\beta$ -Plaques) wurden histopathologisch von Alois Alzheimer erstmalig 1906 als abnormale Veränderungen erkannt. Nur ein kleiner Teil der AD Patienten, etwa 5% sind aufgrund eines genetischen Defekts betroffen, die durch Mutationen den "Präsenilin-Genen" verursacht werden. Diese Mutationen erhöhen die Produktion des besonders aggregationsaktiven Peptids A $\beta_{1-42}$  (Hartmann et al., 1997). Etliche weitere Faktoren korrelieren mit der Alzheimer'schen Erkrankung, beispielsweise das Apolipoprotein E (Apo E), das den Cholesterintransport zu den Zellen beeinflusst und in verschiedenen Varianten auftritt. Etwa 15% der Bevölkerung tragen das Allel Apo E4, das eine hohe Korrelation zu dem Auftreten der AD zeigt (Poirier et al., 1998). Neuere Forschungsdaten belegen Entzündungen und Blutgefäßveränderungen in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung. Momentan gibt es nur symptomatische Behandlungsmöglichkeiten beispielsweise durch Acetylcholinesterase-Inhibitoren oder Cyclooxygenase-Inhibitoren.

## **I.2. Molekulare Hintergründe der AD**

Die molekularen Ursachen der AD sind noch nicht eindeutig bekannt. Zwei Hypothesen stehen im Vordergrund der aktuellen Forschung, wobei eine Hypothese die intrazellulären fibrillären Bündel als ursächlich für die Neuronendegeneration ansieht. Diese sogenannten neurofibrillären „Tangles“, die durch die Glykierung des "mikrotubuli-assoziierten Proteins tau" (MAP $\tau$ ) entstehen, unterbinden den axonalen Transport in den Neuronen (Thal et al., 1998). Die zweite Theorie, die „ $\beta$ -Amyloid-Hypothese“, favorisiert extrazelluläre Plaques als Ursache der Neurodegeneration. Dabei handelt es sich um exzessive Ablagerungen von fibrillärem  $\beta$ -Amyloidprotein (A $\beta$ ) im Gehirn (Lorenzo et al., 1994, Chung et al., 1999).

### **I.2.1. Extrazelluläre Plaques**

Die senilen Plaques entstehen durch die Anhäufung des A $\beta$ -Peptids (A $\beta$ ), das aus dem Amyloid-Vorläuferprotein ("amyloid precursor protein", APP) hervorgeht. Das aus dem APP gebildete A $\beta$  aggregiert in fibrillären Strukturen zu Plaques, die auch als kongiophile Angiopathien bezeichnet werden. In diesen senilen Plaques sammeln sich unter anderem Ubiquitin, Apolipoprotein E (Masters et al. 1985, Selkoe et al., 1986), Komponenten der extrazellulären Matrix (Bame et al., 1997) und Übergangsmetalle wie Zink, Kupfer und Eisen (Lovell et al., 1998) in erhöhter Konzentration an (Smith et al., 1997). Durch Glykierungen, die Bildung der "Advanced glycation endproducts" (AGEs) werden die ohnehin schon stabilen extrazellulären Plaques dahingehend modifiziert, daß sie kaum noch aufgelöst, beziehungsweise abgebaut werden können (Durany et al., 1999).

#### **I.2.1.1. Prozessierung des APP zu A $\beta$**

APP ist ein ubiquitär im gesamten Organismus auftretendes Transmembran-Glycoprotein (Dyrks et al. 1998), dessen biologische Funktion noch unklar ist. Diskutiert werden die Funktion als Reparaturprotein oder Auswirkungen auf die Zell-Zell- und Zell-extrazelluläre-Matrix-Kontakte (Banati et al., 1993, Narindrasorasek et al., 1991 u. 1995). Durch die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen werden verschiedene Spleißvarianten erzeugt, wobei die  $\beta$ -Sekretase das membranständige Fragment C99 erzeugt, von dem ausgehend die  $\gamma$ -Sekretase das A $\beta$ -Peptid freisetzt (Abb.1).

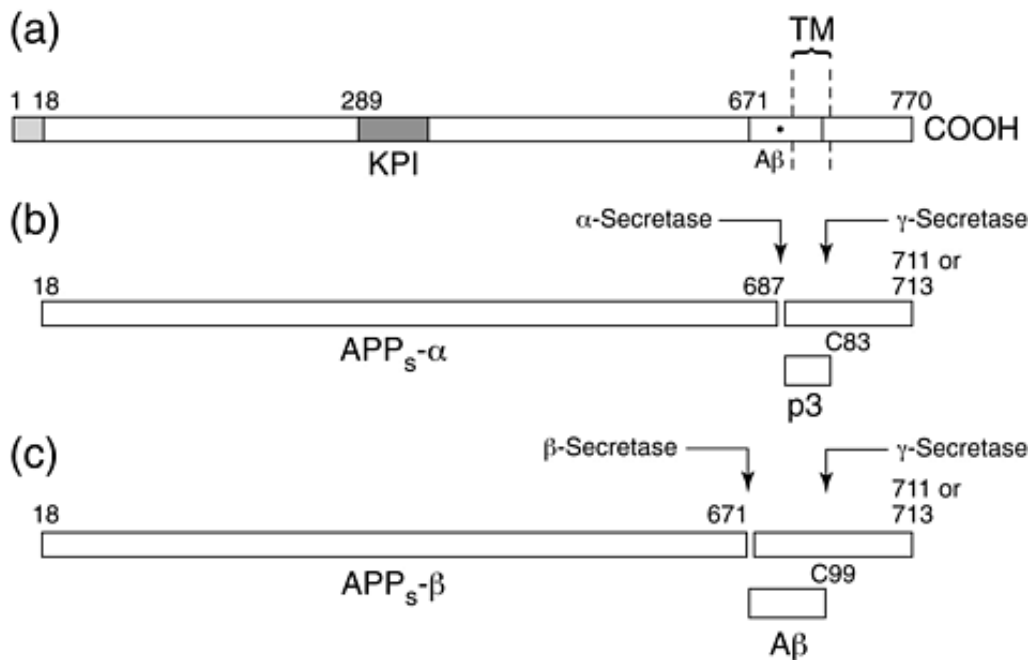


Abb.1) APP Spaltung des APP zu A $\beta$  (modifiziert nach Selkoe et al 1998)

(a) Schematisches Diagramm des „ $\beta$ -amyloid precursor protein“ (APP) und seiner metabolischen Abkömmlinge. Die größte bekannte Spleißform des APP umfaßt 770 Aminosäuren (AS). Zwei alternativ gespleißte Exons von 56 und 19 AS Länge werden bei dem Rest 289 eingefügt. Das erste enthält eine Kunitz Typ Serin Protease Inhibitor Domäne (KPI). Die Transmembrandomäne (TM) ist durch die gestrichelten Linien gekennzeichnet. Das amyloid  $\beta$ -Protein (A $\beta$ ) Fragment beinhaltet 28 Aminosäuren außerhalb der Membran und die ersten 12-14 Reste der Transmembrandomäne. (b) Die  $\alpha$ -Secretase spaltet die große, lösliche Ektodomäne des APP (APP<sub>s</sub>- $\alpha$ ) ab, der 83-Reste große C-terminale Bereich (C83) verbleibt in der Membran. Das C83 Fragment kann durch die  $\gamma$ -Sekretase bei Rest 711 oder 713 geschnitten werden, so daß das p3 Peptid freigesetzt wird. (c) Die alternative proteolytische Spleißstelle nach Rest 671 durch die  $\beta$ -Secretase führt zur Freisetzung der geringfügig verkürzten APP<sub>s</sub>- $\beta$  Form und dem membranständigen 99-Reste C-terminalen Fragment. Dieses C99 Fragment kann durch die  $\gamma$ -Secretase gespalten werden, so daß das A $\beta$  Peptid freigesetzt wird.

Das A $\beta$  Peptid umfaßt 40-42 Aminosäuren (Abb. 2), mit einer extrazellulären Domäne aus 28 Aminosäuren und 12-14 Aminosäuren einer hydrophoben Transmembrandomäne. A $\beta$  aggregiert zu  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die sich in Fibrillen aneinanderlagern.

A $\beta$ 1-40:	DAEFRHDSGYEVVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
A $\beta$ 1-42:	DAEFRHDSGYEVVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

Abb.2) Aminosäuresequenz des A $\beta$  Peptids

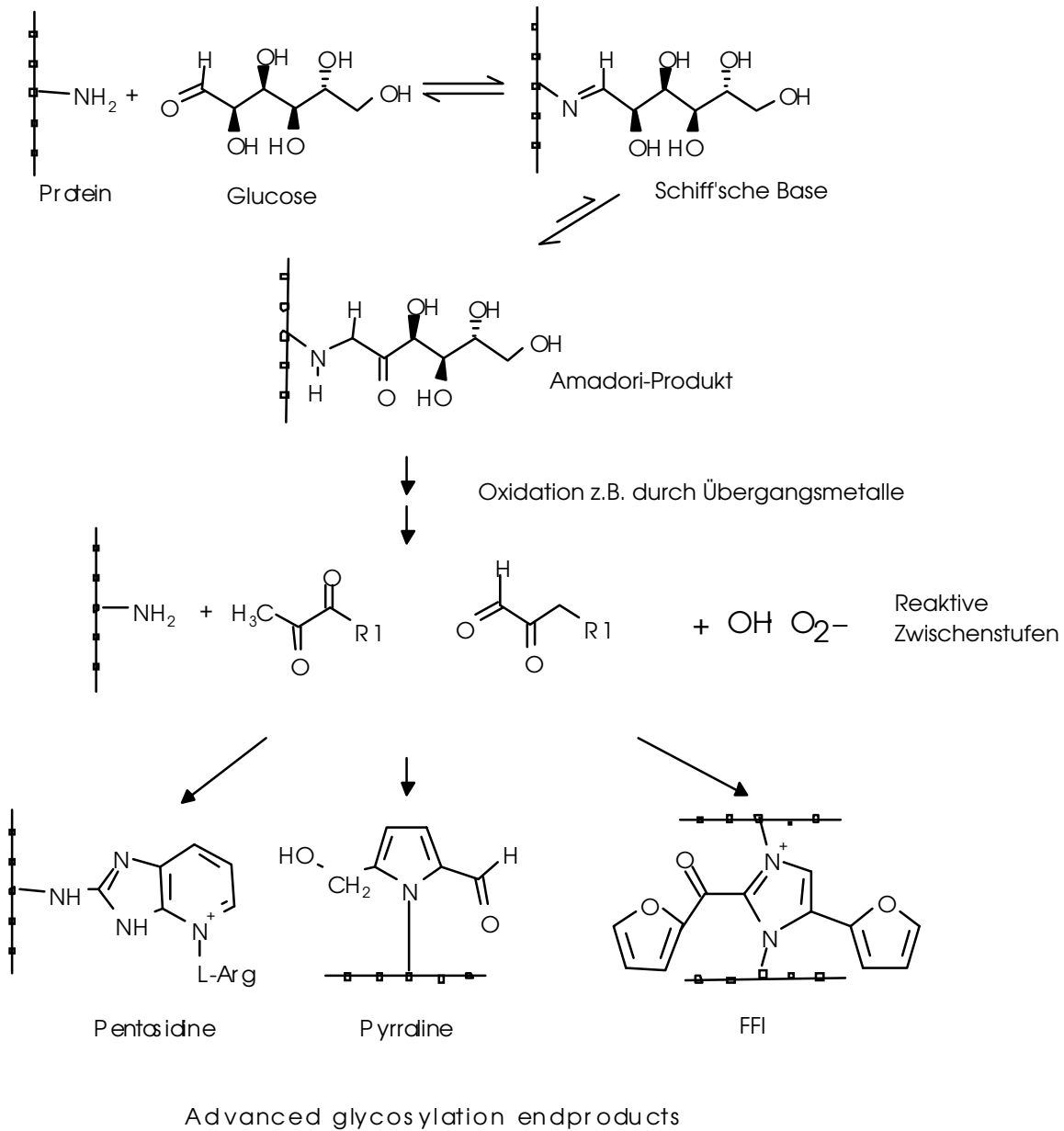
Frühe A $\beta$ -Ablagerungen, sogenannte „diffuse Plaques“ lösen kaum neuronale Reaktionen aus, während in der Nähe weiter fortgeschrittener Ablagerungen, sogenannter „neuritischen Plaques“, vermehrt degenerierte Nervenfortsätze zu finden sind (Yamaguchi et al., 2000). A $\beta$  hat ein stark positives Reduktionspotential, das Kupferionen (Cu<sup>2+</sup>), und in geringerem Umfang auch Eisenionen (Fe<sup>3+</sup>), reduziert und molekularen Sauerstoff einfängt, um Wasserstoffperoxid zu bilden (Huang et al., 1999). Die Fähigkeit der Radikalproduktion nimmt in der Reihenfolge A $\beta$ 1-42 > A $\beta$ 1-40 > rat A $\beta$ 1-40 ab, was mit der Neurotoxizität der Peptide korreliert, die in derselben Reihenfolge abnimmt (Huang et al., 1999). Für die ursächliche Beteiligung der freigesetzten Radikale an der Toxizität spricht die Tatsache, daß diese mittels Superoxid-Dismutase (SOD) vermindert werden kann (Thomas et al., 1996). Die A $\beta$ -Fe<sup>3+</sup>/Cu<sup>2+</sup> Reaktion erzeugt außerdem Thiobarbitursäure, ein Beleg für die Lipidoxidationsprodukte Malondialdehyd und Hydroxynonenal (Huang et al., 1999), die ihrerseits neurotoxisch wirken können.

### **I.2.1.2. Glykierungsreaktionen (AGEs)**

AGEs entstehen aus nichtenzymatisch glykosylierten (=glykierten) Proteinen in einer Reaktionskette, für die im ersten Schritt ähnlich der Maillard-Reaktion die Addition eines Zuckermoleküls über die reaktive Carbonylgruppe an eine primäre Aminogruppe angenommen wird. Die gebildete Schiff-Base lagert sich in einem zweiten Schritt zum Amadori-Produkt um. In weiteren Schritten entsteht durch Dehydrierung, Kondensation und Oxidation ein heterogenes Gemisch. Diese äußerst stabilen Verbindungen bezeichnet man entsprechend ihrer mehrstufigen Bildung als „Advanced Glycation Endproducts“ (AGEs) (Bucala et al., 1994). Sie beinhalten fluoreszierende Ringverbindungen mit einem charakteristischen Fluoreszenzmaximum bei 440 nm, sind proteaseresistent, unlöslich und bei ihrer Bildung entstehen freie Radikale und andere reaktive Intermediate (Abb. 3) (Brownlee et al., 2000). Unter den verschiedenen bisher bekannten Produkten befinden sich die N-Carboxymethyllysin (CML), Pyrralin, Imidazolone, Pentosidin, Methylglyoxal und Vesperlysin (Kato et al., 2000, Tessier et al., 2000).

Die Amadori-Produkte werden durch Übergangsmetalle oxidiert, worauf sich reaktive Zwischenstufen bilden. Diese Autoxidation produziert vor allem Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), die durch die Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dismutiert werden. In der Fenton-Reaktion werden diese mit Hilfe von Fe<sup>2+</sup> zu dem äußerst reaktiven

Hydroxyl-Radikal reduziert.Unter physiologischen Bedingungen findet die Bildung der AGEs nur langsam statt, so daß besonders langlebige Proteine betroffen sind.



**Abb. 3) Reaktionswege, die zur Bildung der Advanced glycosylation endproducts führen**  
 Nach der Glykierung einer primären Aminogruppe lagert sich die gebildete Schiff-Base in einem zweiten Schritt zu einem Amadori-Produkt um. Durch Oxidation entstehen reaktive Zwischenstufen, die zu einer heterogenen Gruppe von Endprodukten weiterreagieren. Darunter befinden sich Pentosidine, Pyrraline und verschiedene bisher unidentifizierte Formen (FFI).

## **I.2.2. Direkte und immunvermittelte Neurotoxizität**

### **I.2.2.1. Direkt vermittelte Toxizität**

Sowohl von A $\beta$  als auch von AGEs ist bekannt, daß sie in räumlicher Nähe zu degenerierenden Neuronen stehen (Colaco et al., 1996). Hier ist noch weitgehend unbekannt auf welchem Weg die direkte Neurotoxizität vermittelt wird, obwohl die meisten Ansätze von oxidativem Stress als Ursache ausgehen (Behl et al., 1994, Pike et al., 1991). Dadurch daß die Glukosetransporter durch Lipidperoxidationsprodukte inhibiert werden kann der zerebrale Glukosemetabolismus gestört werden, so daß es zu einer zellulären Unterversorgung kommt (Montine et al., 1997). Weitere Mechanismen der A $\beta$  Neurotoxizität sind vermutlich die Bildung von Ionenkanälen z.B. für Calcium (Hartmann et al., 1994) und die Inhibierung des mitochondrialen Energiestoffwechsels (Bozner et al., 1997, Keller et al., 1999).

### **I.2.2.2. Immunvermittelte Neurotoxizität**

Die immunvermittelte Neurotoxizität wird durch Mikroglia vermittelt, sowie durch inflammatorisch angelockte, ins Gewebe eingewanderte Makrophagen. Im Folgenden soll näher auf diese indirekte Form der Neurotoxizität eingegangen werden. Mikroglia als sessile Makrophages des Gehirns sind unabdingbar im Kampf gegen eindringende Mikroorganismen und notwendig, um Abfallprodukte zu beseitigen.

#### **I.2.2.2.1. Aktivierung der Phagozyten und daraus resultierende zelluläre Reaktionen**

Von A $\beta$  ist bekannt, daß sie einen Tyrosine-abhängigen Signalweg aktivieren, der zu Superoxidproduktion führt. Möglicherweise spielt der "Rezeptor für AGEs" (RAGE) hier eine wesentliche Rolle in der Mikrogliaaktivierung (McDonald et al., 1997). Für Mikroglia und Astrozyten ist die A $\beta$ -bedingte Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die NF- $\kappa$ B abhängige Stickstoffmonoxidproduktion (NO) beschrieben (Akama et al., 1998).

AGEs sind im Gehirn mit Mikroglia kolokalisiert (Takeda et al., 1998) und können als Signal für die Aktivierung der Mikroglia dienen. Da die Mikroglia wiederum mit den

Amyloid Plaques assoziiert sind (Dickson et al., 1996) ist es schwer einen eindeutigen kausalen Zusammenhang herzustellen, welche Substanzen ursächlich für die Mikrogliaaktivierung sind. Die Aktivierung der Mikroglia durch AGE, kann hierbei durch mehrere Rezeptoren vermittelt werden, den AGE-Rez (RAGE), OST-48 (AGE R1), 80 K-H (AGE R2) und Galectin-3 (AGE R3), wobei die weiterführenden Signalkaskaden weitgehend unbekannt sind (Thornalley et al., 1998).

Die Makrophagen Scavenger Rezeptoren I und II (MSR I, MSR II) binden sowohl A $\beta$  als auch AGEs, phagozytieren diese, und leiten eine Abwehrreaktion ein. Im Rahmen dieser inflammatorischen Reaktion findet der „Respiratory burst“ statt, dabei geben die professionellen Phagozyten des Immunsystems reaktive Sauerstoffspezies ab, um eindringende Mikroorganismen zu schädigen. Die NADPH Oxidase ist der ausschlaggebende Enzymkomplex eines solchen „respiratory bursts“. Die primären Produkte, das Superoxidanion und Wasserstoffperoxid, die von der NADPH Oxidase gebildet werden sind nicht reaktiv genug, um eine wirkungsvolle bakterizidale Wirkung zu erzielen, aber die Sauerstoffmetaboliten sind die Grundlage für daraus resultierende reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Diese vernichten aber nicht nur Mikroorganismen, sondern auch benachbarte Zellen ("bystander lysis"), sind also verantwortlich für die Zerstörung des Gewebes, die häufig mit einer inflammatorischen Reaktion einhergeht.

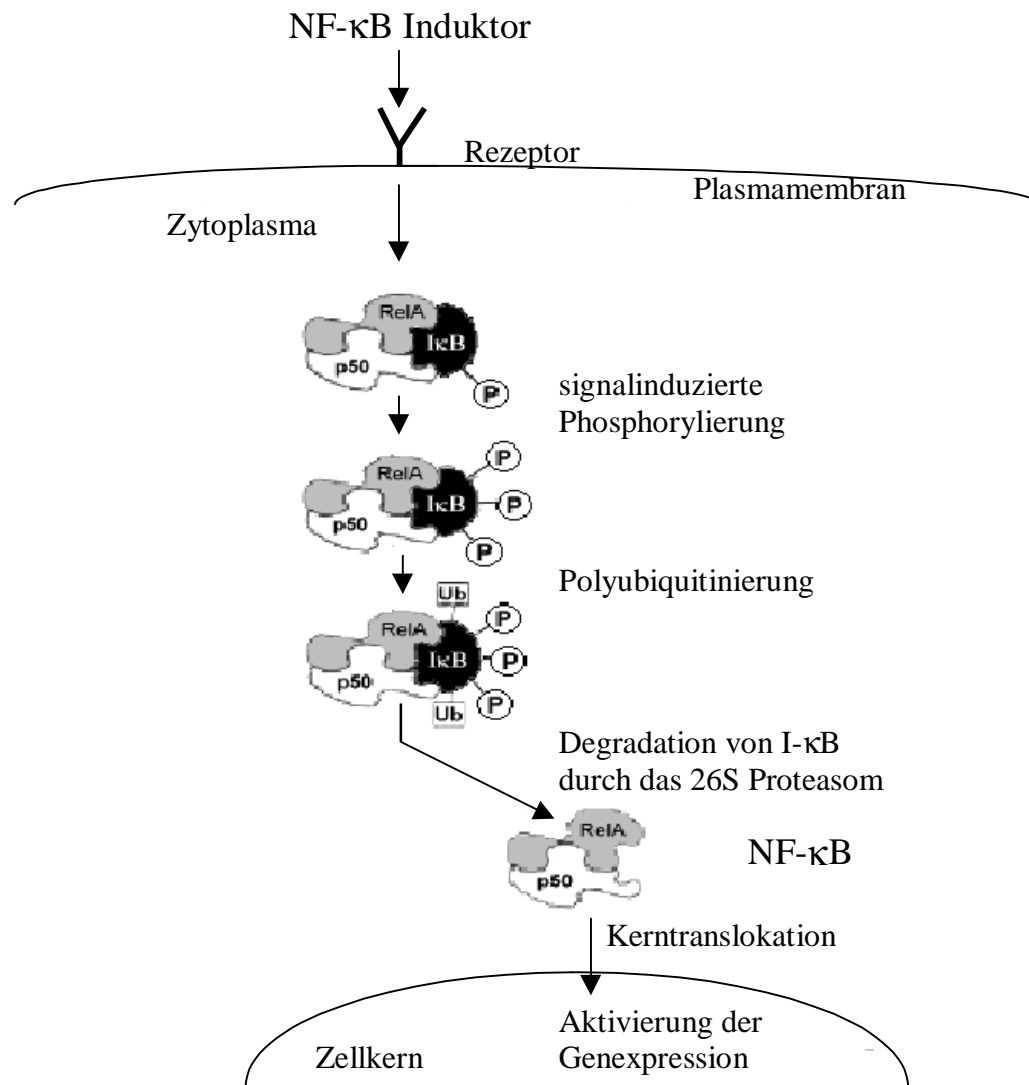
Die reaktiven Sauerstoffspezies können aber auch als Signalgeber ("second messenger") weiterführende Signalweg aktivieren, beispielsweise die JAK-STAT Signalkaskade (Simon et al., 1998) oder sie veranlassen die NF- $\kappa$ B Translokation in den Zellkern. Dies bestätigt sich darin, daß die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch die Zugabe von Antioxidantien verhindert wird (Vogt et al., 1998, Schreck et al., 1991, Shi et al., 1999).

#### **I.2.2.2.2. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B**

Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) liegt inaktiv im Zytoplasma gebunden an I- $\kappa$ B, den Inhibitor von NF- $\kappa$ B vor. Außer dem vorwiegend auftretenden I- $\kappa$ B $\alpha$  kommen die Subtypen I- $\kappa$ B $\beta$ , I- $\kappa$ B $\gamma$ , I- $\kappa$ B $\epsilon$ , p105 (Vorläufer p50) und p100 (Vorläufer p52) vor (Baeuerle et al., 1998). Nach der Stimulation der Zelle wird das an NF- $\kappa$ B gebundene I- $\kappa$ B degradiert, das daraufhin von dem Rel-Dimer abdissoziiert. NF-



$\kappa$ B wird anschließend in den Zellkern transloziert (Abb.4), wobei auch hier mehrere Mitglieder bekannt sind, das cRel, RelA und RelB. Diese besitzen eine konservierte, ca. 300 Aminosäure umfassende Rel-Homologie-Domäne (RHD), die für die Dimerisierung und die DNA-Bindefähigkeit essentiell ist (Urban et al., 1991).



#### Abb. 4) Signaltransduktionsweg der NF- $\kappa$ B Aktivierung

Nach der Bindung des Liganden an den Rezeptor erfolgt die Phosphorylierung von I- $\kappa$ B, was zu einer Ubiquitinierung führt. Daraufhin wird das I- $\kappa$ B degradiert, so daß der p50/RelA Komplex in den Zellkern gelangen kann, wo die Aktivierung der Genexpression stattfindet. Anschließend findet im Zytoplasma die Reaggregation von I- $\kappa$ B und NF- $\kappa$ B statt. (modifiziert nach Baldwin et al., 1996); P=Phosphat; Ub=Ubiquitin.

Dabei sind Kombinationen zu Hetero- und Homodimere der NF- $\kappa$ B Mitglieder möglich. Diese unterschiedliche Zusammensetzung der Dimere erhöht die Komplexität der Genregulation und manifestiert sich in unterschiedlichen Expressionsmustern (Lernbecher et al., 1993, Weih et al., 1996).

**Tabelle 1) Übersicht der Zielgene von NF- $\kappa$ B**

(modifiziert nach Baeuerle et al., 1998)

Wachstumsfaktoren und Zytokine	Interleukin-1 $\alpha$ Interleukin-1 $\beta$ Interleukin-2 Interleukin-3 Interleukin-6 Interleukin-8 Interleukin-12 Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) Lymphotoxin (TNF- $\beta$ ) Interferon $\beta$ (IFN- $\beta$ ) Interferon $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2) Makrophagen stimulierender Faktor (M-CSF) Granulozyten / Makrophagen stimulierender Faktor (GM-CSF) Granulozyten stimulierender Faktor (G-CSF) Erythropoetin
Zelladhäsionsmoleküle	Intrazelluläres Zelladhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) Vasculäres Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) Endothel-Leukozyten Adhäsionsmolekül-1 (ELAM-1)
Akut-Phase Proteine	Angiotensinogen Serum Amyloid A (Vorstufe) Komplemente Faktor C4
induzierbare NO-Synthase (iNOS)	Stickstoffmonoxid (NO)

Durch die differentielle Regulierung der verschiedenen NF- $\kappa$ B Komplexe werden sehr vielfältige genetische Programme in Gang gesetzt, die sich potentiell neurotoxisch auswirken können (Tab. 1). Die NF- $\kappa$ B Zielgene müssen aber nicht zwangsläufig Einfluß auf die neuronale Überlebensfähigkeit nehmen. Einige wirken unmittelbar auf den Stoffwechsel der Mikroglia, erhöhen deren Resistenz gegenüber Toxinen oder regen die Mitose oder Chemotaxis an, andere, wie Zytokine oder Stickstoffmonoxid können dosisabhängig neurotoxisch oder neuroprotektiv sein.

# **II Material und Methoden**

## **II.1. Material**

### **Chemikalien**

Die verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics, Calbiochem, Merck, Sigma und Molecular Probes. HMW-HA (MW: 1.2 MDa) and LMW-HA (MW: 0.2-0.5 MDa) wurden von Lifecore and Sigma bezogen.

### **Zellkulturmedien und Material**

Zellkulturmedien und Supplemente wurden von der Firma Gibco bezogen.

### **Antikörper**

Die Antikörper gegen die phosphorylierte SAP-K, phosphoryliertes ELK-1 und phosphoryliertes ATF-2 sowie I- $\kappa$ B, wurden von New England Biolabs bezogen. Der anti-p50 Antikörper wurde bei Santa Cruz Biotechnology gekauft.

### **Radionukleotide**

Die verwendeten Radionukleotide wurden von Pharmacia Amersham geliefert.

### **Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) Primer**

Primer wurden von der Firma Eurogentec synthetisiert.

PCR Primerpaare für murines  $\beta$ -Actin, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ :

#### **IL-1 $\beta$**

sense 5'-CTC TAG AGC ACC ATG CTA CAG AC-3'

antisense 5'-TGG AAT CCA GGG GAA ACA CTG-3'

#### **IL-6**

sense 5'-TGG AGT CAC AGA AGG AGT GGC TAA G-3'

antisense 5'-TCT GAC CAC AGT GAG GAA TGT CCAC-3'

#### **TNF**

sense 5'-GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C-3'

antisense 5'-ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G-3'

$\beta$ -Actin

sense 5'-TGG-AAT-CCT-GTG-GCA-TCC-ATG-AAA-C-3'

antisense 5'-TAA-AAC-GCA-GCT-CAG-TAA-CAG-TCC-G-3'

### NF- $\kappa$ B-Oligonukleotide für die Gelretentionsanalyse

Das doppelstängige Oligonukleotid  $\kappa$ B wurde durch Hybridisierung der komplementären Einzelstränge erzeugt.

5'-AGC TTC AGA GGG GAC TTT CCG AGA GG-3'

5'-TCG ACC TCT CGG AAA GTC CCC TCT GA-3'

### A $\beta$ -Peptide

Die Peptide A $\beta$ <sub>(1-40)</sub>, A $\beta$ <sub>(25-35)</sub> und ein Peptid bestehend aus 11 Aminosäure mit einer Zufallssequenz (scrambled) = A $\beta$ <sub>(sc)</sub> wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Palm durch Festphasesynthese hergestellt, abgespalten und deprotektioniert. Die Aufreinigung erfolgte durch präparative HPLC über eine RP18 Säule. Reinheit und Molmasse von A $\beta$ (1-40) wurden im Arbeitskreis von Prof. Spengler (Fakultät für Chemie) durch MALDI bestätigt.

Sequenzen der verwendeten Peptide:

A $\beta$ <sub>(1-40)</sub> DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV

A $\beta$ <sub>(25-35)</sub> GSNKGAIIGLM

A $\beta$ <sub>(sc)</sub> KSGNMLGIIAG

### Größenstandards

Als Molekulargewichtsstandard für die SDS-PAGE Gelanalyse wurde der "Color Marker high range" von Sigma Aldrich verwendet. Als Größenmarker für DNA-Untersuchungen wurde die DNA-Leiter "Gene ruler 1 kb Ladder" von MBI verwendet. Für die Digoxigenin (DIG) markierte DNA Größenbestimmung wurde der DNA Molecular Weight Marker II von Boehringer Mannheim verwendet.

### Puffer und Lösungen

10x PBS, pH 7,4	80 g	NaCl
	2 g	KCl
	2,4 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	14,4 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

50x TAE, pH 8,4	242 g 37 g 57,1 ml ad 1000 ml H <sub>2</sub> O	Tris-Base EDTA Eisessig
10x TBE, pH 8,4	1 M 1 M 20 mM	Tris-Base Borsäure EDTA
DNA-Farbindikator:	15 % 10 % 40 mM 0,2% 0,2%	Glycerin Ficoll 400 EDTA Xylencyanol Bromphenolblau

## Geräte und Verbrauchsmaterial

### Geräte

Analysenwaage	Satorius
Blotkammer	BRL
Elektroporationsgerät	Biorad
Elisa Reader	Labsystems Multiscan Ascent
Cleanbench	Heraeus
Grobwaage	Satorius
Luminometer	Bertold
PCR-Block	Progene
Netzgeräte	Consort, Pharmacia
Photometer	Varian Cary
Sterilbänke	Heraeus
Spektrophotometer	Spex Fluoromax
Szintillationszähler	Wallace Systems, Pharmacia
Thermocycler	Techne ProGene
Tischzentrifuge	Eppendorf
Mikropipetten	Gilson
Zellzähler	Casy Coulter Counter
Zentrifugen	Hettich, Sorvall

### Verbrauchsmaterial

Die Zellkulturverbrauchsmaterialien wurden von Greiner, Falcon und Beckton-Dickinson bezogen.

1 ml und 1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
Pipettenspitzen (blau, gelb)	Gilson

15 ml und 50 ml Zentrifugationsröhrchen	Greiner
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell

#### Software

MS-Office Paket  
Corel Photo Paint, Corel Draw  
Image Quant  
SPSS  
Ascent

## II.2.Methoden

### II.2.1.Herstellung der AGEs

Die AGEs wurden durch Inkubation von 1 mM BSA, in 1 x PBS (pH 7,4) bei 50°C mit 1 M Glukose für 6 Wochen hergestellt. Über 6 Wochen hinweg wurden eine ständige und nahezu lineare Zunahme sowohl der Fluoreszenz (370 nm Anregung / 440 nm Emission), als auch der Absorption bei 400 nm beobachtet. Nach diesem Zeitraum waren keine Steigerungen der Werte feststellbar, so daß angenommen wurde, daß ein maximal modifiziertes BSA vorlag. Nicht gebundene Zucker wurden durch gründliche Dialyse mit destilliertem Wasser entfernt. Diese Modell-AGEs wurden lyophilisiert und erneut in PBS (pH 7,4) aufgenommen. Der Proteingehalt wurde durch die Bradford-Methode gemessen, wobei BSA als Standard verwendet wurde. Der AGE Anteil wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 400 nm und der Fluoreszenz geschätzt. Das Emissionsspektrum der Fluoreszenz wurde bei 440nm nach Anregung bei 370nm gemessen. Obwohl bakterielles Wachstum aufgrund der hohen Temperatur und den hohen Zuckerkonzentrationen unwahrscheinlich ist, wurde die BSA-AGE Präparation durch einen Durchlauf durch eine Polymyxin B Säule weiterbearbeitet, die Endotoxin bindet. Hierzu wurde Polymyxin B-Agarose der Firma Pierce entsprechend der Vorschrift eingesetzt.

Vor der Polymyxin B Säulenbehandlung wurde die BSA-AGE Präparation bezüglich des Endotoxingehalts getestet. Dazu wurde der "Limulus-Amoebocyte Lysate" Test (BioWhittaker, Inc.) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen qualitativen Test, um die Anwesenheit von Gram-negativem bakteriellem Endotoxin festzustellen. In Gegenwart des

Endotoxins geliert die Lösung, während sie ansonsten flüssig bleibt. Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet, im Vergleich zu Vergleichsstandards wurde ein Endotoxingehalt von weniger als 1 Unit/mg Protein für die verwendeten BSA bzw. BSA-AGE Präparationen festgestellt. Vor dem Einsatz in der Zellkultur wurden die AGEs für 20 min auf 70°C erhitzt.

## II.2.2. Herstellung der fibrillären A $\beta$ Peptide

Das A $\beta$ <sub>(25-35)</sub> und A $\beta$ <sub>(1-40)</sub> sowie das A $\beta$ (sc) wurden als Stammlösung in sterilem, destilliertem Wasser eingelöst und entsprechend der benötigten Endkonzentration verdünnt. Die Fibrillenbildung von 10  $\mu$ M A $\beta$ <sub>(25-35)</sub> erfolgt innerhalb von Minuten, wie durch den Thioflavin-T Test festgestellt werden kann (siehe III.2.4). Die A $\beta$ <sub>(1-40)</sub> (10  $\mu$ M) Fibrillenbildung erfolgte bei 37°C für 5 Tage und wurde analog zu den Verfahren bei AGEs auf das Vorhandensein von Endotoxin untersucht.

## II.2.3. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde als Bradford Bestimmung durchgeführt. Coomassie Brilliant Blue komplexiert in saurer Lösung mit Proteinen, vermutlich, indem die freien NH<sub>2</sub>-Gruppen von Argininresten mit dem Farbstoff reagieren. Dabei ändert sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm. Ein Aliquot der Probe wurde mit 500  $\mu$ l Reagenz gemischt, die Messung erfolgt nach 5 min. Inkubation gegen eine Leerprobe. Der Proteingehalt der Probe wurde mit Hilfe eines BSA-Standards errechnet.

Bradford-Lösung:

100 mg

50 ml

100 ml

ad 1 l H<sub>2</sub>O

Coomassie Brilliant Blue G-250

95% Ethanol

85% Phosphorsäure

Lösung durch Faltenfilter filtrieren.

## II.2.4. Fluoreszenzmessung

AGE-Fluoreszenzmessung

AGEs zeigen nach Anregung bei 370 nm ein charakteristische Emissionsmaximum bei

440nm (Monnier et al.,1981). Zur Fluoreszenzmessung wurde eine geeignete AGE-Verdünnung in 1 x PBS oder A. dest verwendet. Als Leerwert dienten entsprechend A.dest oder PBS.

#### Bestimmung der Abeta Fibrillenbildung mittels Thioflavin T-Fluoreszenz

Fibrilläre A $\beta$  Aggregate bilden eine beta-Faltblattstruktur aus, die ein Emissionsmaximum bei 480 nm zeigen. Durch den Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T wird diese Emission verstärkt (Lansbury et al., 1992)..

Puffer	
Phosphatpuffer pH 6,0	50 mM
Thioflavin T	3 $\mu$ M
Anregung 450 nm	
Emission 480 nm	

### II.2.5. Superoxidmessung

Für eine quantitative Messung der Superoxidproduktion der Mikroglia wurde der kontinuierliche Cytochrom c Reduktionstest modifiziert, so daß er für die kinetische Messung mittels ELISA Reader geeignet war (Mayo et al., 1990). Die Extinktionsänderung der Cytochrom c Lösung wird bei 550 nm, 37°C verfolgt. Die Menge des gebildeten O $_2^-$  wurde mittels des Extinktionskoeffizienten für Cyt c (93000 Liter x mol $^{-1}$  x cm $^{-1}$ ) errechnet.

Cytochrom c Reduktion	
Cyt c (horseheart)	10 $\mu$ M
EDTA	100 $\mu$ M
Na $_2$ HPO $_4$ (pH 7,8)	50 mM

### II.2.6. Zellkultur

#### II.2.6.1. Allgemeine Zellkulturtechniken

##### Zellkultur mit permanenten Zelllinien

Für die Zellkulturuntersuchungen wurde die murine Makrophagenzelllinie J774A.1, die murine Mikrogliazelllinie N11 und die murine Neuronenzelllinie Neuro-2A verwendet. Die Zellkultur erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO $_2$ . Die Zellen wurden in 75cm $^2$



Gewebekulturflaschen 24-36 h in DMEM mit Penicillin/Streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml) and L-Glutamin (2 mM) bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub> mit 10% FKS herangezogen.

### **Zellkulturmedien**

Die Zellkulturmedien DMEM und RPMI wurden entsprechend den Herstellerangaben aus Pulvermedium mit Natriumcarbonat angesetzt und durch einen 0,2 µm Filter (Spektrum) sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurde dem Medium 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml; 100 U/ml Penicilin/Streptomycin 10% FKS zugesetzt. Das fötale Kälberserum (FKS) wurde für 50 min bei 56°C hitzeinaktiviert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Nachdem man das Deckglas auf der Zählkammer angebracht hat, gibt man seitlich einen Tropfen Zellsuspension zu. Unter dem Mikroskop werden die Zellen gezählt, die sich im Grossquadrat des Messkreuzes befinden. Die so erhaltene Zellzahl ergibt mit  $1 \times 10^4$  multipliziert die Zellzahl/ml. Zur Unterscheidung der lebenden von den toten Zellen wurde die Zellsuspension mit Typanblau im Verhältnis 1:1 gemischt. Die toten Zellen färben sich im Gegensatz zu den lebenden Zellen nach ca. 30 s Inkubationszeit blau an.

### **Einfrieren und Auftauen der Zellen**

$1 \times 10^7$  Zellen werden aus dem Kulturmedium entnommen und mit frischem Medium auf 10 ml verdünnt und zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1,8 ml Einfriermedium (10% DMSO, 40% DMEM, 20% FKS) aufgenommen und in Einfrierröhrchen überführt. Die Zellen werden bei -20 °C eingefroren, nach 12 h in eine -80°C Gefriertruhe überführt, und schließlich in einem Tank gefüllt mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Zellen in einem 37°C Wasserbad aufgetaut, in einem Falcon-Röhrchen mit 5 ml frischem Medium (37°C) abzentrifugiert, und das Pellet in frischem Medium aufgenommen und in Gewebekulturflaschen inkubiert.

Einfriermedium in DMEM:	10%	DMSO
	20%	FKS

### **II.2.6.2. Transfektion eukaryontischer Zelllinien**

Für die Transfektion der N11-Mikrogliazelllinie wurde das FuGene 6 Transfektions Reagenz verwendet (Boehringer Mannheim). Hierbei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren, wobei 2 µg Plasmid-DNA des linearisierten Zielvektors gp91<sup>phox</sup> eingesetzt wurden.

### **II.2.6.3. Selektion auf homologe Rekombinanten**

Die Selektion der gp91<sup>phox</sup> transfizierten N11 Mikrogliazellen erfolgte durch den Einsatz von zwei Selektionsverfahren. Durch die Integration eines Neomycin-Resistenzgens in das Genom der N11 ist die Zelle resistent gegen Geneticin (G418). Dieses wurde in einer Konzentration von 300 µg/ml für die Dauer von drei Wochen nach der Transfektion eingesetzt. Aufgrund eines erfolgreichen Rekombinationsereignisses wird die HSV-TK entfernt. Durch den Wegfall der HSV-TK kann Ganciclovir (Roche) nicht mehr umgesetzt werden, wobei dieses in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt wurde. Solche Zellen, die das Plasmid vollständig enthalten oder in denen das Plasmid als Ganzes in das Genom integriert wurde, setzen aufgrund der funktionellen HSA-TK Ganciclovir um, so daß die Zellen durch das entstehende Produkt vergiftet werden.

### **II.2.6.4. konditioniertes Medium**

Die Mikrogliazellen werden für 12 h mit 2 µM AGE bzw. 2 µM BSA stimuliert und anschließend abzentrifugiert (800 x g). Der zellfreie Überstand mit den mikroglia sezernierten Stoffen wird als Medium für die murine Neuronenzelle Neuro-2A weiterverwendet. Um sicherzustellen, daß der Überstand zellfrei ist, wurde dieser aus mehreren unabhängigen Ansätzen für mindestens 3 Wochen im Brutschrank inkubiert, wobei in keinem Fall Mikrogliazellen gefunden wurden.

Für Inhibitorstudien werden die Mikroglia mit einem Inhibitor präinkubiert, nach der Präinkubationszeit mehrfach in einem Puffer (PBS) gewaschen, und mit frischem Medium versorgt. Für die verschiedenen Inhibitoren variiert die Präinkubationszeiten von 30 min bis zu drei Stunden. Danach erfolgt die oben beschriebene Verfahrensweise zur Herstellung des konditionierten Mediums. Konditioniertes Medium wurde mit Microsep Ultrafiltrationseinheiten (Filtron) ultrafiltriert. Der Überstand wurde in dem ursprünglichen Volumen in frischem Medium aufgenommen. Diese Ansätze, sowie die Filtrate wurden in

Proben bezüglich der Sterilität für 3 Wochen getestet. Für Dialyseverfahren wurden sterile Cellulose-Ester-Dialyse-Membranen (Spectra/Por Biotech.Spectrum) der Ausschlußgrenzen 15 kDa, 30 kDa und 50 kDa verwendet.

## **II.2.6.5. Zytotoxizitätstests**

### **MTT-Test**

Die metabolische Aktivität der Zellen wird hier durch die intrazelluläre Reduktion eines Tetrazoliumsalzes gemessen, die in intakten Zellen an der inneren Mitochondrienmembran stattfindet. Diese Reaktion wird hauptsächlich durch die Succinat-Dehydrogenase und die Cytochrom-Dehydrogenase gefördert, wobei die Menge des gebildeten Formazans proportional zur Anzahl der lebenden Zellen ist. In 96well-Reaktionsgefäßen werden  $3 \times 10^5$  Zellen/well ausbracht und 2 Tage inkubiert. Die Testsubstanzen werden mit frischem Medium auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht. Nach der Inkubation wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und jeweils 100 µl Medium ohne Phenolrot und 25 µl MTT Stocklösung (1,5 mg/ml) zugegeben. Nach 4 h Inkubation wird der Überstand abgesaugt und die gebildeten Formazankristalle durch Zugabe einer Lösung aus EtOH/DMSO 1:1 gelöst. Die Platten werden entweder 10 min geschüttelt oder 3 min im Ultraschallbad behandelt. Die Messung der gebildeten Farbstoffmenge erfolgt im Elisa Reader bei 550 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm.

### **LDH- Test**

Dieser Test erfaßt die Membranintegrität der Zellen nach Toxin-Behandlung und basiert auf der Bestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH) Aktivität im Kulturüberstand. Das zytoplasmatische Enzym Laktat-Dehydrogenase gelangt bei Beschädigung der Plasmamembran in den Überstand und kann dort gemessen werden. Die Menge an freigesetztem LDH ist dabei proportional der Zahl der beschädigten oder lysierten Zellen. Es wurde das "Cytotoxicity detection Kit" der Firma Roche Diagnostics verwendet.

Die LDH-Aktivität wird enzymatisch über die Umsetzung von Laktat zu Pyruvat erfaßt. Das dabei entstehende  $\text{NADH H}^+$  wird zur Reduktion eines Tetrazoliumsalzes zu Formazan genutzt. Dies wird im Elisa-Reader bei 490 nm gemessen, bei einer Referenzwellenlänge von 630nm.

Die Zellen werden wie beschrieben in 96-well Platten ausgesät, die Inkubation mit AGEs erfolgt in DMEM 1% FKS, um den hohen LDH -Hintergrund des Serums zu minimieren. Je 50µl der zellfreien Überstände werden in eine frische MTP überführt, mit 50µl

Reaktionsmix gemischt und zur Farbentwicklung 15-30 min in der Dunkelheit inkubiert. Die Indikatorreaktion wird durch Zugabe von 10µl HCl (1N) pro well gestoppt und gemessen. Hintergrundkontrolle ist Medium. Als Negativkontrolle dienen unbehandelte Zellen, die maximale Menge LDH im Überstand wird durch Lyse von Zellen mit 1% Triton ermittelt. Um einen evtl. Einfluss der Testsubstanzen auf die LDH-Aktivität auszuschliessen, werden diese direkt in Medium verdünnt und getestet.

Berechnung (alle Werte abzüglich Hintergrund) :

$$\text{Anzahl der geschädigten Zellen in \%} = \frac{\text{Probe - Kontrolle}}{\text{Maximalwert - Kontrolle}} \times 100$$

## II.2.7. Molekularbiologische Methoden

### II.2.7.1. Plasmide

Die Plasmide mit den DNA-Sequenzen des deletierten gp91<sup>phox</sup>, der Hybridisierungsprobe aus dem 3'-Bereich der genomischen gp91<sup>phox</sup> DNA (3'-probe) und der Hybridisierungsprobe mit der Neomycin DNA Sequenz (neo-probe) wurden freundlicherweise von Prof. M.C. Dinauer (Herman B. Wells center for pediatric research, 1044 W. Walnut Street, Indianapolis, IN 46202) zur Verfügung gestellt.

### II.2.7.2. Transformation von E.coli

100 µl kompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut und mit 0,1-1,0 µg Plasmid-DNA versetzt. Der Transformationsansatz wird gemischt und für 30-40 min auf Eis inkubiert, um das Anlagern der zu transformierenden DNA an die Bakterien zu ermöglichen. Nach einem 2minütigen Hitzeschock bei 42°C und 5minütigem Abkühlen auf Eis werden die Zellen mit 0,8 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C unter Schütteln gezüchtet. 100 bis 200 µl der Zellsuspensionen werden auf geeignete Selektionsplatten ausplattiert und 1-2 Tage bei 37°C inkubiert.

Material zur Klonierung von DNA-Fragmenten

LB-Medium: 10 g	Trypton
5 g	Hefe-Extrakt

5 g	NaCl
4 ml 1M	NaOH
ad 1000 ml H <sub>2</sub> O	

LB-Platten:	1,5% Ampicillin	Bacto-Agar (Sigma; Stocklösung 50 mg/ml) Ampicillin wird mit einer Endkonzentration von 50 mg/ml in LB-Medium und LB-Platten eingesetzt.
	Bacto-Agar Bacto-Trypton Bacto-Hefe-Extrakt	(Difco)

### II.2.7.3. Plasmid-DNA Isolierung

Mini-Extraktion der Plasmid-DNA

Von einer Übernachtskultur in 3 ml LB-Medium werden 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und 15 sec zentrifugiert. Die Bakterien werden dann durch Vortexen in 100 µl Lösung 1 suspendiert. Danach werden 200 µl Lösung 2 zugegeben und nach erneutem Vortexen 150 µl Lösung 3. Nach kurzem Mischen wird 2 min bei RT inkubiert und anschließend für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein mit 400 µl Phenol/Chloroform (1:1/v:v) vorbereitetes Eppendorfgefäß überführt und für 5 sec gemischt. Nach 1-minütiger Zentrifugation wird der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß mit 300 µl Isopropanol gegeben und nach 5 min Inkubation bei RT 10 min zentrifugiert. Das Präzipitat wird in 70% Ethanol gewaschen und 2 min zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wird in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Für einen Restriktionsverdau werden 10-20 µl der Plasmidlösung eingesetzt.

Lösungen der Mini-Extraktion von Plasmid-DNA

Lösung 1:	50 mM 25 mM 10 mM	Glukose Tris-HCL pH 8,0 EDTA pH 8,0
Lösung 2:	0,2 M 1%	NaOH SDS
Lösung 3:	5 M	KOAc

### II.2.7.4. Restriktionsverdau der Plasmid-Fragmente

Die DNA wurde in dem vom Hersteller des Enzyms vorgeschlagenen Reaktionspuffer mit

2-3 U der jeweiligen Restriktionsendonuklease pro  $\mu\text{g}$  DNA gemischt. Das Reaktionsvolumen betrug dabei mindestens das 10-fache des Volumens der zugesetzten Enzym-Lösung. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$  für mindestens eine Stunde. Anschließend wurde ein Aliquot auf ein Agarosegel aufgetragen.

### **II.2.7.5. Auftrennung von DNA-Fragmenten auf Agarosegelen durch Elektrophorese**

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,8-1,5%ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in TAE durch Kochen gelöst und in Gegenwart eines Kammes in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Die DNA-Proben wurden in Ladepuffer (10 mM EDTA, 10% Glycerin, 0,1% SDS, 0,02% Bromphenolblau) aufgenommen und in die Taschen des mit TAE überschichteten Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte für 1-2 h bei 80-100 V. Die Gele wurden dann in einer Etidiumbromidlösung gefärbt, mit Wasser gewaschen und anschließend durch Fluoreszenz über einem UV-Transilluminator (366 nm) sichtbar gemacht.

### **II.2.7.6. Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Nach der Auftrennung der restringierten DNA durch Elektrophorese auf einem Agarosegel werden die gewünschten DNA-Banden aus dem Agarosegel geschnitten und über Bindung an Silikatpartikel isoliert (GeneClean Kit, Dianova, Hamburg).

### **II.2.7.7. Digoxigenin Markierung der DNA**

Mit Hilfe von Zufallsprimern wird die DNA mit Digoxigenin (DIG)-dUTP markiert. Hier wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren (Boehringer Mannheim).

### **II.2.7.8. Hyaluronsäure-Agarosegel**

Ein 0,5% Agarosegel wurde hergestellt, durch das Einlösen von 0,6 g Agarose in 108 ml Wasser in einem kochenden Wasserbad für 20 min. Die Agaroselösung wurde in ein  $48^\circ\text{C}$  warmes Wasserbad transferiert, für 15 min mit 12 ml vorgewärmten 10 x TAE Puffer (pH 7,9) vermischt. Diese Lösung wurde verwendet, um ein 3 mm dickes Gel zu erzeugen. Dieses stand für 15 min, wurde anschließend mit 100 ml TAE Puffer bedeckt und unter

einer Plastikfolie über Nacht bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Für den Gellauf wurde das Gel mit TAE Puffer bedeckt, so daß eine ca. 2 mm dicke Pufferschicht entstand. Die Proben mit ca. 7 µg HA in 14 µl Gesamtvolumen, das mit 2 µl 2 M Sukrose in TAE gemischt wurde. Die Elektrophorese wurde bei RT für 8 Stunden durchgeführt, mit einer Spannung von 50 V (2,5 V/cm).

Nach dem Gellauf wurde das Gel in eine Lösung mit 0,005% Stains-All Lösung in 50% Ethanol gelegt. Das Gel wurde über Nacht lichtgeschützt bei RT gelagert. Um das Gel zu entfärben, wurde es in Wasser transferiert und im Dunkeln für 2 Tage gelagert. Das entgültige Entfärben erfolgt durch die Lichtexposition für etwas 30 min bei RT.

### **II.2.7.9. Gelretentionsanalyse (“Electrophoretic Mobility Shift Assay”, EMSA)**

#### **Herstellung von Kernproteinextrakten**

Die Makrophagen wurden in PBS gewaschen, aus den Gewebekulturflaschen geschabt und anschließend durch Zentrifugation gesammelt. Die Pellets wurden in 0,4 ml hypotonischem Lysispuffer aufgenommen bestehend aus: 10 mM Hepes (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT and 0,5 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF). Nach 15 min auf Eis wurde Nonidet P40 zugegeben (Endkonzentration 0,5 %). Die Zellen wurden für 10 s geschüttelt und anschließend für 30 s bei 12000 g und 4°C abzentrifugiert. Das schwer resuspendierbare Kernpellet der N11-Mikroglia wird in 100-140µl Puffer C (20 mM Hepes (pH 7,9), 0,4 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT and 1 mM PMSF) aufgenommen. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wird das Pellet weiter zerkleinert. Eine sorgfältige Durchmischung ist wesentlich für eine hohe Ausbeute an Kernproteinen. Anschließend wird der Ansatz 30 min bei 4°C geschüttelt, um die salzlöslichen Kernproteine zu extrahieren. Durch die folgende Zentrifugation für 5 min bei 12000 rpm werden die Kernmembranfragmente sowie die chromosomale DNA abgetrennt. Der kernproteinhaltige Überstand wird in 10 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration werden die Kernextrakte in Gelretardationsexperimenten eingesetzt.

## **Bestimmung der Proteinkonzentration von zellfreien Extrakten mittels "Bio-Rad-Protein-Microassay"**

Hierzu wird der Farbstoff Coomassie Brilliantblau G-250 verwendet, der in saurer Lösung mit Proteinen blaue Komplexe bildet, vermutlich durch die Reaktion mit freien NH<sub>2</sub>-Gruppen von Argininresten. Diese Komplexbildung geht mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm einher. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration von zellfreien Extrakten wird ein 2 bis 3 µl Aliquot des Rohextraktes in Einmalküvetten mit H<sub>2</sub>O zu einem Endvolumen von 800 µl verdünnt und mit 200 µl des Farbstoffkonzentrats, einem 5fach konzentrierten Bradfordreagenz, versetzt. Nach gründlichem Mischen und 5 bis 60 minütiger Inkubation bei RT wird die Extinktion der Proben bei 595 nm gegen eine Leerprobe gemessen. Um eine Eichgerade zu erstellen wird parallel hierzu die Absorption von 1 bis 7 µl eine BSA-Stammlösung (1 mg/ml in H<sub>2</sub>O) bestimmt. Dadurch kann der Proteingehalt der Proteinextraktaliquots bestimmt werden.

## **Radioaktive Markierung der doppelsträngigen Oligonukleotide und Reinigung der DNA-Sonde**

STE-Puffer:	NaCl	100 mM
	Tris-HCL pH 7,5	20 mM
	EDTA pH 8,0	10 mM

Zur Markierung des durch die Hybridisierung erzeugten NF-κB Oligonukleotids wird ein 20 µl Ansatz zusammenpipettiert:

H <sub>2</sub> O	11 µl
10x One-for-All Buffer (Pharmacia)	2 µl
ds Oligonukleotid (1 µg/µl)	1 µl
dATP (2 mM)	1 µl
dGTP (2 mM)	1 µl
dTTP (2 mM)	1 µl
α- <sup>32</sup> P-dCTP (10 µCi/µl)	1 µl
Klenow-Enzym (1 U/µl)	2 µl

Nach 30-60minütiger Inkubation bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe von 1µl 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt und das Gemisch auf Eis gestellt. Im Anschluß hieran werden die nicht eingebauten Nukleotide von den markierten Oligonukleotiden durch Säulenreinigung abgetrennt. Hierzu wird der Ansatz mit 49 µl STE versetzt und dann über eine mit 70 µl STE-äquilibrierten „NucTrap<sup>TM</sup> push column" (Stratagene) gegeben. Das Eluat wird in



einem Mikroreaktionsgefäß aufgefangen und mit demjenigen, das durch Waschen der Säulenmatrix mit 70 µl STE erhalten wurde, vereinigt. Nach Bestimmung der spezifischen Aktivität der im Eluat enthaltenen gereinigten DNA-Sonde wird ein Aliquot der Lösung mit STE verdünnt und direkt für den EMSA verwendet. Die restliche Lösung wird in unverdünnter Form bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und bei Bedarf aufgetaut. Die in den Gelretardationsexperimenten eingesetzten radioaktiv markierten DNA-Sonden sollten nicht älter als 5 Tage sein.

### **Bestimmung der spezifischen Aktivität einer radioaktiv markierten DNA-Sonde**

Nach dem Auftragen von 1 µl einer gereinigten, radioaktiv markierten DNA-Sonde auf einen Whatman GF/C-Filter wird dieser luftgetrocknet und mit einer Pinzette in ein Szintillationsröhrchen mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Beckman) überführt. Anschließend wird die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen und mit Hilfe der gezählten cpm die spezifische Aktivität der Sonde berechnet, die 4 bis  $4,5 \times 10^7$  cpm/µg DNA betragen sollte.

### **Protein-DNA-Bindereaktion**

3x Bindepuffer:	HEPES pH 7,9	60 mM
	KCL	150 mM
	EDTA pH 8,0	3 mM
	DTT	12 mM
	Ficoll	12 %
	Bei $-20^{\circ}\text{C}$ lagern	
Farbpuffer:	HEPES pH 7,6	10 mM
	Glycerin	10 %
	Bromphenolblau	0,01 %
	Bei $4^{\circ}\text{C}$ aufbewahren	

### **Hybridisierung von synthetischen, komplementären ss Oligonukleotiden**

Die ss Oligonukleotide wurden in der Physiologischen Chemie der Universität Würzburg synthetisiert und nach Schutzgruppenabspaltung in lyophilisierter Form gelagert. Nach Aufnahme dieser Oligonukleotide in 50 µl  $\text{H}_2\text{O}$  wird die Konzentration spektrometrisch bestimmt, mit  $\text{H}_2\text{O}$  eine Endkonzentration von 1 µg/µl eingestellt und in 50 µl Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Hybridisierung werden je 50 µl der komplementären ss Oligonukleotide in einem Mikroreaktionsgefäß mit Schraubdeckelverschluß zum Schmelzen eventueller Doppelstrangbereiche 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Während der anschließenden schrittweisen Abkühlung (10 min  $65^{\circ}\text{C}$ , 10 min  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 min RT) erfolgt

die Zusammenlagerung der komplementären Einzelstränge zu Doppelsträngen. Diese können direkt zur Herstellung der radioaktiv markierten DNA-Sonde in Gelretardationsexperimenten eingesetzt, oder in 10 µl Aliquots bei -20°C gelagert werden.

### **Radioaktive Markierung**

Die Oligonukleotide der Konsensussequenz für NF-κB (5' -AGC TTC AGA GGG GAC TTT CCG AGA GG - 3' und 5' TCG ACC TCT CGG AAA GTC CCC TCT GA-3') wurden in einer Hybridisierung eingesetzt, um eine doppelsträngige Probe zu bilden. Die Enden wurden mit Klenow-Polymerase <sup>32</sup>P-markiert. Die Bindereaktion wurde in einem Volumen von 15 µl auf Eis durchgeführt. Diese enthielt 5 µl 3-fach Bindepuffer (60 mM Hepes (pH 7.9), 1 mM DTT, 3 mM EDTA, 150 mM KCl and 12% Ficoll), 20000 cpm der <sup>32</sup>P-markierten DNA-Probe, 7 µg Kernproteine, und 2 µg poly-dIdC (Boehringer-Mannheim). Nach 30 min wurden die Komplexe auf einem nativen 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Phosphoimager aufgenommen. Für die Supershift Analyse wurde der anti-p50-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Inc) in dem Ansatz der EMSA Standardreaktion in einer Konzentration 1 mg/ml 20 min vor der Zugabe der radioaktiv markierten Oligonukleotide verwendet.

### **II.2.7.10. Analyse von Proteinen**

#### **Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli.**

5x Laufpuffer:	Tris	15,1 g
	Glycerin	94,0 g
	10 % SDS	50,0 ml
	H <sub>2</sub> O ad 1 l	
4x Laemmlipuffer:	87% Glycerin	4,0 ml
	10% SDS	3,0 ml
	2 M Tris-HCL (pH 6,8)	2,0 ml
	β-Mercaptoethanol	0,75 ml
	Bromphenolblau	10,0 mg
	H <sub>2</sub> O ad 10 ml	
	Bei -20°C lagern	

Die Auftrennung und Analyse von Proteingemischen erfolgt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in vertikalen, diskontinuierlichen Gelen, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel. Vor der Elektrophorese wird durch Erhitzen der Proteinprobe in Laemmli-Puffer, der  $\beta$ -Mercaptoethanol und SDS enthält, die Form und die Eigenladung der Proteine eliminiert, so daß die Proteine in der SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden.

In dieser Arbeit wurden 12%ige SDS-Polyacrylamid-Minigele verwendet (10 x 8 cm). Zur Herstellung werden folgende Lösungen zusammenpipettiert, wobei APS als Radikalbildner und TEMED als Katalysator der Polymerisationsreaktion erst unmittelbar vor dem Gießen des Trenn- bzw. Sammelgels zugegeben werden:

	Trenngel (12%)	Sammelgel (5%)
H <sub>2</sub> O	3,3 ml	2,7 ml
30% Acrylamidstammllösung mit 0,8 % Bisacrylamid (Roth)	4,0 ml	0,67 ml
1,5 M Tris-HCL pH 8,8	2,5 ml	-
1,0 M Tris-HCL pH 6,8	-	0,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,04 ml
10% APS	0,1 ml	0,04 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml

Zunächst wird die Trenngellösung bis ca. 3 cm unterhalb des oberen Glasplattenrandes zwischen zwei gut gereinigten Glasplatten gegossen, die durch 1,5 mm dicke Abstandshalter voneinander getrennt sind. Zur Ausbildung einer geraden Trenngelgrenze wird die Trenngellösung mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet und polymerisiert anschließend für etwa 30 min bei RT. Das Butanol wird dekantiert, die Sammelgellösung auf das Trenngel pipettiert und ein Teflonkamm (10-spurig) eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wird der Kamm vorsichtig herausgezogen, das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt und die Pufferkammer mit 1x Laufpuffer gefüllt. Vor dem Auftragen der in Laemmli-Puffer erhitzten Proteinproben werden die Taschen mit 1xLaufpuffer gespült und eventuell vorhandene Luftblasen am unteren Gelrand entfernt. Parallel zu den Proben wird ein Proteinindikator („Rainbow-Indikator“) zur Molekulargewichtsbestimmung der zu analysierenden Proteine aufgetragen. Der Gellauf erfolgt für etwa 1 h bei 150-170 V. Nach der Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine entweder durch Gelfärbung mit Comassie Brilliantblau sichtbar

gemacht oder zur weiteren Analyse durch Western-Blot-Experimente auf Nitrozellulose geblottet.

### **Färben von Proteingelen mit Comassie Brillantblau und Trocknen von Proteingelen**

Fixierlösung:	Methanol	50,0 %
	Essigsäure	10,0 %
Färbelösung:	Methanol	50,0 %
	Essigsäure	10,0 %
	Comassie Brillantblau	0,05 %
Entfärber:	Methanol	5,0 %
	Essigsäure	7,0 %

Nach der Elektrophorese wird eine der beiden Glasplatten mit einem Spatel vorsichtig abgetrennt und das Sammelgel mit einem Skalpell abgeschnitten. Das Trenngel wird daraufhin 30 min in Fixierlösung, anschließend 30 min in Färbelösung geschwenkt und unter mehrmaligem Wechseln des Entfärbers entfärbt, bis das Proteinbandenmuster deutlich zu erkennen ist. Das entfärbte SDS-Gel wird luftblasenfrei in eine nasse Zellophanfolie eingeschlagen und zwischen zwei Lagen feuchtem Whatman-Papier auf einem Vakuum-Geltrockner für 2 h bei 80°C getrocknet.

#### **II.2.7.11. Immunoblot (Western Blot)**

Der Elektrotransfer von Proteinen dient der Übertragung elektrophoretisch getrennter Proteine auf proteinbindende Oberflächen, auf denen die Proteine einer weiteren Reaktion mit Makromolekülen zugänglich sind.

Nach erfolgtem SDS-Gellauf wird das Gel vermessen und 30 min in Transferpuffer äquilibriert. Vor dem Zusammenbau der Blotting-Apparatur werden sechs Whatman-Papiere und die Nitrozellulosemembran exakt auf Gelgröße zugeschnitten. Die Nitrozellulosemembran wird ebenfalls in Transferpuffer für 30 min äquilibriert, und die Whatman-Papiere angefeuchtet. Die Bestandteile werden wie folgt angeordnet:

Wattepad  
3x Whatman-Papier  
SDS-Gel  
Nitrozellulose  
3x Whatman-Papier  
Wattepad

Alle Komponenten müssen ausreichend angefeuchtet sein, um Luftblasen im System zu vermeiden. Diese würden zu einer Unterbrechung des Stromflusses führen und damit den Proteintransfer verhindern. Der Transfer erfolgt mit vorgekühltem (4°C) Transferpuffer für ca. 1,5 h bei 150 V/180 mA und bei 4°C. Als Kontrolle für die Effizienz des Transfers färbt man das Gel anschließend mit Comassie-Blau.

Transfer-Puffer:	12 g 57,6 g 800 ml ad 4 l H <sub>2</sub> O	Tris Glycerin Methanol
PBS-T:	1x 0,2 %	PBS Tween 20

### **Färben des gesamten Nitrozellulosefilters mit Ponceau S**

Ponceau S-Lösung:	Ponceau S TCA	2 % 2 %
TBS:	Tris-HCL (pH 8,0) NaCl	10 mM 150 mM
TBS/Tween:	TBS/0,05 % Tween 20	

Zur Überprüfung der Gleichmäßigkeit und der Effizienz des Blottvorgangs auf die Membran wird diese nach dem Blotten reversibel mit Ponceau S gefärbt. Hierzu wird der nitrozellulosefilter 2-5 min bei RT in Ponceau S Lösung geschwenkt und anschließend mit H<sub>2</sub>O gespült. Nach dem Abschneiden der Indikaturspur wird der restliche Filter bis zum vollständigen Entfärben in TBS/Tween gewaschen (2x 5 min).

### **Immunochemischer Antigennachweis**

Vor der Immunodetektion wird die Nitrozellulose über Nacht in Blockpuffer aufbewahrt, um unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern. Anschließend wird die Membran 3-4x mit 10 ml Waschpuffer behandelt. Den ersten Antikörper gibt man in einer Verdünnung von 1:1000 in 10 ml Waschpuffer unter Zusatz von 2% BSA auf die Membran und läßt diese 1 h unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubieren.

Nach erfolgter Inkubation mit dem ersten Antikörper wird die Membran sorgfältig 3x 10 min mit Waschpuffer behandelt. Anschließend wird der zweite Antikörper mit dem Reporterenzym in einer Verdünnung von 1:1000 in 10 ml Waschpuffer zugegeben. Nach 90-minütiger Inkubationszeit wird 3x mit 10 ml Waschpuffer für jeweils 10 min gewaschen. Schließlich werden die Proteine, die durch den Primärantikörper erkannt wurden, mittels eines „enhanced chemiluminescence (ECL)“-Assays unter Verwendung der Lösungen des „ECL™ Western blotting detection reagents“-Kits (Amersham) und durch anschließende 1-30minütige Exposition mit einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

## II.2.7.12.Southern Blot

$1 \times 10^7$  Zellen werden mit eiskaltem PBS gewaschen, in 1 ml TE und 9 ml Lysis-Puffer aufgenommen und 1 h bei 37°C inkubiert. Diese Lösung wurde für 12 h mit 100 µg/ml Proteinase K behandelt, auf 50°C erhitzt und mit dem gleichen Volumen Phenol für 10 min gemischt und abzentrifugiert. Anschließend wurde 2x mit Chloroform extrahiert, darauf mit Isopropanol gefällt. Nach der Dialyse für 3x 2h wurde die DNA mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten.

Lysispuffer:

10 mM	Tris/HCl	(pH 8,0)
100 mM	EDTA	(pH 8,0)
0,5%	SDS	
20 µg/ml	Pankreatische RNase	(Boehringer Mannheim)

Gellauf

10 µg hydrolysierte, genomische DNA wurde auf einem 0,8% igem Agarosegel für 4 h bei 75V aufgetrennt. Darauf folgte die Behandlung des Agarosegels mit 0,25 M HCl sowie die Behandlung mit der Denaturierungslösung und der Neutralisationslösung für jeweils 30 min.

Denaturierungslösung:

0,5 M	NaOH
1,5 M	NaCl

Neutralisationslösung:

1,5 M	NaCl	
0,5M	Tris/HCl	(pH 7,5)
1 mM	EDTA	(pH 8,0)

## Blotvorgang

Hierzu wurde ein Kapilarblot mit einer Nylon Membran (Roche) aufgebaut, der Blotvorgang wurde für 16 h in dem Blotpuffer 10x SSC durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit 2x SSC, 50 mM Tris/HCl gewaschen, getrocknet und durch UV-Bestrahlung (150 mJ/cm<sup>2</sup>) fixiert.

Um eine bereits hybridisierte Membran wiederverwenden zu können wurde diese in sterilem Wasser gespült, dann 2x 15 min bei 37°C, anschließend in einer Lösung, die 0,2 M NaOH und 0,1% SDS beinhaltet, und schließlich in 0,1% iger SDS Lösung gewaschen.

## Hybridisierung

Vorhybridisierung der Membran mit der Hybridisierungslösung bei 42°C für 30 min im Schüttler. Die DIG-markierte DNA-Probe (4,8 µl) wurde für 5 min durch aufkochen denaturiert, anschließend auf Eis abgekühlt und zu der vorgewärmten Hybridisierungslösung zugegeben.

### Hybridisierungslösung:

5x	SSC
N-lauroylsarcosine	0,1% (w/v)
SDS	0,02%
Blockreagenz	1%
	ad 20 ml H <sub>2</sub> O

Nach 6 h bis 16 h auf Eis wurde die Membran bei RT für 2 x 5 min in 2x SSC gewaschen, anschließend in 0,1% SDS ebenfalls bei RT. Im Bedarfsfall wurde die Membran weiterhin mit 0,1x SSC für 2x 15 min und 1x in 0,1% SDS bei 68°C gewaschen.

## Detektion

Nach 1-5 min im Waschpuffer (1x) wurde die Membran für 30 min in 100 ml Blocklösung inkubiert. Das Anti-DIG-AP-Konjugat (75 mU/ml) wurde 1:5000 in der Blocklösung verdünnt eingesetzt. Die Membran wurde für 30 min in 20 ml dieser Antikörperlösung inkubiert, anschließend für 2x 15 min in 100 ml Waschpuffer gewaschen. Darauf folgte die Äquilibration in 20 ml Detektionspuffer für 2-5 min. Die Detektionslösung (CSPD) wurde in einer Endkonzentration von 0,25 mM eingesetzt, die Flüssigkeit für 5 min abgetropft und die Membran für 15 min bei 37°C getrocknet. Der Röntgenfilm wurde für 15-25 min bei RT aufgelegt. Die Blocklösung, das Anti-DIG-AP-Konjugat und die CSPD Lösung wurden von Boehringer Mannheim bezogen.

## II.2.7.13.RT-PCR

Zur Detektion von IL-6 and TNF- $\alpha$  RNA-Spezies-Expression mittels RT-PCR wurden die Zellen ( $1 \times 10^6$ ) in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in RPMI oder DMEM inkubiert. Nach Zugabe von BSA (2 $\mu$ M) oder BSA-AGEs (2 $\mu$ M) für 3h wurden die Zellen mit 1 ml Guanidiniumthiozyanat lysiert. Um die Gesamt-RNA zu extrahieren wurde das Zellysate mit 2 M Natriumazetat (pH 4), Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol gemischt und die Suspension für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 15000 g für 15 min und 4°C wurde die obere wässrige Phase, die die Gesamt-RNA enthält, entfernt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol gefällt. Die Proben wurden für 30 min bei 4°C inkubiert und bei 15000 g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde in Guanidiniumthiozyanat erneut gelöst und in einem gleichen Volumen Isopropanol gefällt. Anschließend wurde es für 30 min bei 4°C inkubiert und bei 15000 g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 75% Ethanol resuspendiert, im Vakuum getrocknet und in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen.

Für die RT-PCR wurden 5  $\mu$ g der Gesamt-RNA in 32  $\mu$ l DEPC-behandeltem Wasser mit 3  $\mu$ l Oligo-dT-Primer (100 ng/ml) gemischt und bei 65°C für 5 min erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden folgende Reagentien zugegeben: 5  $\mu$ l Dithiothreitol (0,1 M), 1  $\mu$ l RNase Block II (20U/ $\mu$ l), 3  $\mu$ l dNTP-Gemisch (2 mM jeweils) und 1  $\mu$ l "Moloney murine leukemia virus" Reverse Transcriptase (MMLV-RT, 20U/ $\mu$ l). Das Gemisch wurde für 1h bei 37°C inkubiert und bei -20°C gelagert. Die cDNA wurde in 250  $\mu$ l Gefäßen in der Anwesenheit von 1  $\mu$ M 5' und 3' Primern, dNTPs (jeweils 200  $\mu$ M) und 2,5 U Taq-DNA-Polymerase (Promega) in einem Endvolumen von 100  $\mu$ l eines 1xTaq-DNA-Puffers (10 mM Tris-HCl, pH 8.5; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 50 mM KCl) amplifiziert. Die PCR wurde mit einem anfänglichen Denaturierungsschritt bei 91°C für 3 min durchgeführt. Nachfolgend wurden 30 Zyklen wie folgt durchgeführt: 1 min Denaturierung bei 91°C, 1 min Anlagerung bei 60°C und 1 min Verlängerung bei 72°C. Die Reaktionsprodukte wurden durch Elektrophorese nachgewiesen, wobei 10  $\mu$ l des Reaktionsgemisches mit 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und sichtbar gemacht wurden.



# III Ergebnisse

## III.1. Die Aktivierung phagozytierender Zellen

Ein herausragendes Merkmal der Alzheimer'schen Erkrankung (AD) ist die Bildung von sogenannten Plaques. Im Folgenden soll näher darauf eingegangen werden, welche Bestandteile der AD-typischen Plaques die Aktivierung von professionellen Phagozyten im Gehirn, den sogenannten Mikroglia, bewirken. Außerdem wurde die Aktivierung von Makrophagen untersucht, die aus dem Blutstrom in das Hirngewebe einwandern können, und wie diese aktivierten Phagozyten zu der Neurodegeneration beitragen. Als wesentliche Komponenten dieser Plaques stehen beta-amyloid (A $\beta$ ) und AGEs (Advanced Glycation Endproducts) im Vordergrund der Untersuchungen. Sowohl A $\beta$  als auch AGE werden über große Zeiträume hinweg strukturell umgebildet. Anfangs vorhandene sogenannte diffuse Plaques aus A $\beta$  verdichten sich und nehmen verstärkt eine fibrilläre  $\beta$ -Faltblattstruktur an. Das A $\beta$  wird durch Glykosilierungen quervernetzt, aber auch andere Proteine oder Lipide wie das Apolipoprotein E können glykiert werden. Erst als fibrilläre A $\beta$ -Strukturen beziehungsweise als hochgradig quervernetzte AGEs sind die modifizierten Strukturen in der Lage die Phagozyten zu aktivieren (Combs et al., 1999, Neumann et al., 1999).

### Herstellung und Charakterisierung der AGEs und des fibrillären A $\beta$

Da die AGEs bezüglich ihrer Strukturen sehr heterogen sind, wurden charakteristische Merkmale bestimmt, um diese eventuell mit einer neurotoxischen Wirkung in Beziehung bringen zu können. Die direkte Neurotoxizität von Modell-AGEs ist von dem verwendeten Protein und von dem verwendeten Zucker abhängig. Hier zeigte sich, daß bei zunehmendem Grad der AGE Modifikation, die optische Dichte (OD) pro mg Protein anstieg. Die AGE bedingte Radikalproduktion korreliert dabei mit der direkten Neurotoxizität (Loske et al., 1998).

Stellvertretend für verschiedene Proteine wurde BSA (Bovines Serumalbumin) eingesetzt, das in einem beschleunigten Prozeß in ein BSA-AGE (Bovines Serumalbumin "Advanced Glycation Endproduct") modifiziert wird, im Folgenden auch kurz als AGE bezeichnet. Das eingesetzte Serumalbumin wurde unter Zugabe von Glukose durch nichtenzymatische Prozesse bei einer Temperatur von 50°C modifiziert. Das resultierende AGE wird als "modifiziert" oder "gealtert" bezeichnet (Tab.2). Das modifizierte Protein wurde bezüglich

der Änderungen des AGE-Gehalts pro Milligramm Protein, der Änderungen der Fluoreszenz (Anregung bei 370nm, Emission bei 440nm), und der OD<sub>360nm</sub> und OD<sub>400nm</sub> untersucht. Nach einer sechswöchigen Inkubationszeit blieben diese Werte konstant, so daß eine maximale Modifikation des AGEs angenommen wurde. Für die Aktivierung der Phagozyten wurde ein in 6 Wochen bei 50°C maximal modifiziertes AGE (6w) eingesetzt. Um auszuschließen, daß die Aktivierung der Phagozyten auf Endotoxineffekten beruht, wurden deren Konzentration in den verwendeten Ansätzen bestimmt. Die Endotoxinwerte für AGE und BSA lagen bei 0,5 Units/mg Protein im Vergleich zu Lipopolysaccharid mit 0,5 Mio Units/mg Protein.

**Tabelle 2) Charakterisierung der eingesetzten BSA-AGEs**

	AGE (2w)	AGE (6w)
Zucker	Glukose	Glukose
Inkubationszeit	2 Wochen	6 Wochen
OD <sub>360</sub>	12	26
OD <sub>400</sub>	6	14
Protein [mg/ml]	11	23
OD <sub>360</sub> / mg	1,1	1,1
OD <sub>400</sub> / mg	0,5	0,6
Fluoreszenz [AU/mg]	6,7 x 10 <sup>6</sup>	8,1 x 10 <sup>6</sup>
Endotoxin [U/mg Protein]	0,5	0,5

Die A $\beta$ <sub>(25-35)</sub> Fibrillenbildung erfolgt bei Raumtemperatur spontan innerhalb von Minuten, wie anhand der Thioflavin T Untersuchung festgestellt wurde, während die Herstellung der A $\beta$ <sub>(1-40)</sub> Fibrillen 5 Tage bei 37°C dauerte. Das Kontrollpeptid A $\beta$ <sub>(scrambled)</sub> (A $\beta$ <sub>(sc)</sub>) mit der Zufallssequenz wurde unter den gleichen Bedingungen wie das A $\beta$ <sub>(1-40)</sub> inkubiert, zeigte aber keine Thioflavin T Fluoreszenz und bildet folglich keine fibrilläre Struktur aus. Die Endotoxinwerte von A $\beta$ <sub>(25-35)</sub> und A $\beta$ <sub>(1-40)</sub> lagen bei 0,2 beziehungsweise 0,3 Units/mg Protein.

### III.1.1. Indikatoren der Mikrogliaaktivierung

Die Reaktion der Mikroglia (N11) auf eine Stimulation mit gealtertem AGE wurde anhand der Phosphorylierungszustände von der SAP-K, ELK-1 und ATF-2 innerhalb einer Stunde nach Zugabe untersucht. Außerdem wurde die Anwesenheit von I- $\kappa$ B überprüft. Zu diesem Zweck wurden die Mikrogliazellen für 12 h in serumfreiem Medium gehalten, um eine Aktivierung durch das Serum zu vermeiden und die Zellen zu synchronisieren. Anschließend wurden die Zellen mit 2  $\mu$ M AGE stimuliert. Aus den N11 Mikrogliazellen wurde das Gesamtprotein isoliert und nach elektrophoretischer Trennung auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Mittels Antikörperbindung wurde die Änderung der Proteinkonzentration innerhalb der ersten Stunde nach Kontakt mit AGE verfolgt.

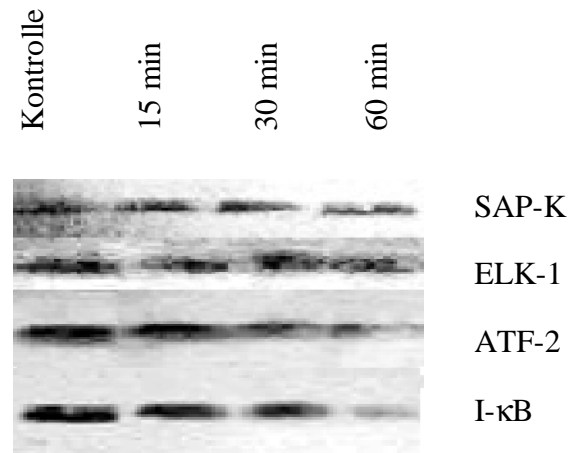
Hierbei sollte zunächst ein Indikator gefunden werden, der die Mikrogliaaktivierung als Reaktion auf AGE deutlich zeigt. Zusätzlich sollte dieser Indikator möglichst einen Zusammenhang zu der neurotoxischen Wirkung herstellen, die von den aktivierten Phagozyten des Gehirns ausgeht.

Da es sich bei Auslösung der Mikrogliaaktivierung eventuell um eine Stressantwort handelt, wurde zunächst die Signalkaskade der "Stress aktivierte Protein Kinase" (SAPK) untersucht. Diese SAPK aktiviert ihrerseits den Transkriptionsfaktor "ELK1" (ELK1). Um den aktivierten Zustand der SAPK und von ELK1 nachzuweisen, wurde in beiden Fällen ein phosphospezifischer Antikörper verwendet, der ausschließlich die aktivierte, phosphorylierte Form erkennt. Sowohl die SAPK als auch ELK1 zeigten bereits in der unbehandelten Kontrolle eine grundsätzliche Aktivierung, der keine auffällige Konzentrationsänderungen nach 60 min folgte (Abb. 5).

Der Transkriptionsfaktor ATF-2 wird ebenfalls durch die SAPK aktiviert. Auch hier wurde zum Nachweis einer Regulierung ein phosphospezifischer Antikörper eingesetzt. ATF-2 lag bereits in der unbehandelten Kontrolle aktiviert vor, die Konzentration der aktiven, phosphorylierten Form des ATF-2 nahm nach 30 bis 60 min ab (Abb. 5).

Eine weitere Signalkaskade, die durch vielfältige extrazelluläre Auslöser aktiviert werden kann ist die NF- $\kappa$ B Signalkaskade. Hier liegt der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B in einer inaktiven Form an I- $\kappa$ B gebunden im Zytosol vor. Durch die Aktivierung wird I- $\kappa$ B abgebaut und NF- $\kappa$ B freigesetzt. Der Transkriptionsfaktor kann dann in den Zellkern gelangen und zahlreiche Gene aktivieren. Dies führt zur Expression inflammatorischer Zytokine, oder auch zur Freisetzung von Radikalen wie dem Stickstoffmonoxid, die eventuell neurotoxische Auswirkungen haben können. Hier zeigte sich eine nahezu

vollständige Konzentrationsabnahme des I- $\kappa$ B nach 60 min (Abb. 5). Aufgrund des eindeutigen Abbaus des I- $\kappa$ B und der vielfältigen Genaktivierung, die durch NF- $\kappa$ B verursacht wird schien NF- $\kappa$ B der geeignete Indikator für die Mikrogliaaktivierung zu sein. Da der Abbau von I- $\kappa$ B alleine noch nicht hinreichend dafür ist, daß NF- $\kappa$ B tatsächlich freigesetzt wird, sollte dieses in einem direkten Verfahren nachgewiesen werden.

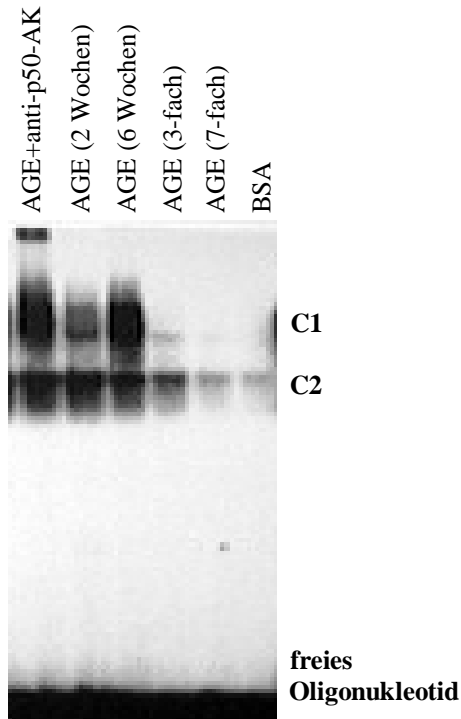


**Abb. 5) AGE induziert Veränderungen der Signaltransduktion in N11 Mikrogliazellen**  
 In dem Westernblot wurden jeweils 5  $\mu$ g Protein eingesetzt, die Antikörper I- $\kappa$ B Antikörper, Phosphospezifischer ATF-2 (Thr71) Antikörper, phosphospezifischer ELK1 Antikörper und phosphospezifischer SAPK/JNK(Thr183/Tyr185)Antikörper wurden in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt. Die stressinduzierte Signalkaskade SAP-K sowie der Genaktivator ELK-1 sind durch die AGE Behandlung nach einer Stunde unverändert, während der Transkriptionsfaktor ATF-2 eine Abnahme der aktiven Form zeigt, und I- $\kappa$ B ebenfalls nach einer Stunde weitgehend abgebaut ist.

### III.1.2. NF- $\kappa$ B als Indikator der zellulären Reaktion

Mit Hilfe der Gel-Retentionsanalyse ("electrophoretic mobility shift assay", EMSA) wurde nachgewiesen, daß es tatsächlich zu einer NF- $\kappa$ B Transduktion in den Zellkern kam. Die Menge des Proteins wurde mittels eines radioaktiv markierten NF- $\kappa$ B Oligonukleotids, das einen Teil der NF- $\kappa$ B Gensequenz enthält, ermittelt, wobei die quantitative Aussage nur bedingt genau ist. Die Makrophagenzelllinie J774A.1 wurde für 24 h mit 2  $\mu$ M AGE inkubiert, woraufhin die Isolierung der Kernproteine erfolgte (Abb. 6). Die Bindung der radioaktiv markierten Oligonukleotide war spezifisch für NF- $\kappa$ B, da sie durch Zugabe des nicht radioaktiv markierten Oligonukleotides im Überschuß verdrängt werden konnte (Abb. 6). Der Komplex C2 besteht aus dem p50-p50 Homodimer und wirkt nicht

genaktivierend (Vogt et al., 1998), während größere Dimere der Rel-Familie in der Lage sind, eine Genaktivierung zu bewirken. Diese Komplexe (C1) werden im Folgenden als aktiviertes NF- $\kappa$ B bezeichnet. Das Rel-Familienmitglied p50 wurde durch die Verwendung eines anti-p50-Antikörper nachgewiesen (Abb 6). Durch die zusätzliche Bindung des Antikörpers an den NF- $\kappa$ B-DNA-Protein-Komplex wurde die Mobilität im elektrischen Feld verlangsamt, so daß eine weitere Bande oberhalb des NF- $\kappa$ B-DNA-Protein-Komplex zu erkennen ist.



**Abb. 6) NF- $\kappa$ B wird in den Makrophagen durch unterschiedlich gealtertes BSA-AGE aktiviert**

In einem EMSA wurde die NF- $\kappa$ B Aktivierung untersucht. Dazu wurden die J774A.1-Zellen mit 2  $\mu$ M AGE beziehungsweise 2  $\mu$ M BSA für 24 h inkubiert. Der Einsatz von 2  $\mu$ M 6-wöchigem, maximal modifiziertem AGE (AGE, 6 Wochen) führt zu einer stärkeren Aktivierung als der von 2  $\mu$ M zweiwöchigem AGE (AGE, 2 Wochen). Von dem anti-p50-Antikörper wurden 2  $\mu$ g eingesetzt, und dadurch eine Verlangsamung des Komplexes aus Protein und DNA bewirkt. Der 3-fache (AGE, 3-fach) und der 7-fache Überschuß (AGE, 7-fach) nicht-radioaktiv markierter Oligonukleotide verringert die Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid (AGE-3-fach, AGE-7-fach), so daß der Komplexe C1 vollständig, der Komplex C2 zu größten Teilen reduziert wurde.

Hier zeigte sich, daß die AGE bedingte Aktivierung des NF- $\kappa$ B von dem Alter des verwendeten AGEs abhängig ist. Ein sechs Wochen bei 50°C gealtertes AGE aktiviert NF- $\kappa$ B in einem höheren Maße, als ein zwei Wochen bei 50°C gealtertes AGE (Abb. 6). Im weiteren wurde sechs Wochen gealtertes AGE eingesetzt, da längere Inkubationen des Proteins mit reduzierenden Zuckern bis zu 3 Monaten keine Veränderungen der Fluoreszenz und der Zellaktivierbarkeit zeigten, und somit angenommen werden konnte, daß eine maximale Zustandsänderung vorlag, und keine weiteren Modifikationen an dem AGE stattfanden.

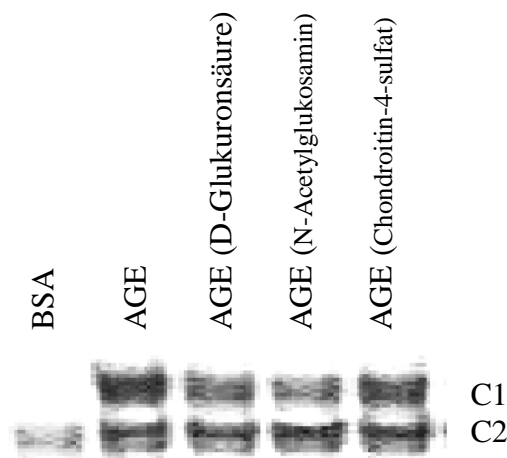
### **III.1.3. Einfluß der extrazellulären Matrix auf die NF-κB Aktivierbarkeit**

Proteoglykane wie Heparansulfat treten gemeinsam mit Aβ in senilen Plaques des AD Gehirns auf. Experimentelle Daten zeigen, daß die Interaktionen zwischen den Proteoglycanen und dem Peptid wichtig für die Bildung, Ablagerung und das Fortbestehen der senilen Plaques sind. Studien in Rattenhirn zeigen, daß das Kernprotein und die Heparansulfatketten für die Entstehung der fibrillären amyloid Strukturen in vivo benötigt werden (Snow et al ,1994).

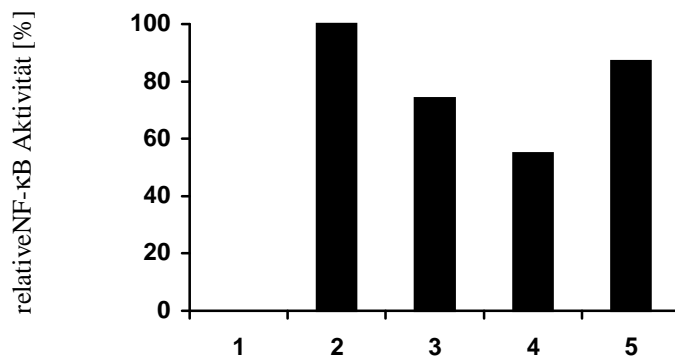
#### **III.1.3.1. Beeinflussung der NF-κB Aktivierung durch Glycosaminoglykane**

Proteoglykanen sind ein Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM). Sie beeinflussen die in die ECM eingebetteten Zellen in ihrer Entwicklung und in ihrer Reaktion auf Reize. Zur Gruppe der Proteoglykane gehören die Glykosaminoglykane (GAGs), bei denen es sich um Polysaccharide handelt, die aus sich wiederholenden Disacchariden bestehen. Um den möglichen Einfluß der GAGs auf die Makrophagenaktivierung zu untersuchen wurden J774A.1 Zellen für 1 Stunde mit GAGs vorbehandelt, bevor sie mit AGEs induziert wurden. Nach 24 Stunden wurde die NF-κB Konzentrationsänderung im Zellkern durch EMSA gemessen. Durch die Behandlung mit 2 μM AGE konnte NF-κB im Zellkern nachgewiesen werden (Abb. 7).

A



## B



**Abb. 7A) Einfluß der Glykosaminoglykane auf die Aktivierbarkeit von NF-κB in Mikrogliazellen.**

Untersuchung der NF-κB Aktivierung im EMSA. Die Zellen wurden für 1 h mit unterschiedlichen GAGs vorbehandelt, und mit 2 μM maximal modifiziertem AGE oder 2 μM BSA für 24 h inkubiert. Die einstündige Präinkubation der Zellen mit 100 μg/ml D-Glukuronsäure, 100 μg/ml N-Acetylglucosamin oder 1 mg/ml Chondroitinsulfate (Spuren 2, 3 und 4) vermindert die NF-κB Aktivierung durch AGE.

### **B) Densitometrische Vermessung des C1 Komplexes aus dem EMSA**

Die Aktivierung von NF-κB, die durch 2 μM AGE bewirkt wird (Spur 1), wird durch die Präinkubation mit D-Glukuronsäure auf 74% reduziert, durch N-Acetylglucosamin auf 55% und durch Chondroitinsulfate auf 87%.

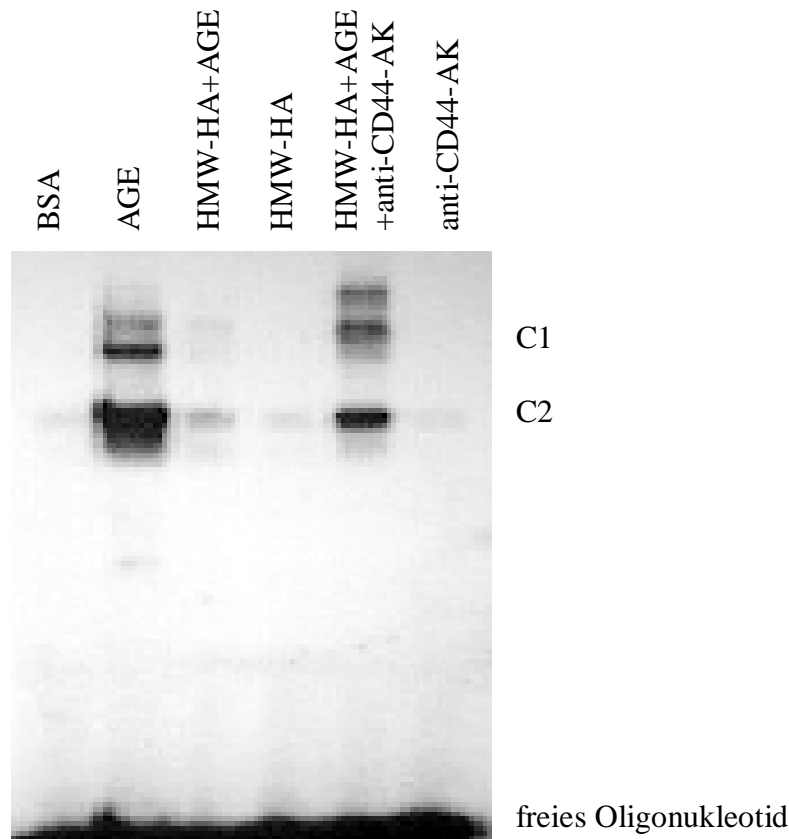
Nach einer Vorbehandlung der Mikrogliazellen mit 100 μg/ml D-Glukuronsäure, 100 μg/ml N-Acetylglucosamin oder 1 mg/ml Chondroitin-4-sulfat zeigte sich eine Reduktion der NF-κB Aktivierbarkeit. D-Glukuronsäure und Chondroitin-4-sulfat zeigten eine geringfügige Reduktion der NF-κB Aktivierung. Die Reduktion der NF-κB Aktivierung durch die Präinkubation mit N-Acetylglucosamin fiel überzeugender aus, welches die NF-κB Aktivierung laut densitometrischer Vermessung um 45% verminderte. Hierbei ist zu bedenken, daß die Methodik des EMSA nicht so präzise ist, daß Abweichungen von wenigen Prozent aussagekräftig wären.

### **III.1.3.1.1. Einfluß der HMW-HA auf die NF-κB Aktivierung**

Das Rückgrad eines Proteoglykanaggregates ist die Hyaluronsäure (HA), eine nichtverzweigte Polysaccharidkette, die aus 250 bis 25000 Disaccharideinheiten besteht und im nativen Zustand in hochmolekularer Form (MDa) vorliegt. Daher wurden die J774A.1 Makrophagen für eine Stunde mit hochmolekularer Hyaluronsäure (HMW-HA) präinkubiert, um sie in einer möglichst physiologisch vergleichbaren Umgebung zu untersuchen. Die verwendete HMW-HA hatte eine Größe von 1,2 MDa und wurde hier in

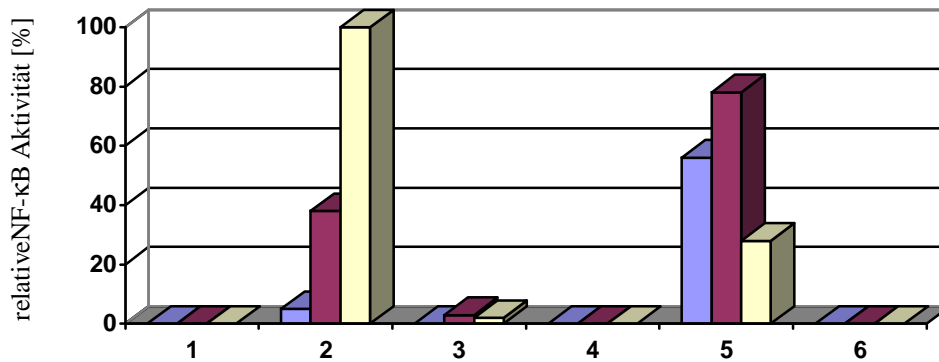
einer Konzentration von 4 mg/ml eingesetzt. Diese Konzentration weist eine extrem hohe Viskosität auf, und ist daher in der Zellkultur schwer zu handhaben. Anschließend wurden die so vorbehandelten Mikrogliazellen mit 2  $\mu$ M AGE inkubiert, und nach 24 Stunden mittels EMSA untersucht. Die Behandlung mit AGE führte im Gegensatz zu der BSA-Kontrolle (2  $\mu$ M) zu einer NF- $\kappa$ B Aktivierung, während dieselben Zellen nach einer einstündigen Vorbehandlung mit HMW-HA keine NF- $\kappa$ B Aktivierung zeigten (Abb. 8). Eine Präinkubation mit HMW-HA ohne eine anschließende AGE Behandlung führte zu keiner Veränderung der NF- $\kappa$ B Konzentration im Zellkern. Einer der Rezeptoren für die HA ist das zelluläre Antigen CD44, das eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion spielt. Daher wurde der Antikörper gegen CD44 (0,48  $\mu$ g/ml anti-CD44 Antikörper) verwendet, um die Bindung der Hyaluronsäure an die Oberfläche der Makrophagen zu verhindern. Dies führte zu einer Wiederherstellung der AGE induzierten Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern. Dabei zeigten die aktivierten NF- $\kappa$ B Komplexe andere Größen auf, als nach einer AGE Aktivierung, so daß man vermuten konnte, daß hier andere Kombinationen von Homo- bzw. Heterodimeren aus der NF- $\kappa$ B Familie vorlagen, als bei der AGE bedingten Aktivierung. Der Antikörper anti-CD44 für sich genommen zeigte keinen Einfluß auf die NF- $\kappa$ B Aktivierung.

A





## B



### Abb. 8 A) Die NF-κB Aktivierung wird durch die HMW-HA beeinflusst

Es wurde ein EMSA durchgeführt, dazu wurden die J774A.1-Zellen in Gegenwart von 2  $\mu$ M AGE beziehungsweise 2  $\mu$ M BSA für 24 h inkubiert. Die Vorbehandlung der Phagozyten mit 4 mg/ml HMW-HA (Spur 3) reduziert deren NF-κB Aktivierbarkeit auf die der unbehandelten Kontrolle (Spur 1). Eine zusätzliche Behandlung mit 0,48  $\mu$ g/ml anti-CD44 Antikörper hebt diese Schutzwirkung der HMW-HA wieder auf, so daß eine ähnliche Aktivierung wie durch BSA-AGE für sich genommen erzielt wird (Spur 5). Die 4 mg/ml HMW-HA und 0,48  $\mu$ g/ml des anti-CD44-Antikörper zeigen keine Auswirkung auf die NF-κB Aktivierung (Spuren 4 und 6).

### B) Densitometrische Vermessung des Komplex C1 aus dem EMSA

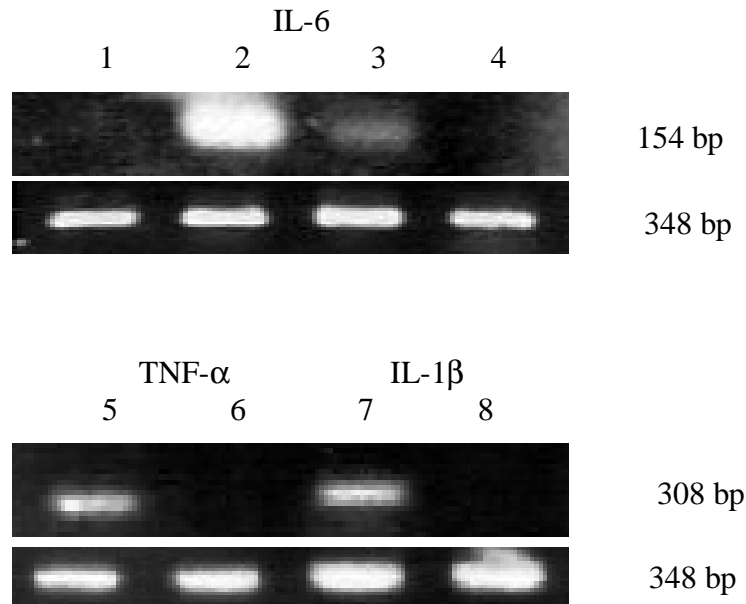
Die Banden des aktivierenden NF-κB Komplexes im EMSA wurden in der Reihenfolge von oben nach unten vermessen und von links nach rechts im Balkendiagramm aufgetragen. Das Homodimer p50-p50 wurde nicht berücksichtigt. Der genaktivierende Komplex (aktivierendes NF-κB) setzt sich aus verschiedenen Hetero- und Homodimeren aus der Rel-Familie zusammen.

## III.1.3.1.2. HMW-HA verhindert die AGE induzierte Zytokin-expression

In einer Inflammationsreaktion der Makrophagen werden typischerweise die Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  verstärkt ausgeschüttet. Die Erhöhung der mRNA Expression dieser drei Zytokine kann infolge der NF-κB Aktivierung hervorgerufen werden. Daher wurde die mRNA Expressionsänderung der Zytokine mittels RT-PCR nachgewiesen, die durch 2 $\mu$ M AGE nach 24 h hervorgerufen wurde. Die J774A.1 Makrophagen wurden für eine Stunde mit einer 1,2 MDa großen HMW-HA präinkubiert und anschließend mit 2  $\mu$ M AGE behandelt (Abb 9).

Durch die AGE Behandlung wurde die Expression der drei Zytokin-mRNA Spezies induziert, besonders die von IL-6, während die BSA-Behandlung der Makrophagen keine derartige Reaktion nach sich zog. Die Amplifikation der PCR wurde mit Hilfe der  $\beta$ -Actin mRNA Expression überprüft. Hier war eine gleichmäßige Konzentration der PCR Produkte in allen Proben zu verzeichnen. Die PCR Methodik ist für eine genaue quantitative Aussagen über die RNA-Konzentrationsänderungen ungeeignet, kann aber

generell als Hinweis auf mRNA Konzentrationsänderungen herangezogen werden. Die Präinkubation der Zellen mit 4 mg/ml HMW-HA schützte die Makrophagen vor einer Aktivierung durch AGE, die bei alleiniger Behandlung mit AGE auftritt. Die mRNA Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$  war nicht detektierbar, während IL-6 eine gerade noch nachweisbare Konzentration aufwies.



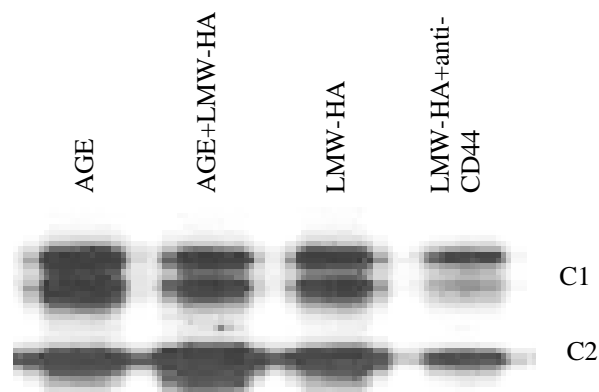
**Abb. 9) AGEs aktivieren die Expression verschiedener Zytokin-RNA-Spezies**  
 Die J774A.1 Zellen wurden für 24 h mit 2  $\mu$ M AGE bzw. 2  $\mu$ M BSA behandelt. Anhand einer RT-PCR Untersuchung wurde mit den PCR-Primern für die Fragmentgrößen von IL-6 (154 bp), IL-1 $\beta$  (307 bp) und TNF- $\alpha$  (308 bp) die Expressionsänderung der Zytokin-mRNA Spezies nach 24 h gemessen. Die verwendeten Primer wurden in einer Konzentration von 0,1  $\mu$ M eingesetzt. Die Behandlung der Zellen mit 2  $\mu$ M AGE führt zu einer erhöhten Expression der mRNA von IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Spuren 2, 5 und 7). Die Behandlung mit 2  $\mu$ M BSA führt zu keiner IL-6 mRNA Expression (Spur 1, oben). Durch die HMW-HA wird die mRNA-Expression der drei Zytokine trotz AGE Stimulation verhindert (Spuren 3, 6 und 8, oben), während die HMW-HA selbst keinen Einfluß auf die Zytokinausschüttung hatte (Spur 4, oben). Die Beladungskontrolle wurde mit Hilfe der  $\beta$ -Actinexpression nachgewiesen. Die Amplifikation führt zu einem PCR-Produkt der Größe 348 bp, welches in den Spuren 1 bis 8, unten in vergleichbaren Mengen vertreten ist.

### III.1.3.2. Niedermolekulare HA Fragmente aktivieren NF- $\kappa$ B

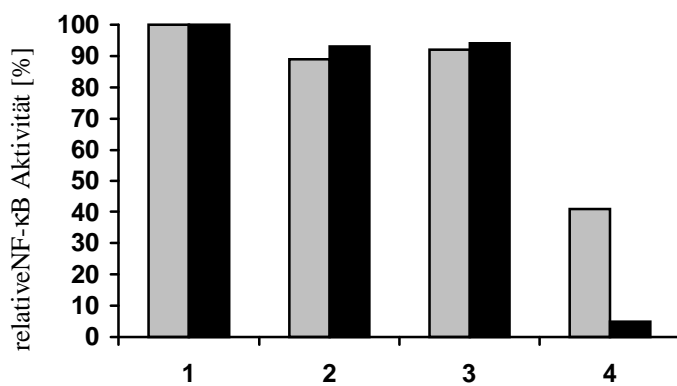
Um den Einfluß des Molekulargewichts der HA auf die NF- $\kappa$ B Aktivierung zu untersuchen, wurde "in vitro" die Auswirkung der niedermolekularen HA (LMW-HA) untersucht. Die Makrophagen wurden für eine Stunde mit LMW-HA (0,3-0,5 MDA) inkubiert und anschließend mit 2  $\mu$ M AGE behandelt. Die LMW-HA war im Gegensatz zu

der HMW-HA nicht in der Lage, eine Aktivierung der Mikrogliazellen durch AGE zu verhindern (Abb.10A). Bei einer Größe die weniger als 0,5 MDa beträgt, verlor die HA nicht nur ihren inhibierenden Einfluß, sondern aktivierte NF- $\kappa$ B ihrerseits. Der gleichzeitige Einsatz von AGE und LMW-HA führte nicht zu einem synergistischen Effekt der NF- $\kappa$ B Aktivierung, denn diese entsprach der Aktivierung durch LMW-HA. Die Aktivierung durch AGE fiel um ca. 10% stärker aus. Die NF- $\kappa$ B Aktivierung wurde durch die Zugabe von 0,48  $\mu$ g/ml anti-CD44-Antikörper vor der HA-Behandlung vermindert. Die aktivierenden NF- $\kappa$ B Komplexe reduzierten sich um 50% beziehungsweise um 90% (Abb 10B).

**A**



**B**



**Abb. 10 A) Einfluß niedermolekularer HA auf die NF- $\kappa$ B Aktivierbarkeit**

Die NF- $\kappa$ B Aktivierung wurde mittels EMSA untersucht. Die Behandlung der J774A.1 Makrophagen mit 2  $\mu$ M AGE führt zu einer NF- $\kappa$ B Aktivierung (Spur 1), die mit der NF- $\kappa$ B Aktivierung durch LMW-HA vergleichbar ist (HA mit einem Molekulargewicht von 0,3-0,5 MDa (LMW-HA), Spur 3). Die gleichzeitige Behandlung mit AGE und LMW-HA führt nicht zu einer erhöhten NF- $\kappa$ B Konzentration (Spur 2) gegenüber der Behandlung mit AGE oder LMW-HA alleine. Der Antikörper anti-CD44 wurde in einer Konzentration von 0,48  $\mu$ g/ml 15 min vor Zugabe der HA eingesetzt. Diese zusätzliche Behandlung verändert die Konzentration der aktivierenden Rel-Familienmitglieder (Spur 4).

**B) Densitometrische Vermessung des EMSAs**

Die Banden des Gels (nur C1 Komplexe) wurden in der Reihenfolge von oben nach unten vermessen und von links nach rechts im Balkendiagramm aufgetragen. Die AGE, LMW-HA+AGE und LMW-HA Stimulation der Zellen führt zu einer Aktivierung, die sich im Rahmen von 10% Abweichung entspricht (Spuren 1-3), während die zusätzliche Vorbehandlung durch den gegen CD44 gerichteten Antikörper die aktivierenden NF- $\kappa$ B Komplexe um 50% beziehungsweise um 90% reduziert (Spur 4).

### **III.1.3.3. Die AGE induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierbarkeit ist umgekehrt proportional zu der HA-Größe**

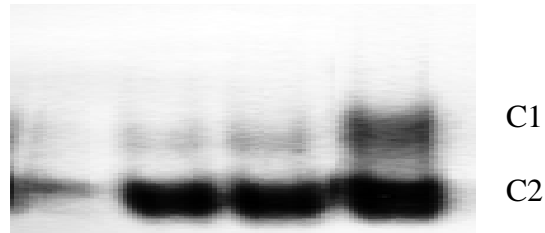
Um die genaue Abhängigkeit der NF- $\kappa$ B Aktivierung von der Größe der HA zu untersuchen, wurden HA mit unterschiedlichen Molekulargewichten verwendet. Die HA der Durchschnittsgrößen 0,3-0,5 MDa, 0,6 MDa, 0,7 MDa und 1,2 MDa wurden in einer Konzentration von 4 mg/ml eine Stunde vor der Behandlung der Zellen mit 2  $\mu$ M AGE eingesetzt.

Die HA der Größen 1,2 MDa und 0,3-0,5 MDa wurden käuflich erworben (Lifecore, Biomedical und Sigma Aldrich). Die HA der Größe 0,6 MDa und 0,7 MDa wurde aus der 1,2 MDa HA gewonnen, indem die HMW-HA durch 1 U/ml Hyaluronidase bei 37°C geschnitten wurde. Die Ansätze wurden kurz auf 80°C erhitzt, anschließend in einem 0,5%igem Agarosegel bezüglich ihres Molekulargewichts überprüft. Von Lee et al. wurde eine elektrophoretische Analyseverfahren beschrieben, die zur Bestimmung des HA Molekulargewichts eingesetzt werden kann. Anhand von standardisierten HA Proben mit bekanntem Molekulargewicht wird eine lineare Beziehung zwischen der elektrophoretischen Mobilität der HA und dem Logarithmus ihres durchschnittlichen Molekulargewichts über einen Bereich von 0,2-6x10<sup>6</sup> Da aufgestellt und mit einem DNA Standard (Lambda DNA, BStEII geschnitten) verglichen (Lee et al., 1994). Dadurch kann die HA-Größe anhand der Laufstrecke im Vergleich zu einem DNA-Standard bestimmt werden. Diejenigen Lösungen, deren Hauptanteil der Durchschnittsgrößen bei 0,7 bzw. bei 0,6 MDa lag wurden für weitere Untersuchungen verwendet.

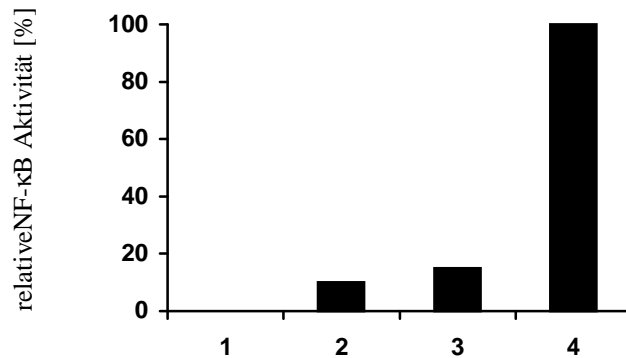
Die Makrophagen wurden mit 2  $\mu$ M AGE aktiviert, wobei sich der protektive Effekt der HA mit abnehmendem Molekulargewicht der HA von 1,2 MDa über 0,7 MDa und 0,6 MDa bis zu 0,3-0,5 MDa verringerte (Abb. 11). Wie oben gezeigt, ist die Kombination von LMW-HA+AGE in der Fähigkeit NF- $\kappa$ B zu aktivieren vergleichbar mit der maximalen NF- $\kappa$ B Aktivierung durch AGE (Abb.10).

**A**

AGE	+	+	+	+
HA 1,2 MDa	+	-	-	-
HA 0,7 MDa	-	+	-	-
HA 0,6 MDa	-	-	+	-
HA 0,3-0,5 MDa	-	-	-	+



**B**



**Abb. 11 A) Abhängigkeit der AGE bedingten NF-κB-Aktivierung von der HA-Größe**

Die NF-κB Aktivierung wurde mittels EMSA untersucht. Die Zellen wurden mit 2 μM AGE für 24 h inkubiert. Dabei ist eine umgekehrte Proportionalität zwischen der Fragmentgröße der Hyaluronsäure und der NF-κB Aktivierung zu erkennen. Die HA wurde in den vier verschiedenen Durchschnittsgrößen in einer Konzentration von 4 mg/ml eingesetzt.

**B) Densitometrische Auswertung der C1 Komplexe des EMSA**

Die Präinkubation der Zellen mit 1,2 MDa HA bietet einen vollständigen Schutz vor einer NF-κB Aktivierung (Spur 1), während die Präinkubation mit 0,7 MDa und 0,6 MD HA die NF-κB Aktivierung auf 9% (Spur 2) beziehungsweise auf 12% (Spur 3) reduziert. Durch die Präinkubation mit 0,3-0,5 MDa wird die NF-κB Aktivierung nicht reduziert (Spur 4).

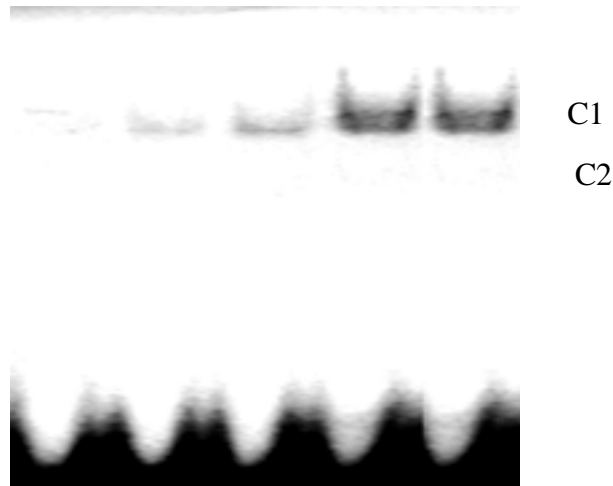
### **III.1.3.4. Die Aβ induzierte NF-κB Aktivierung ist umgekehrt proportional zu der Größe der präinkubierten HA**

Außer den aus dem Blutstrom einwandernden Makrophagen sind besonders die Mikroglia im Gehirn relevant für entzündliche Prozesse. Daher wurde für die Mikrogliazelllinie (N11) überprüft, ob die Abhängigkeit der Aktivierung von der HA-Durchschnittsgröße in diesen ebenfalls auftritt.

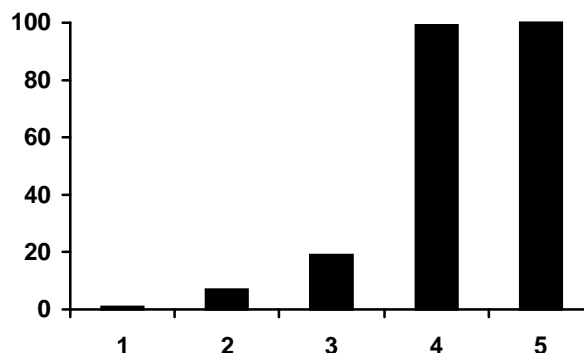
Die Mikrogliazellen wurden eine Stunde zusammen mit 4 mg/ml HA unterschiedlicher Größe präinkubiert und anschließend mit fibrillärem  $A\beta_{(25-35)}$  behandelt.  $A\beta_{(25-35)}$  wurde mit einem Peptid-Synthesizer mit Hilfe der Fmoc-Schutzmechanismen und DIC/HOBT aktivierender Chemie in Doppelkopplungsschritten hergestellt. Die Fibrillenbildung des  $A\beta_{(25-35)}$  wurde durch die Fluoreszenzintensitätszunahme infolge der Thioflavin T-Färbung festgestellt.

## A

$A\beta_{(sc)}$	+	-	-	-	-
$A\beta_{(25-35)}$	-	+	+	+	+
HA 1,2 MD	-	+	-	-	-
HA 0,7 "	-	-	+	-	-
HA 0,3-0,5 "	-	-	-	+	-



## B



**Abb. 12 A) In Mikroglia führen die  $A\beta$ -Fibrillen zu einer NF- $\kappa$ B Aktivierung.** Die NF- $\kappa$ B Aktivierung wurde im EMSA untersucht. Die N11 Mikrogliazellen wurden mit 10  $\mu$ M fibrillärem  $A\beta_{(25-35)}$  oder 10  $\mu$ M  $A\beta_{(sc)}$  für 24 h inkubiert. Die N11 Zellen wurden mit 4 mg/ml HA in drei verschiedenen Durchschnittsgrößen für 1 h vorinkubiert. Dabei ist eine umgekehrte

Proportionalität zwischen der Fragmentgröße der Hyaluronsäure und der NF- $\kappa$ B Aktivierung zu erkennen.

**B) Densitometrische Auswertung des EMSA (C1-Komplex)**

Die Präinkubation der Zellen mit 1,2 MDa HA bewirkt eine nahezu vollständige Inhibierung der NF- $\kappa$ B Aktivierung, die unter 5% (Spur 2) liegt, die Präinkubation mit 0,7 MDa HA reduziert die NF- $\kappa$ B Aktivierung auf 19% (Spur 3). Durch die Präinkubation mit 0,3-0,5 MDa wird die NF- $\kappa$ B Aktivierung zu 100% aktiviert (Spur 4) entsprechend der Behandlung mit  $A\beta_{(25-35)}$ .

Nach 12 Stunden wurde durch EMSA-Untersuchungen die NF- $\kappa$ B Aktivierung untersucht. Die mit  $A\beta_{(25-35)}$  aktivierten Mikroglia zeigten ebenfalls eine Abhängigkeit der NF- $\kappa$ B Aktivierung von dem Molekulargewicht der HA. Auch hier war die 1,2 MDa HA in der Lage die NF- $\kappa$ B Aktivierung zu 95% zu verhindern. Die Präinkubation mit 0,7 MDa HA inhibierte die NF- $\kappa$ B Aktivierung zu 81%, während die HA-Fragmente der Größen 0,3-0,5 MDa keine NF- $\kappa$ B inhibierende Wirkung zeigten (Abb. 12B). Die Negativkontrolle  $A\beta_{(sc)}$  zeigte keine NF- $\kappa$ B Aktivierung.

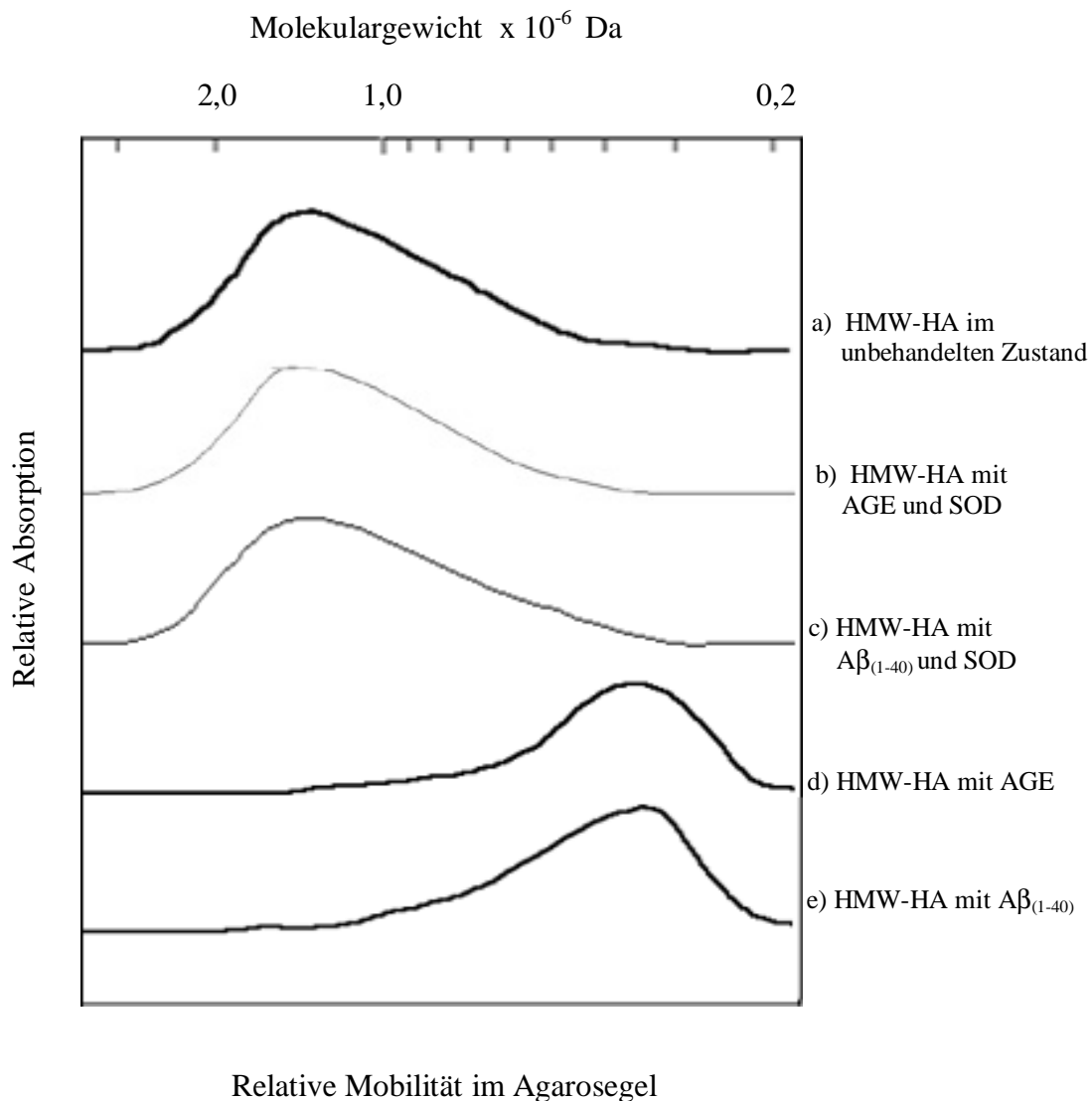
## **III.2. Veränderungen der Extrazellulären Matrix**

### **III.2.1. Einfluß von AGE und $A\beta$ auf das durchschnittliche Molekulargewicht der HA**

Es gibt vielfältige Ursachen für die Veränderung der extrazellulären Matrix, die mit dem Alterungsprozess einhergehen. Um die Auswirkung von AGE und  $A\beta$  auf die Hauptstrukturkomponente der extrazellulären Matrix im Gehirn, die HA, zu untersuchen wurden AGE oder  $A\beta$  zusammen mit HA in Medium inkubiert. Hierzu wurden 100  $\mu$ M AGE oder 50  $\mu$ M  $A\beta_{(1-40)}$  eingesetzt, die für 24 h bei 37°C zusammen mit der 1,2 MDa HMW-HA der Konzentration 3mg/ml in Medium inkubiert wurden. Die HA wurde anschließend auf einem 0,5%igem Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurden 0,5 mg/ml HA pro Spur in der Elektrophorese eingesetzt. Die Behandlung der HA mit 100  $\mu$ M AGE führte zu einer Größenabnahme der HA auf einen durchschnittlichen Wert von 0,35 MDa und die Behandlung mit 50  $\mu$ M  $A\beta_{(1-40)}$  zu einer Reduktion der HA Durchschnittsgröße auf ebenfalls 0,35 MDa (Abb 13).

Die Größenbestimmung erfolgte durch die Vergleich mit standardisierten HA-Proben und einem DNA-Standard nach der oben beschriebenen Verfahrensweise. Dieser Größenabbau der HA durch AGE und  $A\beta$  konnte durch Zugabe von 300 U Superoxiddismutase (SOD)

verhindert werden. SODs sind Metalloenzyme, die die Dismutase von Superoxidanion in Sauerstoff und Hydrogenperoxid katalysieren, so daß vermutlich Radikale ursächlich für den Größenabbau waren. Diese können sowohl von  $A\beta_{(1-40)}$  als auch AGEs gebildet werden. Besonders die hochmolekulare Hyaluronsäure zeigt sich anfällig für freie Radikale, da diese die HA unspezifisch zerteilen.



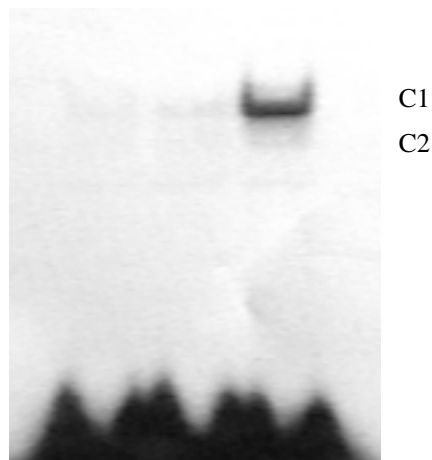
**Abb. 13) Größenveränderungen der HMW-HA nach Behandlung mit AGE oder  $A\beta$ .**

Die HMW-HA (1,2 MDa) (a,) der Konzentration 3 mg/ml wurde in Anwesenheit von 50  $\mu$ M  $A\beta_{(1-40)}$  oder 100  $\mu$ M AGE für 24 h inkubiert. Die verschieden behandelten HA-Ansätze wurden in einer Konzentration von 0,5 mg/ml auf ein 0,5%iges Agarosegel aufgetragen und gefärbt. Die Laufstrecke der HA wurde densitometrisch vermessen. AGE oder  $A\beta_{(1-40)}$  Behandlung führten zu einer Degradierung der HA (d, und e, ) auf durchschnittlich 0,35 MDa, wobei der Abbau durch die gleichzeitige Anwesenheit von 300 U SOD verhindert werden konnte (b, und c,).



### III.2.2. AGE bedingte Aktivierung primärer Kardiofibroblasten und deren Einfluß auf Bestandteile der Extrazellulären Matrix

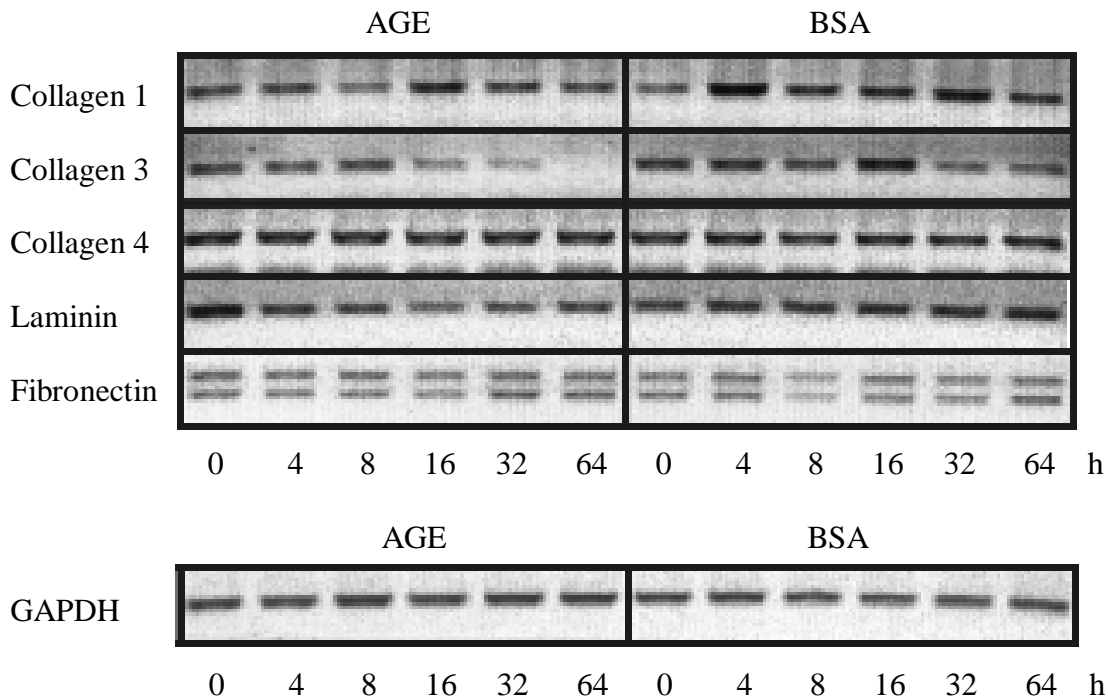
In Kooperation mit PD Dr. Simm wurde die Reaktion primärer Kardiofibroblasten der Ratte auf AGE Behandlung hin untersucht. Die Primärzellen wurden wie in Simm et al. beschrieben gewonnen (Simm et al.,1999). Die Kardiofibroblasten wurden mit 2  $\mu$ M AGE beziehungsweise 2  $\mu$ M BSA behandelt und nach 24 h der Kernextrakt durchgeführt. Im darauf folgenden EMSA wurde die NF- $\kappa$ B Aktivierung untersucht. Es zeigte sich, daß die Fibroblasten nach 24 stündiger Behandlung mit 2  $\mu$ M BSA nicht mit einer NF- $\kappa$ B Aktivierung reagieren, während die 24-stündige Inkubation mit 2  $\mu$ M AGE eine NF- $\kappa$ B Aktivierung bewirkte (Abb 14).



**Abb. 14) AGE bedingten NF- $\kappa$ B-Aktivierung in primären Herzfibroblasten**  
Die Aktivierbarkeit von NF- $\kappa$ B wurde in einem EMSA untersucht. Die primären Kardiofibroblasten wurden mit 2  $\mu$ M AGE oder 2  $\mu$ M BSA für 24 h inkubiert. Die BSA Behandlung zeigt keine NF- $\kappa$ B Aktivierung, während AGE NF- $\kappa$ B aktiviert.

Im Rahmen der Kooperation wurde außerdem untersucht, welchen Einfluß die AGE Behandlung der primären Herzmuskelzellen auf die Expression von mRNA-Spezies hat, die die extrazelluläre Matrix (ECM) beeinflussen. Zu diesem Zweck wurde die mRNA-Expression mittels RT-PCR untersucht. Nach der Behandlung der Zellen mit 2  $\mu$ M BSA beziehungsweise 2  $\mu$ M AGE wurden die Zellen zu den Zeitpunkten 0 h, 4h, 8 h, 16 h, 32 h und 64 h aufgeschlossen und die entsprechenden Sequenzen amplifiziert. Untersucht wurde die Expressionsänderung der Collagene 1, 3 und 4, sowie von Laminin und

Fibronectin. Die Beladungskontrolle wurde mit der konstitutiv hochexprimierten GAPDH mRNA durchgeführt (Abb. 15). Die Collagene 1 und 4, sowie Laminin und Fibronectin zeigten im Verlauf der 64 h keine Konzentrationsänderungen, das Collagen 3 hingegen nahm in der mRNA Expression nach 16 h ab. Nach 64 h war die mRNA nicht mehr nachweisbar. Im Vergleich dazu war die mRNA von Collagen 3 nach der BSA Behandlung über den Zeitraum von 64 h nahezu gleichbleibend nachweisbar (Abb 15).



**Abb. 15) Expressionsänderungen der mRNA verschiedener extrazellulärer Matrixproteine**  
**Primären Herzfibroblasten** wurden mit 2  $\mu$ M BSA beziehungsweise 2  $\mu$ M AGE über verschiedene Zeiträume bis zu 64 h behandelt. Hier zeigt sich, daß AGE keine Konzentrationsänderungen der mRNA Expression für Collagen 1 und 4, sowie für Laminin und Fibronectin bewirkt. Die Behandlung mit BSA führt zu einer vergleichbaren Expression, die ebenfalls keine Konzentrationsänderungen in den untersuchten 64 h aufweist. Die Collagen 3 RNA Konzentration bleibt nach BSA Behandlung gleich ausgeprägt. Durch die AGE Behandlung zeigt sich hingegen nach 16 h eine Abnahme in der Konzentration der mRNA, die nach 64 h so gering ist, daß sie nicht mehr nachgewiesen werden kann. Die gleichmäßige Durchführung der Amplifikation wurde durch die GAPDH Kontrolle belegt.

### **III.3. Signaltransduktion in Mikrogliazellen**

NF- $\kappa$ B korreliert mit der AGE-bedingter Aktivierung der Mikrogliazellen, dennoch blieb unklar, welcher Rezeptor auf welchem Signalweg zu der NF- $\kappa$ B Aktivierung führt. Durch die pharmakologische Inhibierung verschiedener Signalkaskaden sollte dieser Signalweg untersucht, beziehungsweise ein Hinweis auf einen Rezeptor gefunden werden, der die AGE bedingte Mikrogliaaktivierung vermittelt.

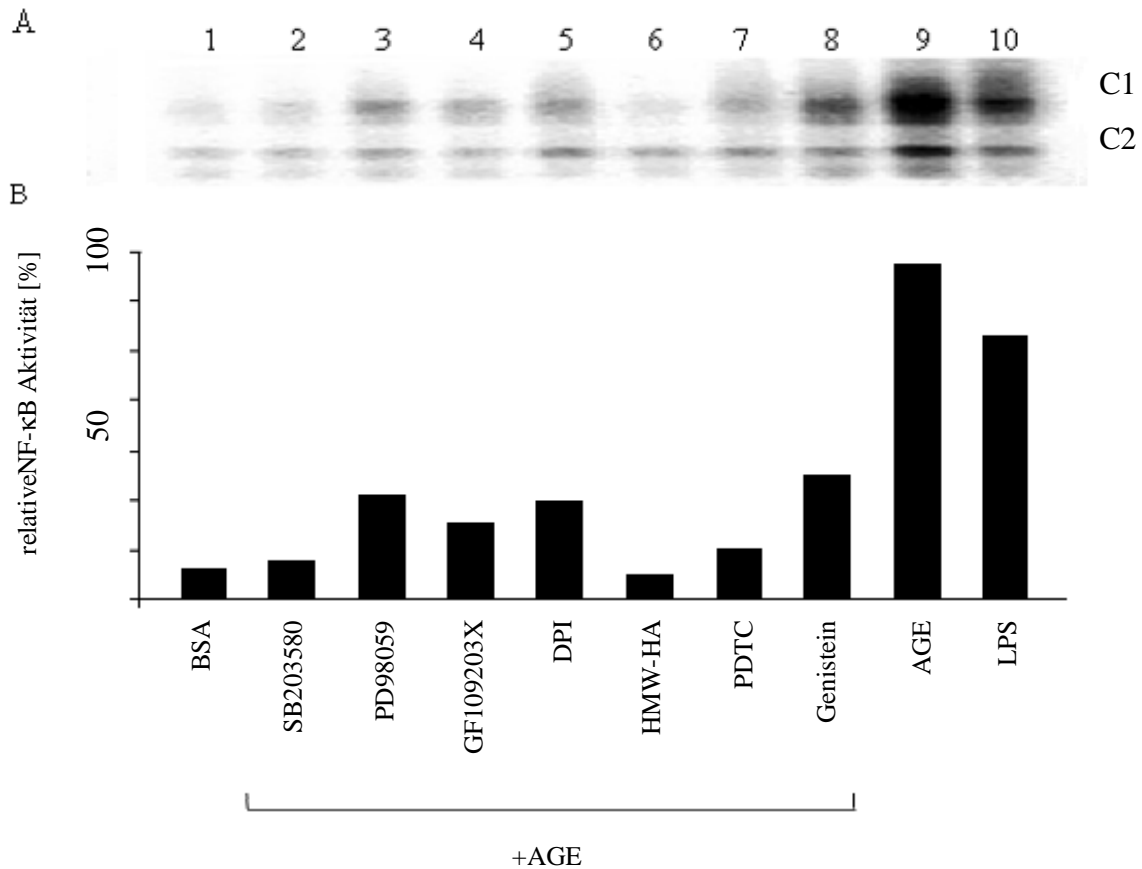
#### **III.3.1. Inhibierung der AGE induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung**

Hierfür sollten Signaltransduktionswege untersucht werden, die in einem Zusammenhang mit der NF- $\kappa$ B Aktivierung stehen, und deren Unterbrechung zu einer Veränderung der NF- $\kappa$ B Konzentration im Zellkern führen würde. Die Mikrogliazelllinie (N11) wurden mit 2  $\mu$ M AGE aktiviert, wobei sie vorher mit den entsprechenden Inhibitoren vorinkubiert wurden. Nach 24 Stunden wurden die Kernextrakte gemacht und in einer Gelretentionsanalyse untersucht. Dadurch konnte ein semiquantitativer Vergleich der NF- $\kappa$ B Konzentrationen aufgrund der unterschiedlichen Inhibitorwirkungen erzielt werden.

Lipopolysaccharid (LPS) wurde als Positivkontrolle in einer Konzentration 1  $\mu$ g/ml eingesetzt und zeigte gegenüber einer Behandlung mit 2  $\mu$ M AGE eine etwa 25% geringere NF- $\kappa$ B Aktivierung (Abb. 14). Die prozentualen Werte wurden nach Abzug von 10% der unbehandelten Kontrolle errechnet. Der Einsatz von 10  $\mu$ M Genistein, einem unspezifischen Tyrosin-Kinasen Inhibitor, reduziert die NF- $\kappa$ B Aktivierung auf 27%.

Dies wurde von den MAP-Kinase Inhibitoren SB203580 und PD98059 noch übertroffen die NF- $\kappa$ B Translokation in den Kern auf 2% beziehungsweise auf 23% senkten (Abb. 16). Diese sind spezifisch für die MAP-Kinase p38, die MAP-Kinase-Kinase (=MEK1). Die beiden Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 10  $\mu$ M eingesetzt. GF109203X hemmt die Proteinkinase C (PKC) und reduzierte die NF- $\kappa$ B Aktivierung auf 13%, während Diphenylen iodonium (DPI) ein Inhibitor der NADPH Oxidase und von Flavoproteinen eine Verminderung auf 22% bewirkte. Pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC) reduzierte die NF- $\kappa$ B Aktivierung auf etwa 5%. Wie schon gezeigt führt die HMW-HA zu einer hervorragenden Hemmung der NF- $\kappa$ B Aktivierung, wobei die zugrundeliegende Funktionsweise ungeklärt ist.

Es zeigte sich, daß alle hier eingesetzten Inhibitoren eine Verringerung der NF- $\kappa$ B Aktivierung bewirkten, wobei zweifelhaft ist, ob diese alle zu einer veränderten Neurotoxizität der aktivierten Mikroglia führen.



**Abb. 16) (A) Inhibierung der AGE bedingten NF- $\kappa$ B Aktivierung (EMSA)**

Die Mikrogliazellen wurden mit 2  $\mu$ M AGE aktiviert. Die AGE induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde durch die Präinkubation mit Inhibitoren in den folgenden Konzentrationen vermindert: 10  $\mu$ M SB203580 (2), 10  $\mu$ M PD98059 (3), 10  $\mu$ M GF109203X (4), 10  $\mu$ M Diphenylen iodonium (5), 4 mg/ml 1,2 MDa HMW-HA (6), 10  $\mu$ M PDTC (7), 10  $\mu$ M Genistein (8). Diese wurden mit der Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch 2  $\mu$ M AGE (9) und 1 mg/ml LPS (10) verglichen.

**(B) Densitometrische Vermessung des Rel-Komplexes C1 des EMSA**

Die Aktivierung durch 2  $\mu$ M AGE wurde als maximal angenommen und als 100% festgelegt. Davon wurden die 10%ige Aktivierung durch BSA abgezogen, um die verbleibende prozentuale Aktivierung zu erhalten. Als Vergleichswert führt die Behandlung der Zellen mit 1 mg/ml LPS zu einer 75%igen NF- $\kappa$ B Aktivierung. Die AGE bedingte NF- $\kappa$ B Aktivierung wurde durch die Inhibitoren auf folgende Werte gesenkt: durch SB203580 auf 2%, durch PD98059 auf 23%, durch GF109203X auf 13%, durch DPI auf 22%, und durch PDTC auf 5%. Die Präinkubation mit 4 mg/ml HMW-HA verhindert die NF- $\kappa$ B Aktivierung vollständig, wenn man die geringfügige Aktivierung durch BSA berücksichtigt.

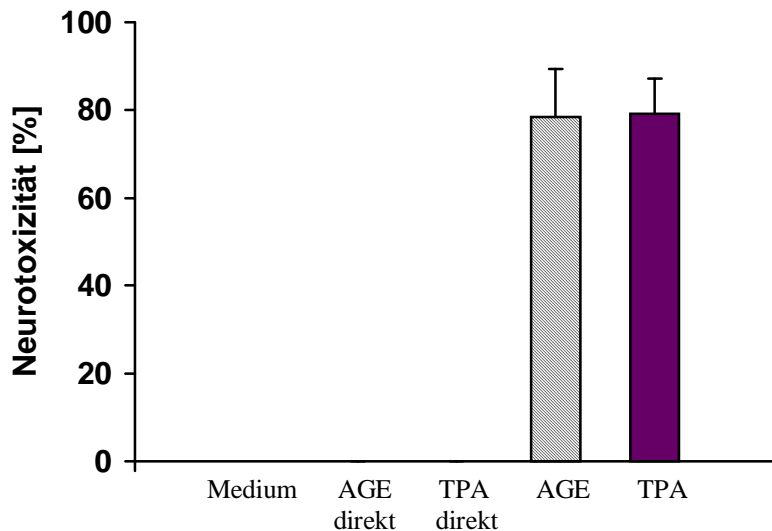
### **III.3.2. Inhibierung verschiedener Signalkaskadengruppen in Bezug auf die Neurotoxizität im "in vitro Modell"**

Da eine äußerst komplexe Situation der Signalkaskaden vorliegt, die auf verschiedensten Wegen Einfluß auf die NF- $\kappa$ B Aktivierung haben, sollte untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen der Aktivierung eines konkreten Signalweges und der Neurotoxizität besteht. Aus diesem Grund wurde ein "in-vitro Modell" etabliert, das den neurotoxischen Einfluß der Mikroglia nachahmen sollte.

Dazu wurden Mikroglia mit einem Inhibitor präinkubiert, nach der Präinkubationszeit mehrfach in einem Puffer (PBS) gewaschen, und mit frischem Medium versorgt. Für die verschiedenen Inhibitoren variierten die Präinkubationszeiten von 30 min bis zu drei Stunden. Die Mikroglia wurden daraufhin mit 2  $\mu$ M AGE stimuliert und nach 12 Stunden abzentrifugiert. Der zellfreie Überstand mit den mikroglia-sezernierten Stoffen wurde als Medium für die murine Neuronenzelllinie Neuro-2A weiterverwendet. Dieses Medium, mit denen die Neuronen behandelt wurden, wird im Folgenden als konditioniertes Medium bezeichnet.

Die Überlebensrate der Neuro-2A in diesem konditionierten Medium wurde nach 48 h in Zytotoxizitätsuntersuchungen ermittelt. Die Überlebensrate der Neuronen wurde bezogen auf die Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) in das Medium, das geschädigte Zellen freisetzen. Der Minimalwert der Neurotoxizität wurde durch unbehandeltes Medium festgelegt, der Maximalwert durch die vollständige Zelllyse mittels eines Detergenz (Triton X100). Die Neurotoxizität der konditionierten Medien wurde auf diese Extremwerte bezogen.

Um auszuschließen, daß AGE direkt auf die Neuronen wirkt, wurde 2  $\mu$ M AGE direkt in das Medium der Neuronenkultur zugegeben. Dies hatte keine erkennbare Neurotoxizität zur Folge, und war vergleichbar mit dem unbehandelten Medium (Abb.17). Ebenso führte die direkte Zugabe von 10 nM Phorbolster (TPA) zu keiner Neurotoxizität. Das konditionierte Medium von Mikrogliazellen, die mit 2  $\mu$ M AGE oder mit 10 nM TPA vorbehandelt wurden, hingegen führt in beiden Fällen zu einer etwa 83-prozentigen Neuronensterblichkeit.

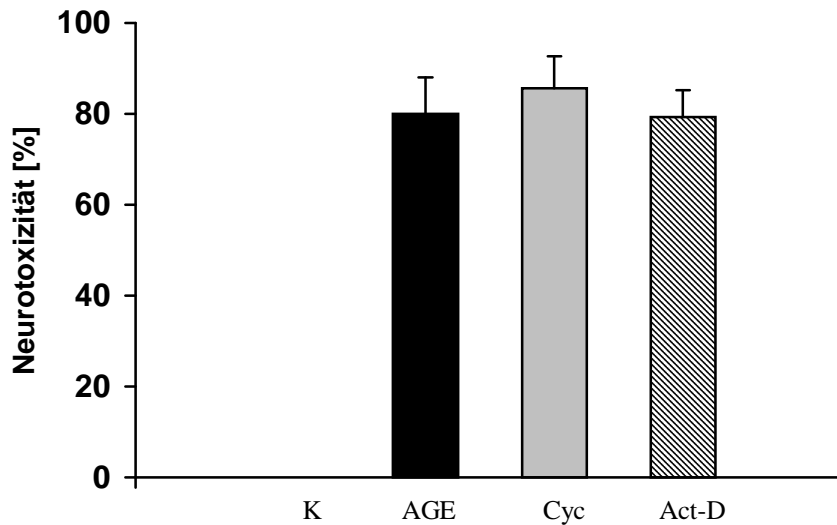


**Abb.17) Neurotoxische Wirkung des konditionierten Mediums von Mikrogliazellen**

Die mit 2  $\mu$ M AGE oder 10 nM TPA vorbehandelten Mikrogliazellen sezernieren eine neurotoxische Komponente in das Medium. Diese führt zu der Zerstörung der Neuronen, die durch die Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) gemessen werden kann. Die vollständige Lyse der Zellen durch Triton X100 ergibt den Maximalwert, die Inkubation der Zellen für 48 h in Medium den Minimalwert der LDH-Freisetzung. Die direkte Behandlung der Neuronen mit 2  $\mu$ M AGE (AGE direkt) oder 10 nM TPA (TPA direkt) führt zu keiner neurotoxischen Wirkung. Das konditionierte Medium von Mikrogliazellen, die mit 2  $\mu$ M AGE beziehungsweise 10 nM TPA behandelt wurden, ist neurotoxisch. Die LDH Freisetzung belegt eine Neuronensterblichkeit von ca. 83% in beiden Fällen. Die Werte mit Standardabweichung beziehen sich auf 3 wells einer Mikrotiterplatte von drei typischen Experimenten; ( $p < 0,05$ ).

### **III.3.2.1. Auswirkung der Hemmung der Transkription oder der Translation in Mikrogliazellen auf die neurotoxische Wirkung des mikroglia-konditionierten Mediums**

Um festzustellen, ob die Transkription oder die Translation in den AGE aktivierten Mikroglia für eine neurotoxische Wirkung des konditionierten Mediums notwendig ist, wurden die Inhibitoren Cycloheximid und Actinomycin D eingesetzt. Die Mikrogliazellen wurden mit 500 nM Cycloheximid oder 10  $\mu$ g/(ml Zellkulturmedium) Actinomycin D für 30 min präinkubiert, gewaschen und anschließend mit 2  $\mu$ M AGE aktiviert. Die Zellen wurden für 12 h inkubiert, die Zellen abzentrifugiert, und das konditionierte Medium für die Inkubation der Neuronen eingesetzt. Weder die Hemmung der Transkription durch Actinomycin D, noch die der Translation durch Cycloheximid hatte einen Einfluß auf die Neurotoxizität des konditionierten Mediums (Abb. 18).



**Abb. 18) Neurotoxizität des mikroglia-konditionierten Mediums**

Die Neurotoxizität des konditionierten Mediums, gemessen im LDH-Test, liegt nach Behandlung der Mikroglia mit 2  $\mu$ M AGE bei 83%. Durch die Vorbehandlung mit 10  $\mu$ g/ml Actinomycin D (Act-D) bleibt die Toxizität bei 82%, nach der Vorbehandlung der Mikroglia mit 500 nM Cycloheximid (Cyc) erhöht sich diese auf 89%. Die Werte mit Standardabweichung beziehen sich auf 3 wells einer Mikrotiterplatte von drei typischen Experimenten; ( $p < 0,05$ ).

Da die Transkription benötigt wird, um die DNA in mRNA umzuschreiben, beziehungsweise die Translation um mRNA in Protein umzusetzen ist einer dieser Hemmungen ausreichend um die Neubildung von Proteinen zu verhindern. Da die Induktion der Mikroglia durch AGE trotz der Gegenwart der Inhibitoren in beiden Fällen zu einer neurotoxischen Wirkung führt, ist eine Neubildung des toxischen Agens vermutlich nicht notwendig. Wahrscheinlich liegt das neurotoxische Agens bereits vor, beziehungsweise kann aus vorhandenen Komponenten erstellt werden.

### **III.3.2.2. Auswirkungen der Hemmung mitochondrialer Funktionen in Mikrogliazellen auf die Neurotoxizität des mikroglia-konditionierten Mediums**

Um die Beteiligung der mitochondrialen Atmungskette auf die mikroglia-bedingte Neurotoxizität zu untersuchen, wurde die Atmungskette entkoppelt beziehungsweise gehemmt. Die Vorbehandlung mit den Inhibitoren wurde für eine Stunde durchgeführt, die behandelten Mikrogliazellen anschließend gewaschen und vor der Zugabe von 2  $\mu$ M AGE in Medium aufgenommen. Die Gewinnung des konditionierten Mediums erfolgte nach 12 Stunden.

Die Entkopplung der Atmungskette erfolgte mit 20  $\mu\text{M}$  FCCP, wodurch verstärkt Radikale freigesetzt werden. Als Folge stieg die neurotoxische Wirkung des konditionierten Mediums um ca. 10% an (Abb. 19). Außerdem wurde die Atmungskette mit 5  $\mu\text{M}$  Rotenone gehemmt, was zu einer energetischen Unterversorgung der Mikroglia innerhalb der 12 h führen könnte. Das so konditionierte Medium zeigte jedoch nur eine Verminderung der Toxizität um 5% bei einer  $\pm$ Standardabweichung von 4%.

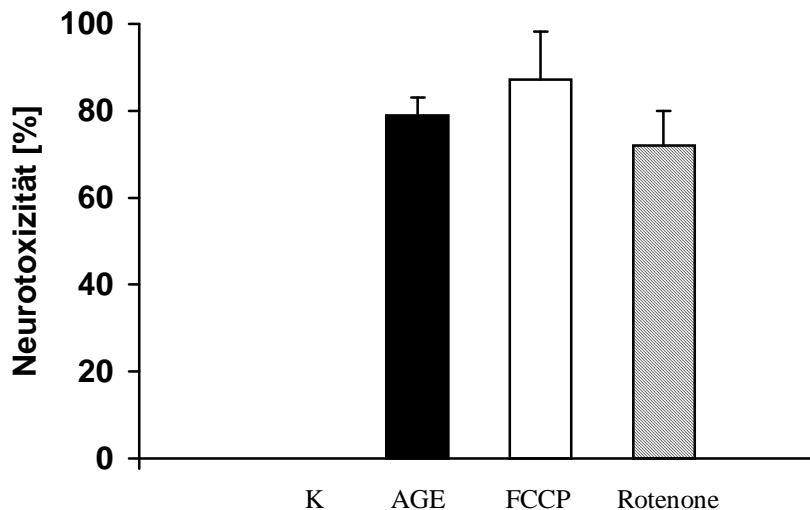


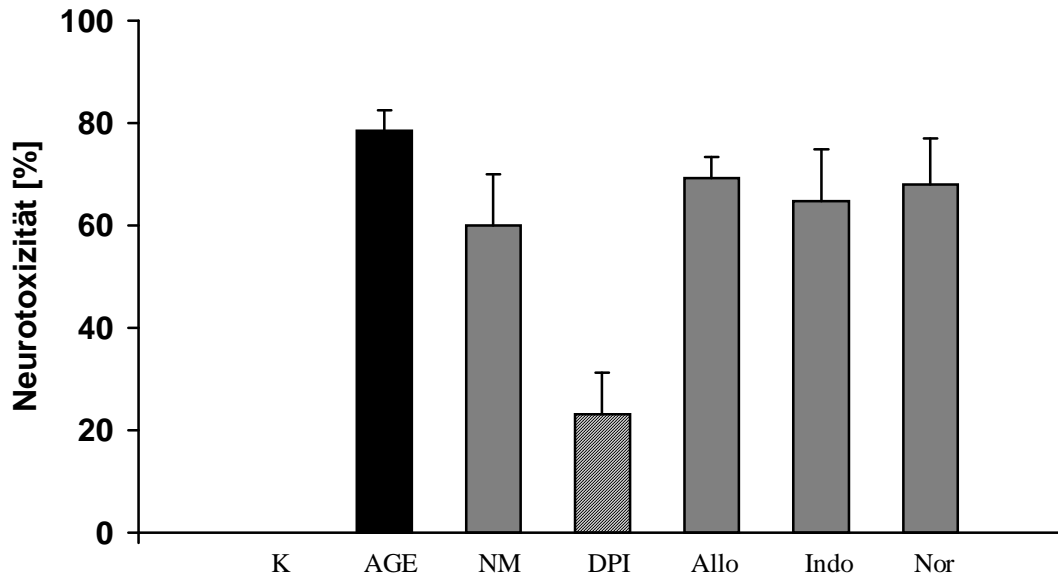
Abb. 19) Mitochondrial bedingte Neurotoxizität des mikroglia-konditionierten Mediums  
Die Neurotoxizität des konditionierten Mediums nach AGE Behandlung beträgt 80%. Die Vorbehandlung der Mikroglia mit 20  $\mu\text{M}$  FCCP führt zu einer Neurotoxizität von 92%, die Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  Rotenone zeigt eine Neurotoxizität von 75%. Die Werte mit Standardabweichung beziehen sich auf 3 wells einer Mikrotiterplatte (LDH-Test) von drei typischen Experimenten; ( $p < 0,05$ ).

### III.3.2.3. Hemmung verschiedener Radikalbildner in Mikrogliazellen und deren Einfluß auf die neurotoxische Wirkung des mikroglia-konditionierten Mediums

Außer der mitochondrialen Herkunft gibt es verschiedene enzymatische Quellen, die freie Radikale produzieren. Mögliche Quellen neurotoxischer Radikale sind die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS "inducible nitric oxide synthase"), die Cyclooxygenase, die Xanthin Oxidase und die Lipoxygenase. Um den Einfluß der verschiedenen Radikalquellen auf die Neurotoxizität des konditionierten Mediums zu untersuchen, wurden die Mikroglia mit den jeweiligen Inhibitoren 20 min vor der Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  AGE behandelt. Das konditionierte Medium wurde nach 12 h entnommen und für die Weiterführung der Neuronenkultur eingesetzt.  $\text{N}^{\text{G}}$ -methyl-L-arginin wurde in einer



Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die Neurotoxizität reduzierte sich dabei geringfügig um 20%. Wesentlich deutlicher fiel die Verringerung der Neurotoxizität aus wenn die Mikroglia mit 0,1  $\mu\text{M}$  DPI (Diphenylene iodonium) vorbehandelt wurden. Hier verringerte sich die Toxizität um 77% (Abb. 20). DPI hemmt die NADPH Oxidase, den Enzymkomplex, der den "oxidativen burst" in Phagozyten ausmacht [Babior, 1999 #841].



**Abb. 20) Veränderte Neurotoxizität des konditionierten Mediums nach Präinkubation der Mikroglia mit Inhibitoren verschiedener Radikalquellen**

Im Vergleich zu dem AGE-mikroglia-konditionierten Medium (AGE) zeigen die Inhibitoren der Xanthin Oxidase, der Lipoxygenase und der Cyclooxygenase Allopurinol (Allo), Indomethacin (Indo) und Nordihydroguaretinsäure (Nor) nur eine geringfügige Verringerung der Neurotoxizität auf jeweils 70%, 69% und 72%. Der Inhibitor N<sup>G</sup>-methyl-L-arginin (NM) in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  verringert die Neurotoxizität durch die Hemmung der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase und reduziert die Toxizität auf 65%. Wesentlich ausgeprägter ist der neuroprotektive Effekt aufgrund der Hemmung der NADPH Oxidase durch 10  $\mu\text{M}$  DPI, was die Toxizität auf 26% reduziert. Die Werte mit Standardabweichung beziehen sich auf 3 wells einer Mikrotiterplatte (LDH-Test) von drei typischen Experimenten; ( $p < 0,05$ ).

Der Inhibitor der Cyclooxygenase wurde in einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Indomethacin wirkt nichtsteroidal antiinflammatorisch [McGeer, 1999 #622]. Hier zeigte sich eine geringfügige Verbesserung von ca. 10% auf die Überlebensfähigkeit der Neuronen.

Ebenso geringfügig verminderten die Inhibitoren 300  $\mu\text{M}$  Allopurinol und 5  $\mu\text{M}$  Nordihydroguaretinsäure (Abb. 20) die Neurotoxizität. Allopurinol hemmt die Xanthin Oxidase und Nordihydroguaretinsäure die Lipoxygenase.

### III.3.2.4. Hemmung aktivierender Signalkaskaden und daraus resultierende Veränderungen in der Neurotoxizität des mikroglia-konditionierten Mediums

Nach der Bindung an den Rezeptor werden Kinasen innerhalb der Signalkaskaden aktiviert, die in einem komplexen Netz die Signaltransduktion regulieren. Hier wurde vor allem auf solche Kinasen und Signaltransduktionswege eingegangen, die zu einer NF- $\kappa$ B Aktivierung führen können. Die Mikrogliazellen wurden mit den folgenden Inhibitoren 30 min vor der Zugabe von 2  $\mu$ M AGE inkubiert. Das von den Mikrogliazellen sezernierte konditionierte Medium wurde nach 12 h entnommen. Der bereits für die NF- $\kappa$ B Inhibitionsstudien eingesetzte Inhibitor von ERK1, PD98059 (10  $\mu$ M) zeigt kaum eine Verringerung der Neurotoxizität, während die anderen Inhibitoren eine deutlichere Reduktion dieser aufwiesen. Die Hemmung der Tyrosin-Kinase mit 10  $\mu$ M Genistein verringerte die Neurotoxizität auf etwa die Hälfte (Abb. 21).

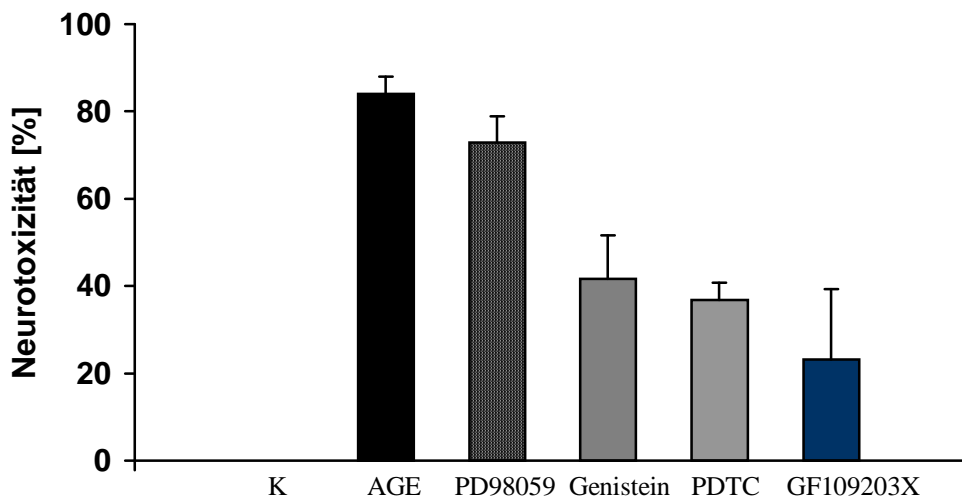


Abb.21) Veränderung der Neurotoxizität des konditionierten Mediums durch Inhibitoren. Die Hemmung der ERK1 durch 10  $\mu$ M PD98059 zeigt eine Verringerung der Neurotoxizität auf 89%. Die Inhibitoren der Tyrosin-Kinasen, von NF- $\kappa$ B und von der Protein-Kinase C, Genistein, PDTC und GF109203X wurden jeweils in einer Konzentration von 10  $\mu$ M eingesetzt. Diese reduziert die Neurotoxizität des jeweiligen konditionierten Mediums auf 89%, 75% und auf 50%. Die Werte mit Standardabweichung beziehen sich auf 3 wells einer Mikrotiterplatte (LDH-Test) von drei typischen Experimenten; ( $p < 0,05$ ).

Durch die breite Hemmung der Tyrosin-Kinasen ist eine sehr große Zahl von Signalkaskaden involviert. Der NF- $\kappa$ B Inhibitor Pyrrolidin-dithiocarbamat (PDTC) in

einer 10  $\mu\text{M}$  Konzentration zeigte sogar eine Reduktion auf ca. 40% verbleibender Toxizität. Aufgrund seiner Eigenschaft als Antioxidans greift PDTC möglicherweise in einer signalkaskadenunabhängigen Weise in die Neurotoxizität ein. Der Hemmstoff GF109203X inhibiert die Proteinkinase-C (PKC), wobei 10  $\mu\text{M}$  GF109203X die Neurotoxizität bis auf 37% verminderten (Abb. 21).

### **III.3.2.5. Bestätigung und Einstufung der Wirksamkeit der Inhibitoren auf die Neurotoxizitätsänderungen des konditionierten Mediums**

Präinkubation mit Inhibitoren der Signaltransduktion führen zu Veränderungen der Zytotoxizität des konditionierten Mediums. Um die Veränderungen der Neurotoxizität zu bestätigen, wurde ein weiterer Toxizitätstest herangezogen, der MTT-Test, der die Umsetzung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) spektrometrisch verfolgt. Dieser erfasst die Aktivität von Enzymen der mitochondrialen Atmungskette und cytosolischer, NADH-abhängiger Enzyme.

Die N11 Zellen wurden mit 2  $\mu\text{M}$  AGE behandelt, für 12 h inkubiert und die Zellen anschließend abzentrifugiert. Der Überstand, das sogenannte konditionierte Medium, wurde weiterverwendet, um die murinen Neuronen ("neuro-2a") für weitere 48 h zu kultivieren. Anhand der Stoffwechselrate, die in Form des umgesetzten MTTs gemessen wurde konnte auf die Überlebensrate der Neuronen rückgeschlossen werden. Diese Werte wurden mit den vorher ermittelten Werten des LDH-Zytotoxizitätstests verglichen (Tab. 2). Die Inhibitoren FCCP und Rotenone wurden bezüglich ihres MTT-Umsatzes nicht untersucht, da diese direkten Einfluß auf die mitochondrialen Funktionen nehmen und somit die Ergebnisse verfälschen würden.

Die MTT Umsatzrate korreliert mit der Überlebensrate der Neuronen. Die Neuronen, die mit unbehandeltem Medium inkubiert wurden haben eine Überlebensrate von 100%. Im Vergleich dazu überleben 0% der Neuronen, die mit dem Detergenz Triton X100 behandelt wurden, das eine vollständige Zerstörung der Zellen bewirkt.

Im Gegensatz dazu wurde für die LDH Bestimmung die Freisetzung von Lactatdehydrogenase aus den geschädigten Zellen gemessen. Hier entspricht die Prozentangabe der Sterberate der Neuronen. Die Behandlung der Neuronen mit

unbehandeltem Medium betrug 0%, die Lyse der Zellen mit Triton X100 hatte eine 100%ige Neuronensterblichkeit zur Folge.

Durch die Überprüfung der Neurotoxizität im MTT Test wurde bestätigt, daß die Hemmung der Translation mit Cycloheximid beziehungsweise die, der Transkription mit Actinomycin D keinen Einfluß auf die Toxizität des konditionierten Mediums hatte (Tab. 3).

**Tabelle 3) Neurotoxizität des mikroglia-konditionierten Mediums**

Substanz	Konzentration	Funktion	LDH-Freisetzung [%] in (48 h):	MTT-Reduktion [%] in (48h):
Medium			0	100
Kontrolle mit AGE (direkt)	2 µM AGE		0	100
Triton X100	2%	Lyse der Zellen	100	0
AGE	2 µM AGE	Aktiviert die Mikroglia	80 ± 7	25 ± 6
Die folgenden Substanzen wurden mit 2 µM AGE koinkubiert:				
Cycloheximid	500 nM	Hemmung der Translation	86 ± 7	26 ± 11
Actinomycin D	10 µg/ml	Hemmung der Transkription	80 ± 6	24 ± 7
FCCP	20 µM	Entkoppelt die Atmungskette	87 ± 11	-
Rotenone	5 µM	Inhibitor des Komplex I der Atmungskette	72 ± 8	-
N-Methylarginine	100 µM	Hemmung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-synthase	60 ± 10	26 ± 12
DPI	10 µM	NADPH Oxidase Hemmung	23 ± 8	77 ± 14
Allopurinol	300 µM	Xanthin Oxidase Hemmung	69 ± 4	25 ± 9
Indomethacin	500 µM	Cyclooxygenase Hemmung	65 ± 10	27 ± 6
Nordihydroguaretinsäure	5 µM	Lipoxygenase Hemmung	68 ± 9	28 ± 8
PD98059	10 µM	ERK1/2 Hemmung	73 ± 6	29 ± 10
Genistein	10 µM	Tyrosin-Kinasen Hemmung	42 ± 10	49 ± 8
PDTC	10 µM	NF-κB Hemmung	37 ± 4	57 ± 9
GFX	10 µM	PKC Hemmung	23 ± 16	74 ± 11

Die Inhibierung der Radikalquellen Xanthin Oxidase, Cyclooxygenase und Lipoxygenase hatte in der MTT Untersuchung keinen Einfluß auf Überlebensrate der Neuronen. Die Präinkubation der Mikroglia mit 10  $\mu$ M PD98059 hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Überlebensrate der Neuronen im konditionierten Medium, während die Vorbehandlung mit 10  $\mu$ M Genistein, 10  $\mu$ M PDTC oder 10  $\mu$ M GFX109203X (GFX), zu jeweils 49%, 57% und 74% Überlebensrate führte. Diese Werte lagen deutlich über der 25%igen Überlebensrate von Neuronen in einem konditionierten Medium, das von Mikroglia stammte, die nur mit AGE behandelt wurden.

Die sehr gute protektive Wirkung des NADPH Oxidase Inhibitors DPI wurde hier mit dem höchsten Wert bestätigt. Eine Vorbehandlung der Mikroglia mit 10  $\mu$ M DPI erhielt 77% der Neuronen in dem konditionierten Medium am Leben.

### **III.4. Eigenschaften des mikroglia-konditionierten Mediums**

#### **III.4.1. Zeitraum der Freisetzung des toxischen Agens in das konditionierte Medium**

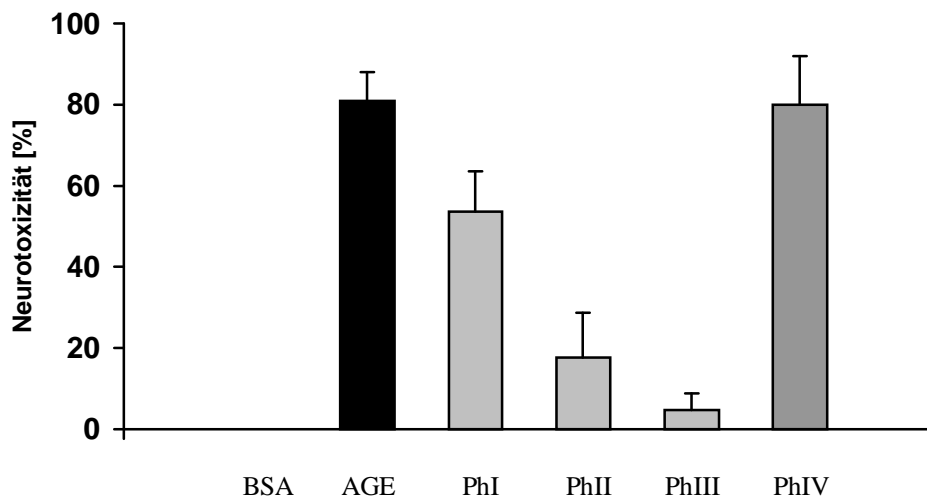
Aufgrund der vorliegenden Daten spricht vieles dafür, daß die neurotoxische Substanz von der NADPH Oxidase gebildet wird. Der "oxidative burst" findet innerhalb einer halben Stunde nach der Zellaktivierung statt. Aus diesem Grund wurde überprüft, wann die neurotoxische Komponente in das konditionierte Medium sezerniert wird. Dazu wurden Mikrogliazellen mit 2  $\mu$ M AGE aktiviert.

Um die Stärke der neurotoxischen Wirkung des konditionierten Mediums zu vergleichen, wurde nach der Mikrogliaaktivierung zu drei verschiedenen Zeitpunkten für die Dauer von 15 min Medium konditioniert.

Dazu wurden in der Phase I (PhI) die Mikrogliazellen 15 min nach der Mikrogliaaktivierung abzentrifugiert, und das konditionierte Medium entnommen. In der Phase II (PhII) wurde das Medium 15 min nach der Mikrogliaaktivierung gewechselt und nach weiteren 15 min das konditionierte Medium entnommen. Dadurch werden die Substanzen, die innerhalb der ersten Viertelstunde sezerniert wurden nicht erneut gemessen. Entsprechend wurde in der Phase III (PhIII) das Medium 30 min nach der Mikrogliaaktivierung gewechselt und nach weiteren 15 min das konditionierte Medium

entnommen. Hiermit werden nur Substanzen berücksichtigt, die in dem Zeitraum 30 min bis 45 min nach der Mikrogliaaktivierung freigesetzt werden.

Außerdem wurde Medium getestet, das im Zeitraum 0 min bis 45 min nach der Mikrogliaaktivierung gebildet wird (PhIV). Dieses erzielt eine maximale Toxizität, die durch eine 12-stündige Konditionierung des Mediums (AGE) nicht übertroffen wurde (Abb. 22). Hier zeigte sich, daß die neurotoxische Komponente sehr rasch gebildet wurde, 68% der maximalen neurotoxischen Wirkung wurde bereits innerhalb der ersten 15 min in das konditionierte Medium übertragen. Medium, das erst in der Phase II konditioniert wurde (PhII) zeigte eine nur 26%ige neurotoxische Wirkung, das der Phase III (PhIII) erzielte nur eine 5%ige Neurotoxizität.



**Abb. 22) Zeitliche Abhängigkeit der Neurotoxizität**

Die Mikroglia wurden mit 2  $\mu$ M AGE stimuliert.

Das konditionierte Medium (k.M.) wurde nach jeweils 15 min der Zeitphasen I-III entnommen (PhI-PhIII).

**PhI:** 15 min nach der Mikrogliaaktivierung wurden die Mikrogliazellen abzentrifugiert und das k.M. entnommen.

**PhII:** 15 min nach der Mikrogliaaktivierung, wurde das Medium gewechselt, nach weiteren 15 min wurden die Mikrogliazellen abzentrifugiert und das k.M. entnommen.

**PhIII:** 30 min nach der Mikrogliaaktivierung, wurde das Medium gewechselt, nach weiteren 15 min wurden die Mikrogliazellen abzentrifugiert und das k.M. entnommen.

Im Vergleich dazu wurde die Mikrogliazellen in der Zeitphase IV (PhIV) 45 min nach der Mikrogliaaktivierung abzentrifugiert und das k.M. entnommen. In der Phase I beträgt die Neurotoxizität 68% (PhI) der maximalen Toxizität, die durch eine 12stündige Konditionierung erzielt wird (AGE). In der Phase II (PhII) und Phase III (PhIII) reduziert sich diese auf 26% bzw. 5%. Die 45minütige Konditionierung (PhIV) erreicht bereits die maximale Toxizität (AGE). Die Werte mit Standardabweichung beziehen sich auf 4 wells einer Mikrotiterplatte von drei typischen Experimenten.

### III.4.2. Temperaturabhängigkeit der Neurotoxizität des konditionierten Mediums

Als weitere Qualität wurde die Temperaturbeständigkeit der neurotoxischen Komponente in dem konditionierten Medium untersucht. Die Mikrogliazellen wurden für 12 h mit 2  $\mu\text{M}$  AGE behandelt und das konditionierte Medium verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Als Vergleichswert diente AGE, das bei Raumtemperatur eine halbe Stunde gelagert wurde. Nach 48 h Inkubation der Neuronen mit diesem Medium zeigte 82%ige Neurotoxizität (Abb. 21). Das konditionierte Medium erwies sich als hitzebeständig, und verlor auch bei 30 minütigem Erhitzen bei 70°C nur 25% der maximalen Toxizität. Erst nach 30 min bei 100°C reduzierte sich die Toxizität auf 37% (Abb. 23).

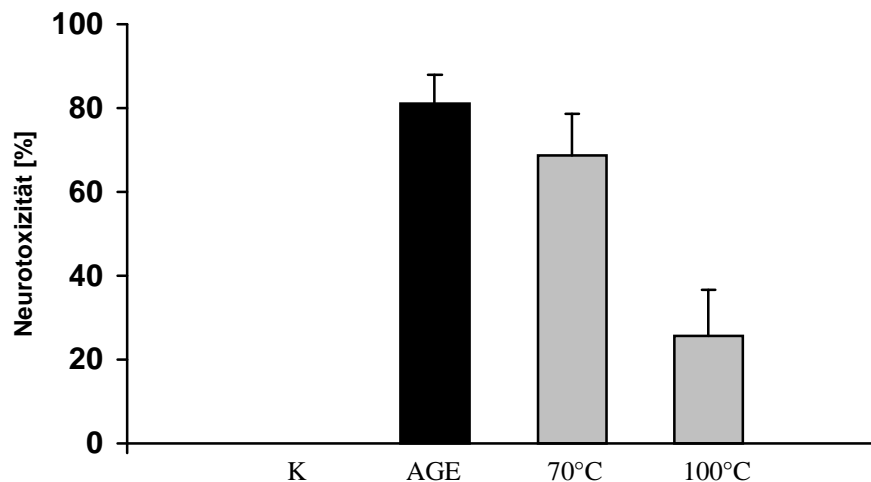


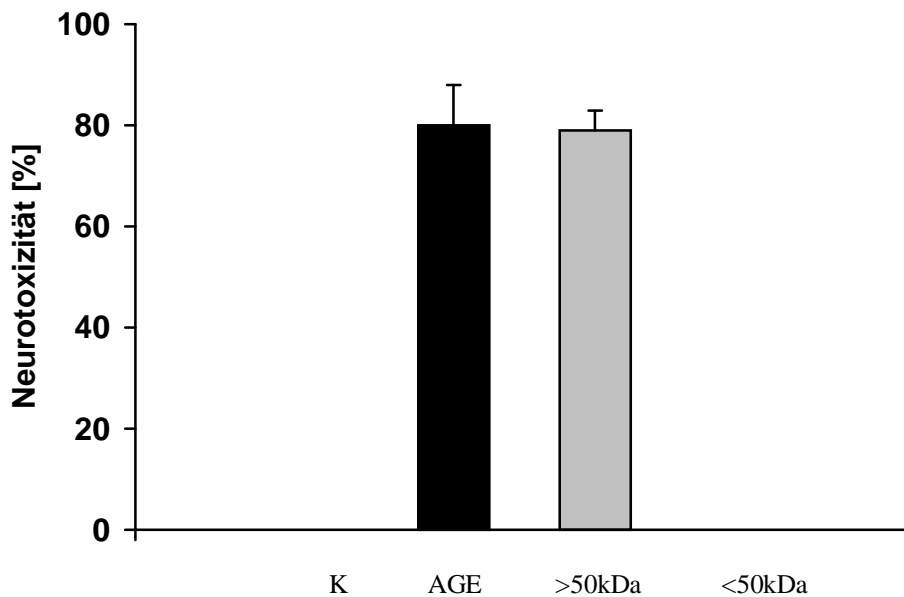
Abb. 23) Temperaturabhängigkeit des konditionierten Mediums

Mikrogliazellen wurden für 12 h mit 2  $\mu\text{M}$  AGE behandelt, das von ihnen konditionierte Medium für die Kultivierung der Neuronen eingesetzt. Ein Ansatz des konditionierten Mediums wurde 30 min bei Raumtemperatur gelagert und erzielt eine Toxizität von 81%, die als die maximale Toxizität bezeichnet wird. Ein weiterer Ansatz des konditionierten Mediums wurde für 30 min auf 70°C erhitzt, worauf sich die Neurotoxizität auf 85% der maximalen Toxizität verringert. In einem Ansatz der 30 min bei 100°C erhitzt wurde reduzierte sich die neurotoxische Wirkung auf 37%. Die Werte mit Standardabweichung beziehen sich auf 4 wells einer Mikrotiterplatte von drei typischen Experimenten.

### III.4.3. Größeneingrenzung des toxischen Agens

Um Aufschluß über die Größe des toxischen Agens zu erhalten, wurde das konditionierte Medium filtriert. Mikrogliazellen wurden für 12 h mit 2  $\mu\text{M}$  AGE inkubiert, die Zellen abzentrifugiert, und das konditionierte Medium durch Ultrafiltration in verschiedene

Fraktionen aufgetrennt. Nach der Ultrafiltration durch einen Filter der Ausschlußgrenzen von 15 kDa, 30 kDa und 50 kDa (Filtron) wurde das Filtrat als Medium für die Neuronenkultivierung verwendet. Der Überstand wurde in Medium aufgenommen, das dem ursprünglichen Volumen entsprach, und ebenfalls für die Kultivierung der Neuronen verwendet. Die Filtrate und Überstände der 15kDa und 30 kDa Ultrafilter zeigten dasselbe Ergebnis wie die Filtration mit dem 50 kDa Ultrafilter, so daß dieser stellvertretend für alle drei Ultrafilter in der Grafik dargestellt ist (Abb 24).



**Abb. 24) Größenbestimmung des neurotoxischen Agens**

Mikrogliazellen wurden für 12 h mit 2µM AGE behandelt, das von ihnen konditionierte Medium für die Kultivierung der Neuronen eingesetzt. Das konditionierte Medium aus AGE-behandelten Mikroglia wurde durch einen Filter der Ausschlußgrenze 50 kD filtriert. Der Überstand (>50 kDa) zeigt die volle Toxizität, während im Filtrat (<50 kDa) keine neurotoxische Wirkung zeigte. Die Werte mit Standardabweichung beziehen sich auf 4 wells einer Mikrotiterplatte von zwei typischen Experimenten.

Wie sich zeigte, war die Toxizität bei allen drei Ausschlußgrenzen weiterhin im Überstand vorhanden, während das Filtrat nicht neurotoxisch war. Somit handelt es sich bei dem gesuchten Agens um ein sehr großes Molekül, das bis zu 70°C hitzestabil ist und mit dem "oxidativen burst" der aktivierten NADPH Oxidase in Zusammenhang steht.



### III.4.4. Einflußnahme von Übergangsmetallen auf die Neurotoxizität des konditionierten Mediums

Die direkte Neurotoxizität, die durch A $\beta$  und AGEs vermittelt wird, ist unter anderem abhängig von Übergangsmetallen. Hier sollte untersucht werden, ob es auch für die indirekte Neurotoxizität einen solchen Zusammenhang gibt. Aufgrund der chelatbildenden Eigenschaften von EDTA ist dieses in der Lage die Übergangsmetalle zu komplexieren, so daß diese aus dem konditionierten Medium entfernt werden können. Hierzu wurden Mikrogliazellen für 12 h mit 2  $\mu$ M AGE inkubiert, das konditionierte Medium für 24 h bei 4°C gegen eine Lösung von 0,15 M NaCl mit 0,1 mM EDTA dialysiert, um eine Komplexbildung zu bewirken. Das EDTA und eventuelle EDTA Komplexe wurden durch eine weitere Dialyse gegen 0,15 M NaCl für 24 h bei 4°C entfernt. Dies führte dazu, daß die Neurotoxizität vollständig verschwand (EDTA), im Gegensatz zu nicht weiter behandeltem konditionierten Medium (AGE). Letzteres zeigte eine Neurotoxizität von 82% (Abb. 25). Bei einer Dialyse des konditionierten Mediums gegen 0,15 M NaCl für 24 h bei 4°C blieb die Neurotoxizität bei 81%.

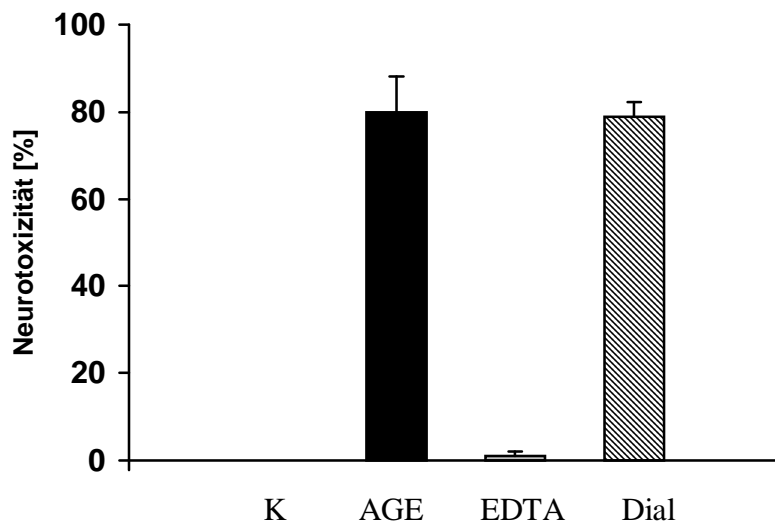


Abb. 25) Dialyse des konditionierten Mediums

Mikroglia wurden für 12 h mit 2  $\mu$ M AGE inkubiert. Nach dem Entfernen der Zellen wurde das konditionierte Medium als solches eingesetzt, beziehungsweise dialysiert. Das direkt eingesetzte konditionierte Medium erzielte eine Toxizität von 82% (AGE), die Behandlung mit Medium (K) zeigt keine Neurotoxizität. Nach der 24stündigen Dialyse des konditionierten Mediums gegen eine NaCl / EDTA Lösung wurde dieses erneut für 24 h gegen eine NaCl Lösung dialysiert. Dadurch verringert sich die Neurotoxizität des so behandelten Mediums auf null (EDTA). Die Dialyse konditionierten Mediums gegen NaCl zeigt eine 80%ige Toxizität (Dial). Die Werte mit Standardabweichung beziehen sich auf 4 wells einer Mikrotiterplatte von drei typischen Experimenten.

## III.5. NADPH Oxidase

### III.5.1. Deaktivierung der NADPH Oxidase

Aufgrund der pharmakologischen Inhibierung der NADPH Oxidase durch DPI konnte nicht eindeutig ausgesagt werden, ob die daraus resultierende Wirkung der verringerten Neurotoxizität tatsächlich auf die Hemmung der NADPH Oxidase zurückzuführen war, oder ob DPI an anderen Ansatzpunkten wirkte. Eine Kombination von Einwirkungen von denen die NADPH Oxidase nur ein Teilaspekt ist, konnte ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Daher sollte die NADPH Oxidase funktionsunfähig gemacht werden.

Die NADPH Oxidase ist ein membranständiger Komplex, der große Mengen an Superoxid erzeugt. Während diesem sogenannten "oxidativen burst" werden Elektronen von NADPH auf den Sauerstoff übertragen. Das Superoxid und die daraus resultierenden Derivate wie Wasserstoffperoxid und hypochlorige Säure sind essentiell für mikrobizidalen Aktivitäten. Die NADPH Oxidase liegt in einem inaktiven Zustand vor, und wird durch Lipopolysaccharid, Phorbolster, opsonisierte Bakterien, viralen Oberflächenstrukturen oder andere Stimuli aktiviert. Dabei lagern sich zytosolische und membranständige Teile aneinander. Die zytosolischen Komponenten, das p47<sup>phox</sup> und das p67<sup>phox</sup> lagern sich nach der Aktivierung an die membranständigen Komponenten gp91<sup>phox</sup> und p22<sup>phox</sup> an (Abb. 26).

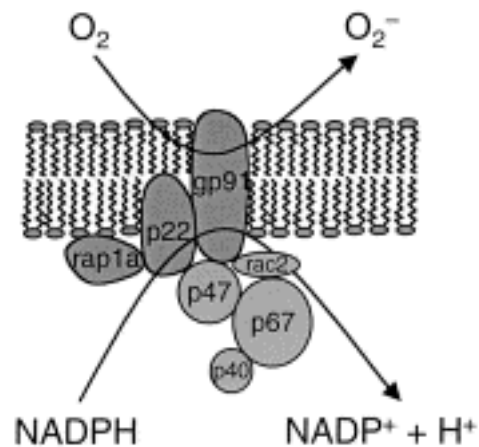


Abb. 26) Aufbau der NADPH Oxidase (modifiziert nach Dahlgren et al. 1999)

Nach der Aktivierung der NADPH Oxidase lagern sich die zytosolischen Komponenten p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> an die membranständigen Komponenten p22<sup>phox</sup> und gp91<sup>phox</sup> an. Im Rahmen des "oxidativen bursts" überträgt die NADPH Oxidase Elektronen von NADPH auf den Sauerstoff. Um die Funktionsfähigkeit der NADPH Oxidase zu verhindern, soll die membranständige Untereinheit gp91<sup>phox</sup> inaktiviert werden.

### III.5.1.1. Inaktivierung der gp91<sup>phox</sup> Untereinheit der NADPH Oxidase

Die große membranständige Untereinheit, das gp91<sup>phox</sup> beinhaltet drei Exons. Um ein gezieltes Abschalten dieses Gens zu erzielen wurde ein Zielvektor konstruiert, der ein nicht mehr funktionelles Exon 3 des gp91<sup>phox</sup> enthält (Abb. 27). Dieses veränderte Exon 3 sollte durch homologe Rekombination in das Genom der Mikogialinie N11 integrieren. Da es sich bei der homologen Rekombination um ein seltenes Ereignis handelt, muß diejenige Zelle in der sie stattgefunden hat aus einer großen Anzahl weiterer Zellen herausselektiert werden, die keine Veränderungen aufweisen. Aus diesem Grund wurde ein doppeltes Selektionssystem gewählt. Der Zielvektor beinhaltet aus diesem Grund eine Neomycinresistenz und eine funktionelle "Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase" (HSV-tk).

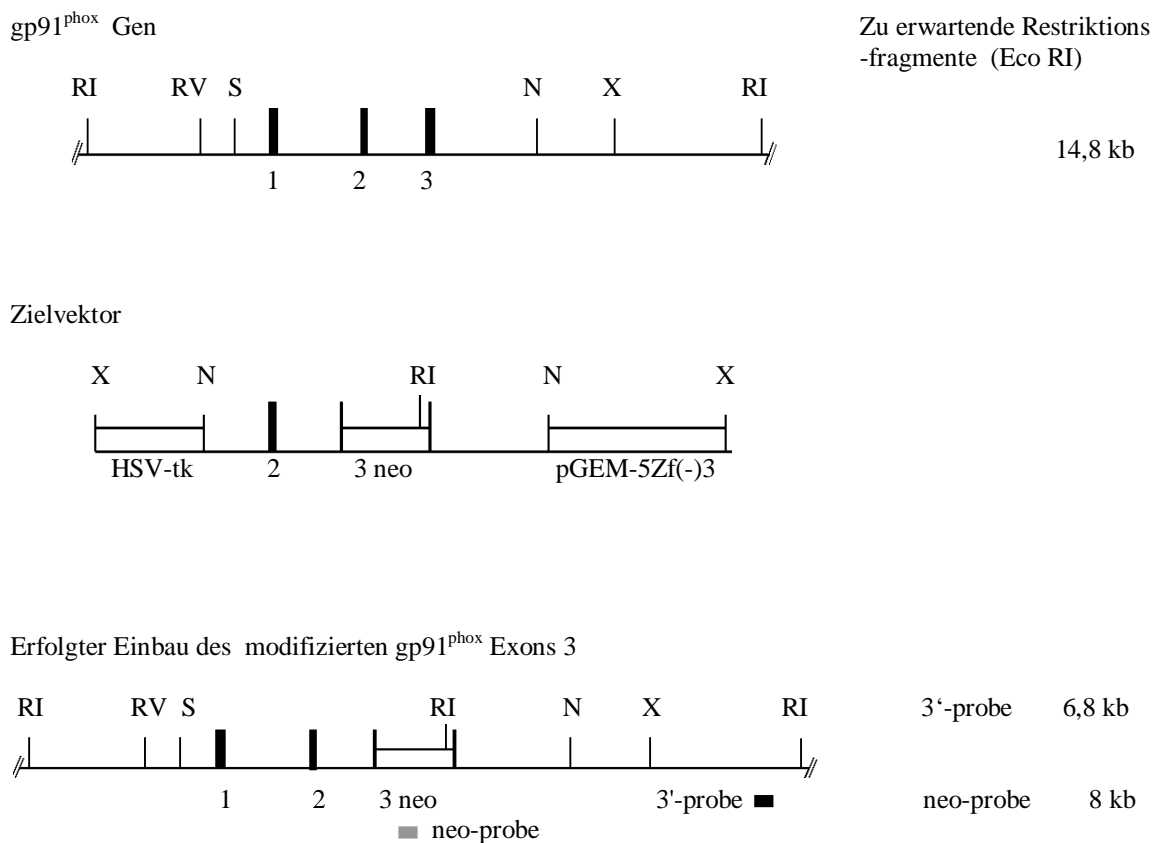


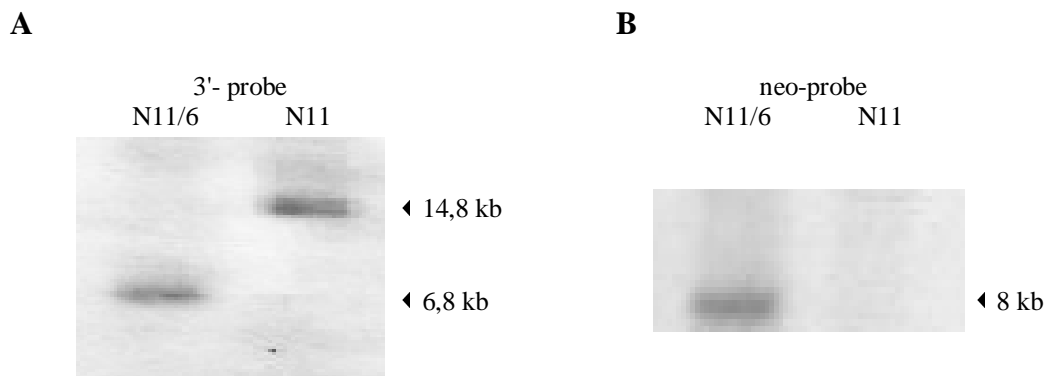
Abb. 27) Struktur des Zielvektors und Auszug der Restriktionskarte des murinen gp91<sup>phox</sup> Genortes vor und nach der gezielten Integration. Die ausgefüllten Rechtecke repräsentieren die Exons 1 bis 3, RI, RV, S, N und X sind die Schnittstellen für Eco RI, Eco RV, Sca I, Nco I und Xba I. Die Neomycin-Expressions-Kassette ist durch neo gekennzeichnet. Die für eine Hybridisierung verwendeten Proben sind als "neo-probe" und als "3'-probe" gekennzeichnet. Die zu erwartenden Größen nach einem

Restriktionsverdau sind für das genomische Produkt mit 14,8 kb und für den Integrationsfall mit 6,8 kb einer 3'-probe und 8 kb einer neo-probe angegeben.

Durch die erfolgreiche homologe Rekombination wird das Gen neo in das Exon 3 integriert, das den Zellen eine Resistenz gegen das Antibiotikum Neomycin verleiht. Aufgrund der Neomycinresistenz können mit dem Neomycinanalogon Geneticin (G418) die Zellen herausselektiert werden, die homolog rekombiniert haben, da diejenigen ohne Integration absterben.

Der zweite Selektionsprinzip beruht auf einer negativen Selektion. Durch einen erfolgreichen Einbau des unterbrochenen Exons 3 in das Zellgenom wird die HSV-tk mit dem übrigen Teil des Zielvektors entfernt. Eine Behandlung mit Ganciclovir hat keine Folgen da keine funktionelle HSV-tk vorliegt. Bei einer zufälligen Integration des gesamten Zielvektors an einer beliebigen Stelle des Genoms oder ohne einen Einbau des Zielvektors hingegen, würden die Zellen absterben, da eine funktionelle HSV-tk das zugesetzte Ganciclovir umwandelt und somit die Zellen vergiftet.

Nach der erfolgten Transfektion wurden in der dreiwöchigen Selektionsphase 460 Subklone herangezogen, die anhand der fehlenden Superoxidproduktion beziehungsweise der veränderten NO-Produktion auf 4 Subklone eingeschränkt wurden. Durch die Integration des veränderten Exons 3 wurde eine weitere EcoRI-Schnittstelle in das Genom integriert. Für einen Southern Blot wurde die genomische DNA mittels EcoRI geschnitten und aufgetrennt (Abb. 28)



**Abb. 28) Integration des unterbrochenen gp91phox in das Zellgenom**

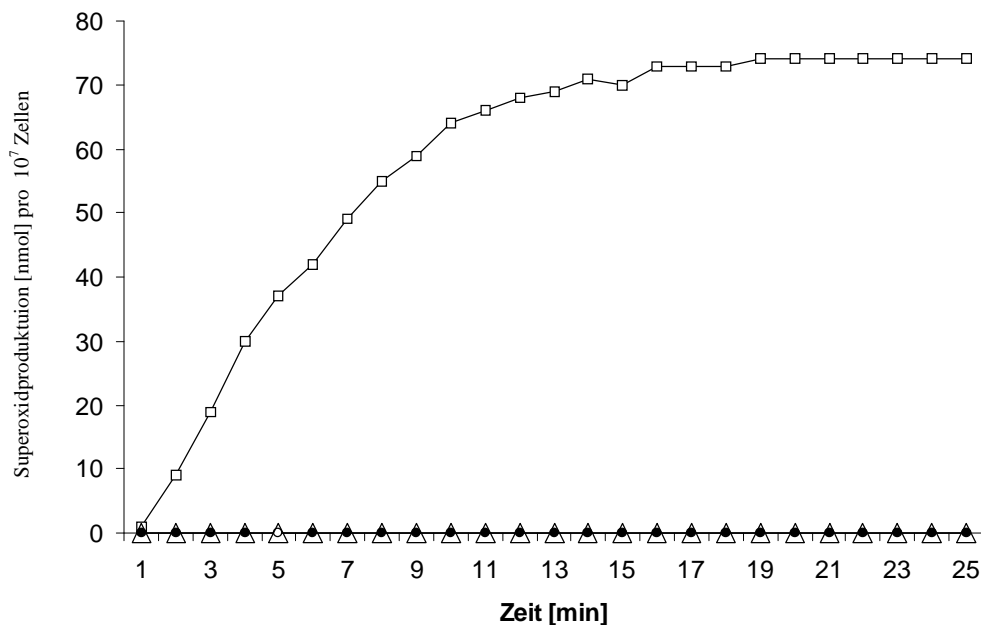
Von den Mikrogliazellen N11 und N11/6 wurde jeweils 10 µg der genomischen DNA mit Eco RI geschnitten und in einer Southern Blot Analyse mit 2 µg der 3'-Proben-DNA untersucht. Diese bindet an ein 14,8 kb DNA-Segment in der Zelllinie N11 und an ein DNA-Segment der Größe 6,8 kb in der Zelllinie N11/6 (A). Nach einer Behandlung mit 2 µg der neo-Proben-DNA zeigt sich keine Hybridisierung in den N11 Zellen, während die N11/6 Zellen ein Hybridisierungsprodukt der Größe 8 kb aufweisen. Die Größen der Hybridkomplexe sind in Kilobasen angegeben.

Die ursprüngliche DNA-Sequenz des gp91<sup>phox</sup> mit den 3 Exons beträgt 14,8 kb zwischen den beiden EcoRI-Schnittstellen, die durch die Integration in die Fragmente 8 kb und 6,8 kb zerschnitten wird. Dadurch hybridisiert eine Sonde im Southern Blot an ein kleineres Fragment, wenn die Integration erfolgreich war. Als Sonde wurde eine Sequenz aus dem 3'-flankierenden Bereich verwendet (3'-Probe). Ohne Integration ergab sich die ursprüngliche Länge des Fragments von 14,8 kb (Abb. 28, A, N11), mit erfolgter Integration ein Fragment mit 6,8 kb Größe (Abb. 28 A, N11/6). Die Neomycin-Probe (neo-Probe) hybridisierte an die erfolgreich integrierte neo-DNA-Sequenz im Subklon N11/6, in der Elternzelllinie N11 hingegen nicht (Abb. 28, B, neo-Probe). Der Subklon N11/6 wurde als NADPH Oxidase defiziente Zelllinie für weitere Untersuchungen verwendet.

### **III.5.1.2. Stimulierte N11/6 Zellen zeigen im Gegensatz zu N11 Zellen keine Superoxidanionenausschüttung**

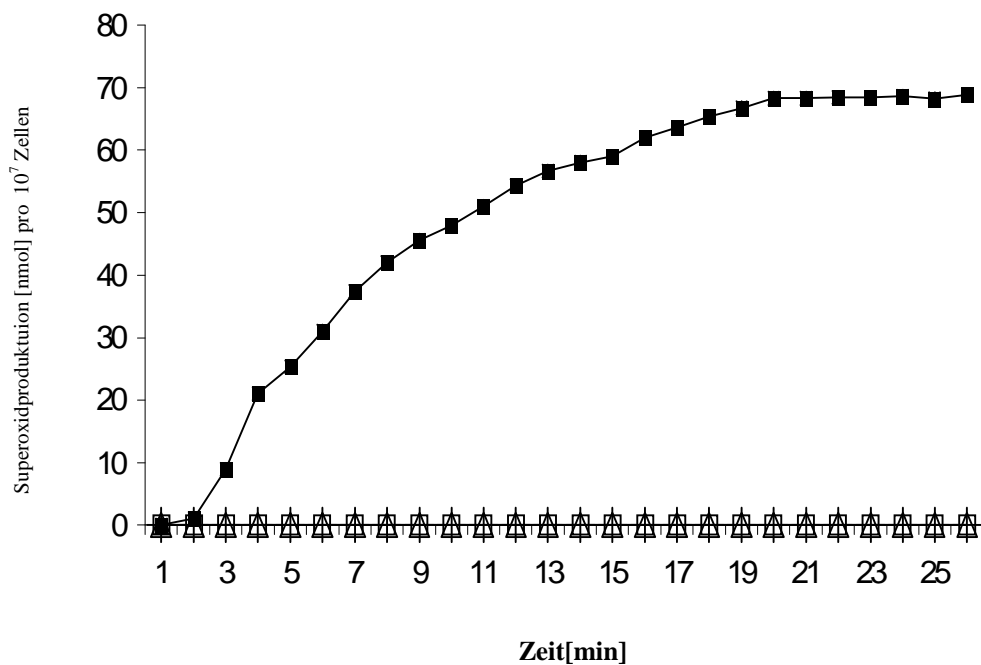
Die Superoxidproduktion wurde durch einen kontinuierlichen Cytochrom-c Reduktionstest bei 37°C in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät untersucht. Dabei werden die nicht membrangängigen Cytochrom-c Moleküle durch reaktive Sauerstoffspezies reduziert, woraufhin die Veränderung in der Absorption des Cytochrom-c gemessen werden kann. In den aktivierten N11-Mikrogliazellen lag die AGE-bedingte Superoxidproduktion nach 20 min bei einer Menge von 74 nmol pro 10<sup>7</sup> Zellen. Im Vergleich dazu betrug die Superoxidproduktion, die in diesen Zellen durch TPA ausgelöst wurde, 600 nmol pro 10<sup>7</sup> Zellen nach 20 min. Bei einer Behandlung der Zellen mit 2µM AGE und 300 U Superoxid Dismutase (SOD) war kein Superoxid messbar. Die N11/6 zeigten bei einer Stimulation mit 2 µM AGE keinen "oxidativen burst" im Form von freigesetztem Superoxid (Abb. 29). Auch bei einer Behandlung mit 10 nM TPA war nach 20 min kein Superoxid feststellbar.

Hierfür wurde 10 µM fibrilläres Aβ<sub>(25-35)</sub> eingesetzt, was zu einer Freisetzung von 60 nmol Superoxid pro 10<sup>7</sup> Zellen nach 20 min führte. Nach einer Behandlung der N11 mit fibrillärem Aβ<sub>(25-35)</sub> und 300 U SOD war während der 25 minütigen Messung kein Superoxid meßbar. Die N11/6 reagierten während der 25 min weder auf 10 µM fibrilläres Aβ<sub>(25-35)</sub>, noch war nach infolge einer TPA Behandlung nach 20 min eine Superoxidfreisetzung messbar (Abb. 30).



**Abb. 29) AGE induzierte Superoxidproduktion in Mikrogliazellen**

Im Cytochrom C Test wurde über einen Zeitraum von 25 min die Superoxidproduktion verfolgt. Der Beginn der Superoxidproduktion war innerhalb von Minuten meßbar, stieg innerhalb von 15 min rapide an und verflachte anschließend. Diese Reaktion wurde in den N11 Zellen durch AGE ausgelöst (□). Durch die Zugabe von SOD zusammen mit AGE zeigte sich keine meßbare Superoxidproduktion (●). In der Zelllinie N11/6 hingegen war keine Reaktion auf AGE feststellbar (Δ).



**Abb. 30) Aβ<sub>(25-35)</sub> stimulierte Superoxidproduktion in Mikrogliazellen**

Diese wurde über einen Zeitraum von 25 min verfolgt. Aβ<sub>(25-35)</sub> stimulierte N11 reagieren mit einem "oxidativen burst" (■). Bei Behandlung der N11 mit 300 U Superoxiddismutase und Aβ<sub>(25-35)</sub> ergibt sich keine Superoxidfreisetzung (●). In den N11/6 hingegen war keine Reaktion auf Aβ<sub>(25-35)</sub> (□) oder TPA (Δ) feststellbar.

### III.5.2. Ursache der mikrogliavermittelten Neurotoxizität

Nachdem die Deaktivierung der NADPH Oxidase in den N11/6 nachgewiesen war, sollte gezeigt werden, daß die NADPH Oxidase Aktivierbarkeit für die Neurotoxizität ausschlaggebend ist. Des weiteren sollten ein möglicher direkter Zusammenhang zwischen der aktivierten NADPH Oxidase und der NF- $\kappa$ B Aktivierung untersucht werden, sowie der Zusammenhang der NF- $\kappa$ B Aktivierung mit der Neurotoxizität.

#### III.5.2.1. AGE führt nur in Mikroglia mit einer funktionellen NADPH Oxidase zu einer NF- $\kappa$ B Aktivierung

Die NF- $\kappa$ B Aktivierbarkeit wurde in einer Gelretentionsuntersuchung in den Zelllinien N11 und N11/6 untersucht. Nach der Stimulation mit 2  $\mu$ M BSA beziehungsweise 2  $\mu$ M AGE wurden die Kernproteine nach 6 Stunden extrahiert. Die Mikrogliazelllinie N11 reagierte mit einer NF- $\kappa$ B Aktivierung, während die N11/6 keinerlei aktiviertes NF- $\kappa$ B aufwies (Abb 31). Der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien N11 und N11/6 besteht in der NADPH Oxidase Funktionalität, die der Zelllinie N11/6 fehlt. Die N11/6 Zelllinie ist nicht in der Lage Superoxid in einem "oxidativen burst" auszuschütten, so daß angenommen werden kann, daß die aus dem Superoxid entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies notwendig sind, um NF- $\kappa$ B zu aktivieren.

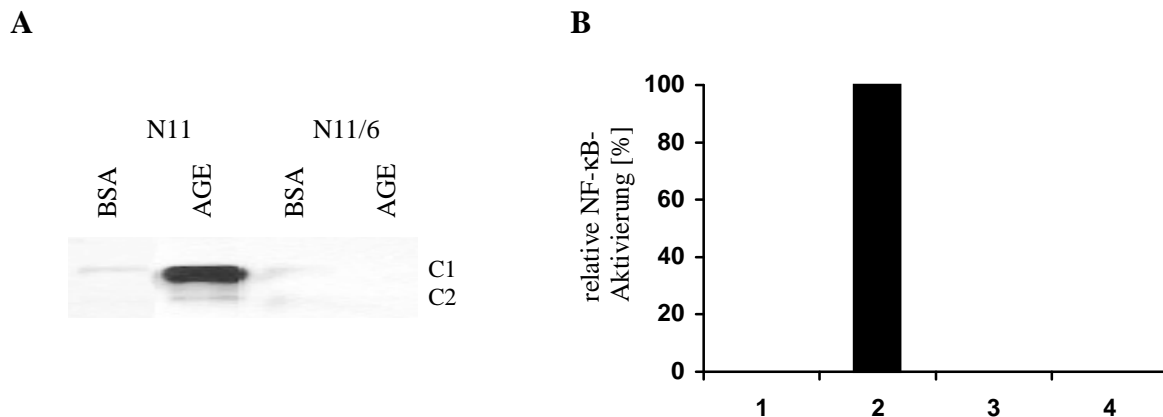


Abb. 31) AGE verursachte NF- $\kappa$ B Aktivierung in Mikroglia

Im EMSA wurde die NF- $\kappa$ B Aktivierung untersucht. Die Mikrogliazellen wurden mit 2  $\mu$ M AGE oder 2  $\mu$ M BSA aktiviert, nach 12 h wurde der Kernextrakt vollzogen. Durch die AGE Behandlung kommt es zu einer NF- $\kappa$ B Aktivierung in den N11 Zellen, während die N11/6 Zellen keine NF- $\kappa$ B Aktivierung aufweisen.

B) Densitometrische Auswertung des C1 Komplexes aus dem EMSA

Der aktivierende NF- $\kappa$ B Komplex (NF- $\kappa$ B) wird durch die Behandlung der Mikrogliazellen N11 und N11/6 mit AGE zu 100% in den N11 und überhaupt nicht in den N11/6 aktiviert. Die Aktivierung durch die Negativkontrolle BSA beträgt in beiden Zelllinien 0%.

### III.5.2.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stimulation führt sowohl in N11 als auch in N11/6 zu NF-κB Aktivierung

NF-κB führt als Transkriptionsfaktor zu der Expression eine sehr breite Palette von Genprodukten, die potentiell neurotoxisch wirken könnten Um zu untersuchen, ob die neurotoxische Wirkung des konditionierten Mediums auf der Aktivierung von NF-κB beruhen, sollte NF-κB unabhängig von der NADPH Oxidase aktiviert werden. Die Mikrogliazellen wurden mit 150 μM Wasserstoffperoxid für 12 h behandelt, um NF-κB zu aktivieren. Die Zelllinie N11 wies eine 100%ige, die Zelllinie N11/6 eine 80%ige NF-κB Aktivierung auf (Abb. 32).

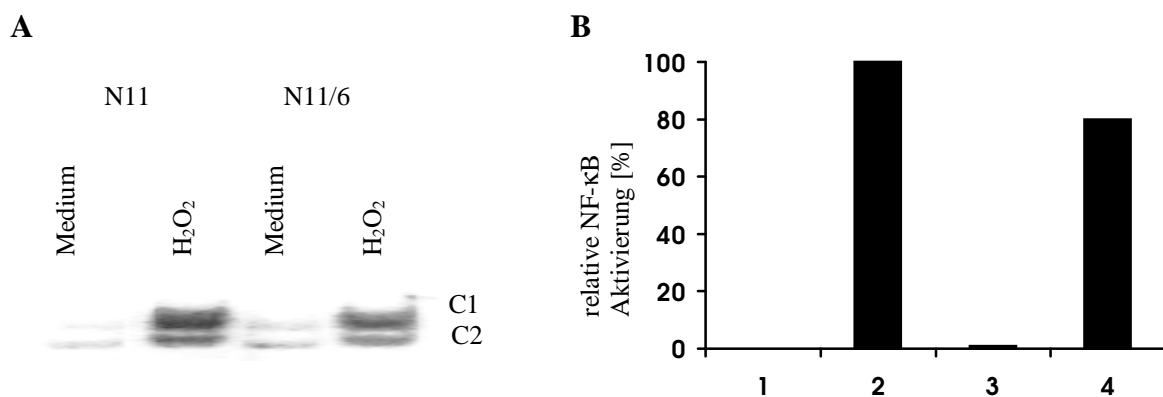


Abb. 32A) Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vermittelte NF-κB Aktivierung ist unabhängig von der NADPH Oxidase  
Die NF-κB Aktivierung wurde mittels EMSA untersucht. Die N11 Zellen bzw. N11/6 Zellen wurden mit 150 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert, nach 12 h wurde der Kernextrakt vollzogen.  
B) Densitometrische Auswertung des C1 Komplex des EMSAs  
Der aktivierende NF-κB Komplex (NF-κB) wurde durch die Behandlung der Mikrogliazellen N11 und N11/6 mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu 100% in den N11 (2) und zu 80% in den N11/6 aktiviert (4). Die Behandlung mit Medium zeigte keine NF-κB Aktivierung (1 und 3).

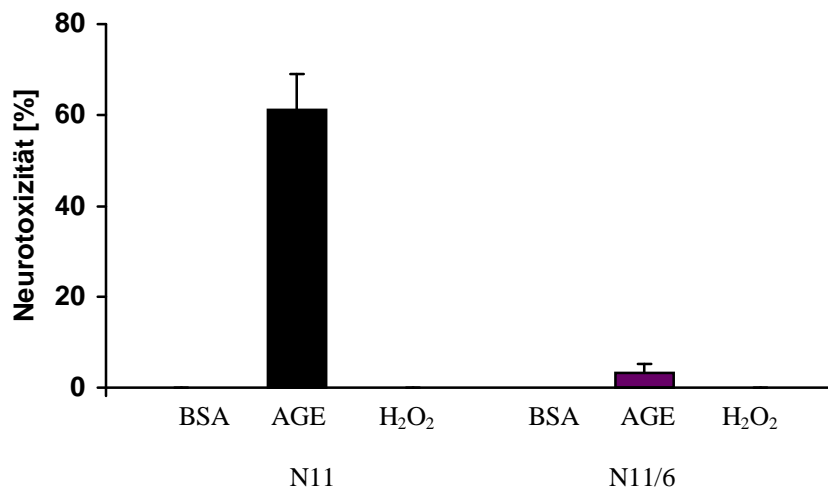
### III.5.2.3. Die mikrogliavermittelte Neurotoxizität ist nicht von der NF-κB Aktivierung sondern von der NADPH Oxidase Aktivierung abhängig

Die Neurotoxizität wurde mit dem LDH Test untersucht. Dazu wurde die Freisetzung von Lactatdehydrogenase aus den geschädigten Zellen gemessen. Der Minimalwert ergab sich aus der LDH Freisetzung von Neuronen in unbehandeltem Medium und betrug 0%, der Maximalwert wurde durch die Lyse der Zellen mit Triton X100 festgelegt, und hatte eine 100%ige LDH Freisetzung zur Folge. Die Mikroglia wurden mit 2 μM AGE oder 2 μM



BSA präinkubiert, nach 5 min mit Puffer gewaschen und mit frischem Medium für 12 Stunden inkubiert, anschließend abzentrifugiert und der Überstand für die Kultivierung der Neuronen weiterverwendet. Die Neurotoxizität des konditionierten Mediums aus den N11 betrug nach AGE-Behandlung 65%, das konditionierte Medium der N11/6 hingegen erreichte nur einen Wert von ca. 6% Toxizität (Abb. 33).

Dies korreliert mit der NADPH Oxidase Aktivität, die nur in N11 gegeben ist, die somit für die neurotoxische Wirkung des mikroglia-konditionierten Mediums notwendig erscheint. Die Neurotoxizität der Wasserstoffperoxid-behandelten Zelllinien N11 und N11/6 war in beiden Fällen gleich Null, obwohl NF- $\kappa$ B in beiden Linien aktiviert wird, wie bereits gezeigt wurde (Abb.32). Das aktivierte NF- $\kappa$ B ist wahrscheinlich nicht direkt an der mikroglia-bedingten Neurotoxizität beteiligt, die in diesem Modellsystem untersucht wurde.



**Abb. 33) AGE und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bedingte Neurotoxizität**

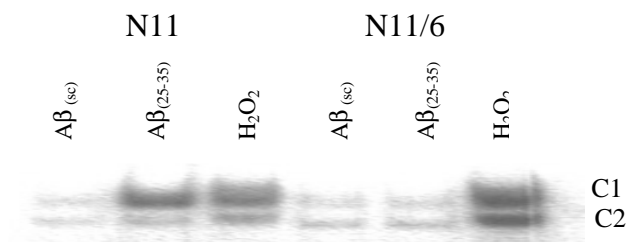
Die Toxizität wurde in Form der LDH-Freisetzung gemessen. Die Neurotoxizität wurde mit dem LDH Test bestimmt. In den N11 zeigt die AGE Behandlung eine 76%ige NF- $\kappa$ B Aktivierung im Vergleich zu der BSA-Behandlung (K). Im Gegensatz dazu ist die AGE-bedingte NF- $\kappa$ B Aktivierung in dem Subklon N11/6 kleiner als 6%. Das konditionierte Medium der Zelllinien N11 und N11/6 zeigt keine Neurotoxizität wenn diese mit exogenes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliert wurden.

### **III.5.2.4. Unterschiede der NF- $\kappa$ B Aktivierung in Mikroglia nach A $\beta$ <sub>(25-35)</sub> und nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung**

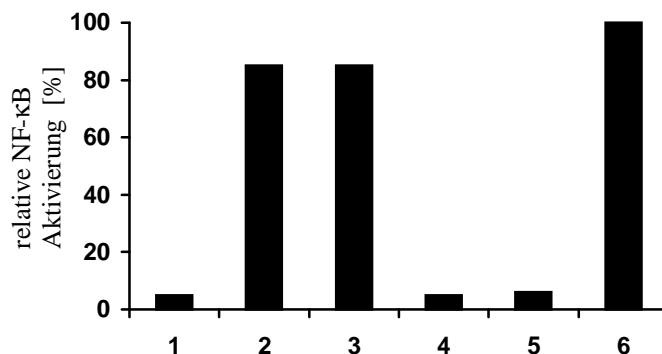
Da die Vermittlung der Neurotoxizität durch die NADPH Oxidase unabhängig von der NF- $\kappa$ B Aktivierung möglicherweise nur für AGE vermittelte Mikrogliaaktivierung zutreffend

ist, wurde die Aktivierung der Mikrogliazellen durch  $A\beta$  untersucht. Dazu wurde in einer Gelretentionsuntersuchung die NF- $\kappa$ B Aktivierung nach  $A\beta$  Behandlung in den Zelllinien N11 und N11/6 untersucht. Nach der Stimulation mit 10  $\mu$ M fibrillärem  $A\beta_{(25-35)}$  beziehungsweise 10  $\mu$ M  $A\beta_{(sc)}$  wurden die Kernproteine nach 6 Stunden extrahiert. Die N11-Mikroglia wurden durch das fibrilläre  $A\beta_{(25-35)}$  aktiviert, und zeigten eine 85%ige NF- $\kappa$ B Konzentrationserhöhung im Zellkern, während die zufällige Sequenz des  $A\beta_{(sc)}$  keine Auswirkungen hatte. Im Gegensatz dazu konnte in den N11/6 auch mit dem fibrillären  $A\beta_{(25-35)}$  keine NF- $\kappa$ B Aktivierung erzielt werden, die diejenige der Negativkontrolle überstieg. Im Vergleich dazu führte die exogene Stimulierung durch Wasserstoffperoxid sowohl in N11 als auch in N11/6 zu einer NF- $\kappa$ B Aktivierung die in ihrer Stärke vergleichbar zu derjenigen durch fibrilläres  $A\beta_{(25-35)}$  in N11 war (Abb. 34).

**A**



**B**



**Abb. 34A) NF- $\kappa$ B Aktivierung in Mikroglia durch  $A\beta_{(25-35)}$  bzw. durch  $H_2O_2$**

Für den EMSA wurden die Zellen mit 150  $\mu$ M  $H_2O_2$  oder mit 10  $\mu$ M  $A\beta_{(25-35)}$  aktiviert, nach 12 h wurde der Kernextrakt durchgeführt.

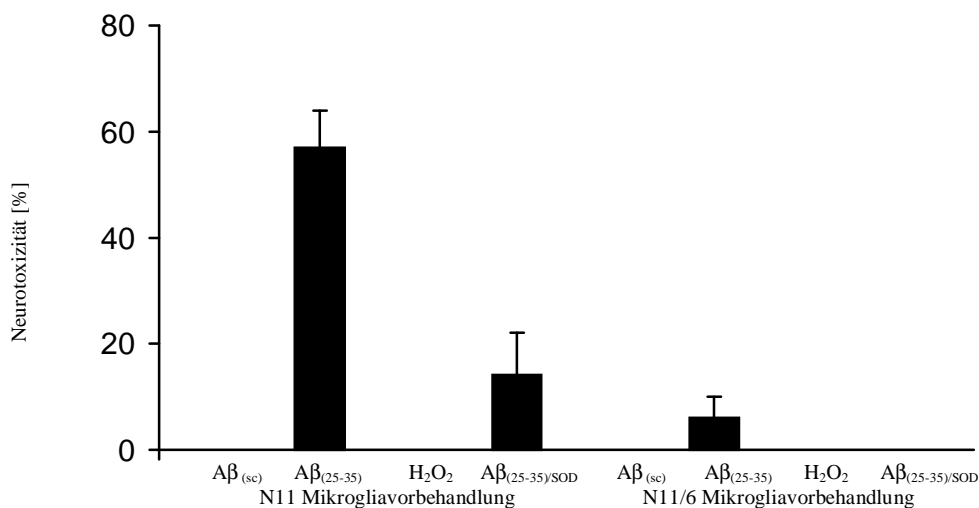
**B) Densitometrische Auswertung des C1 Komplexes des EMSA**

Der aktivierende NF- $\kappa$ B Komplex (NF- $\kappa$ B) wurde durch die Behandlung der Mikrogliazellen N11 und N11/6 mit  $H_2O_2$  zu 85% in den N11 (3) und zu 100% in den N11/6 aktiviert (6). Die Behandlung mit  $A\beta_{(25-35)}$  führte in den N11 zu einer 85%igen Aktivierung (2), in den N11/6 zu einer 6%igen NF- $\kappa$ B Aktivierung (5). Die Behandlung der beiden Zelllinien mit der Negativkontrolle  $A\beta_{(sc)}$  zeigt NF- $\kappa$ B Aktivierung von jeweils 5% (1 und 4).

### III.5.2.5. Die mikrogliavermittelte Neurotoxizität nach $A\beta_{(25-35)}$ Behandlung beruht auf der NADPH Oxidase Aktivierung

Die Aktivierung der NADPH Oxidase und von NF- $\kappa$ B in den Mikrogliazellen durch  $A\beta_{(25-35)}$  ist vergleichbar zu derjenigen durch AGE. Daher wurde geprüft, ob das  $A\beta_{(25-35)}$  mikroglia-konditionierte Medium dem AGE mikroglia-konditionierte Medium in der neurotoxischen Wirkung entspricht.

Besonders die Tatsache, daß die Neurotoxizität mit der NADPH Oxidase Aktivierung und nicht mit der NF- $\kappa$ B Aktivierung korreliert, sollte bestätigt werden. Die Neurotoxizität wurde durch den LDH Test ermittelt, der entsprechend der unter IV.4.3.3 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt wurde. Die Aktivierung der Mikroglia durch AGE wurde hier durch die Aktivierung mit  $A\beta_{(25-35)}$  ersetzt, die Kontrolle BSA durch die Kontrolle  $A\beta_{(sc)}$ . Die Mikroglia wurden mit 10  $\mu$ M  $A\beta_{(25-35)}$ , 10  $\mu$ M  $A\beta_{(sc)}$ , 10  $\mu$ M  $A\beta_{(25-35)}$ +300 U SOD ( $A\beta_{(25-35)/SOD}$ ) beziehungsweise 150  $\mu$ M  $H_2O_2$  aktiviert. Die N11 Zellen wurden durch fibrilläres  $A\beta_{(25-35)}$  zur Bildung eines neurotoxischen konditionierten Mediums veranlaßt, mit einer Neurotoxizität von zu 60%, während das konditionierte Medium der gleichermaßen behandelten N11/6 nur eine Toxizität von ca. 8% zeigten (Abb. 35).



**Abb. 35) NADPH Oxidase basierte Neurotoxizität des konditionierten Mediums**

Die Präinkubation der N11 mit  $A\beta_{(25-35)}$  erzeugt ein konditioniertes Medium, das bei 86% der Neuronen zum Zelltod führt, während derselbe Vorgang in N11/6 eine Toxizität von lediglich 10% zeigt. Durch die gleichzeitige Präinkubation von  $A\beta_{(25-35)}$  und SOD reduzieren sich diese Werte in beiden Zelllinien. Die Präinkubation mit  $H_2O_2$  resultiert in beiden Linien in einem konditionierten Medium, das nicht neurotoxisch ist.

Die Stimulation der N11 und der N11/6 durch die Präinkubation mit 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  führte in beiden Fällen nicht zu der Bildung eines neurotoxischen Mediums. Die gleichzeitige Präinkubation der Mikrogliazellen mit  $\text{A}\beta_{(25-35)}$  und 300 U SOD verringerte in beiden Zelllinien die Neurotoxizität des konditionierten Mediums. Das konditionierte Medium der N11 wurde auf eine verbleibende Toxizität von 23% vermindert, das der N11/6 verlor seine neurotoxische Wirkung vollständig (Abb.35).

# **IV Diskussion**

## **IV.1. Voraussetzungen für die Phagozytenaktivierung und deren Bedeutung für neurodegenerative Prozesse**

### **Vergleich der direkten Neurotoxizität mit der indirekten Neurotoxizität**

Die Bildung von Plaques wird als eine der ausschlaggebenden Ursachen in der AD-Entstehung diskutiert. Hierbei sammeln sich vor allem A $\beta$ , glykosilierte Proteine (AGEs) und Komponenten der extrazellulären Matrix in sogenannten senilen Plaques an. Diese Plaques stehen im Verdacht auf einem direkten und einem indirekten Weg zu Neuronenschädigung zu führen. Die indirekte Neurotoxizität setzt eine Aktivierung phagozytischer Zellen voraus, deren Reaktion zu den neurotoxischen Effekten führt (Giulian et al., 1999). Darüberhinaus tritt eine, durch A $\beta$  oder AGE vermittelte, direkte Neurotoxizität auf, die auf einer unmittelbaren, schädigenden Wechselwirkung der Plaquekomponenten mit den Neuronen beruht (Yan et al., 1996). Dabei ist ungeklärt, welchen Anteil die indirekte Neurotoxizität im Vergleich zu der direkten Neurotoxizität an den insgesamt auftretenden Schäden hat. Hierbei kommen verschiedene Komponenten der Alzheimer'schen Plaques als Auslöser der Neuronenschädigung in Frage. Besonders AGE- und A $\beta$ -Aggregate sind in der Lage Mikroglia zu aktivieren und zudem einen direkten Einfluß auf Neuronen auszuüben.

Die direkte Neurotoxizität ist dadurch gekennzeichnet, daß sie einen unmittelbaren Kontakt zwischen den neurotoxischen Substanzen und den Neuronen voraussetzt, der letztlich dazu führt, daß die betroffenen Neuronen absterben. In der Abwesenheit von Mikrogliazellen wurde gezeigt, daß in vitro eine direkte Neurotoxizität von A $\beta$  ausgeht (Huang et al., 1999). Um diese direkte Neurotoxizität auszulösen zu können, muß A $\beta$  zu Beta-Faltblattstrukturen aggregiert sein (Pappolla et al., 1998, Fonseca et al., 1999). Hierbei ist noch ungeklärt, ob die fibrilläre Struktur, oder Prozesse, die bei deren Entstehung ablaufen zu der Neurotoxizität beitragen. Hier konkurrieren zwei Hypothesen miteinander, die die Vermittlung der neurotoxischen Reaktionen beschreiben.

Die sogenannte Radikalhypothese legt nahe, daß die direkte Neuronenschädigung durch freie Radikale vermittelt wird. A $\beta$  zeigt eine solche Radikalbildung bei der

Entstehung der fibrillären Strukturen (Butterfield et al., 1999, Retz et al., 1998). Dieser Prozeß wird durch die Anwesenheit von Übergangsmetallen gefördert. Hierbei werden Übergangsmetallionen wie Eisen, Kupfer oder Aluminium durch A $\beta$  reduziert, was zur Bildung von Wasserstoffperoxid führt (Huang et al., 1999, Smith et al., 1998, Yang et al., 1999). Hier wäre die Bildung der fibrillären Strukturen Voraussetzung für die Neurotoxizität. Durch die kurze Lebensdauer der freien Radikale, ist eine unmittelbare Kolo-kalisation des fibrillären A $\beta$  und der Neuronen eine Voraussetzung für die neurotoxische Wirkung. Ebenso zu der Radikalthypothese können toxische Effekte zugeordnet werden, die von AGEs ausgehen. Auch hier werden während deren Bildung Radikale freigesetzt (Islam et al., 1995). Wie schon bei der A $\beta$ -Fibrillenbildung beschrieben, wird dieser Effekt durch die gleichzeitige Anwesenheit von Übergangsmetallen gesteigert (Carubelli et al., 1995). Eine weitere Bestätigung dieser Hypothese ist, daß Antioxidantien in der Behandlung von AD eingesetzt wurden, und eine Verbesserung des Gesundheitszustandes der Patienten bewirkten (Linert et al., 1999, Sramek et al., 1999).

Die zweite Hypothese setzt einen direkten Kontakt von AGE oder A $\beta$  zu einem Oberflächenrezeptor der Neuronen voraus. Durch die Aktivierung einer neuronalen Signalkaskade kommt es daraufhin zu einer neurotoxischen Reaktion. In frühen Stadien der AD gibt es bereits diffuse Plaques im Gehirn, die aus A $\beta$  bestehen, aber noch keine neurotoxischen Reaktionen hervorrufen (Thal et al., 1999). Diese Form ist anscheinend noch nicht ausreichend für neuronenschädigende Auswirkungen. Im Gegensatz dazu sind die filamentösen Plaques, in denen A $\beta$  als  $\beta$ -Faltblattstruktur vorliegt, nachweislich neurotoxisch (Schubert et al., 1998).

Ebenso gilt für AGEs, daß erst nach einer Modifikation eine neurotoxische Wirkung erzielt wird. Dazu muß das AGE im Rahmen einer mehrwöchigen Inkubationszeit "gealtert" worden sein. Hierbei stellt sich die Frage, warum AGE oder A $\beta$  erst in modifizierter Form vorliegen muß, um an den entsprechenden Rezeptor zu binden. Hierfür sind verschiedene Rezeptoren bekannt, es ist aber immer noch zweifelhaft, ob es eine direkte rezeptorvermittelte Neurotoxizität gibt.

Die indirekte Neurotoxizität ist eine zellulär vermittelte Reaktion im Gehirn, wobei diese Zellen nach ihrer Aktivierung eine Zerstörung der Neuronen bewirken. Die Zellen reagieren auf senile Plaques mit der Ausschüttung einer oder mehrerer neurotoxischer Substanzen (Akiyama et al., 1999). Die neurotoxische Wirkung könnte eventuell auch

durch einen unmittelbaren Kontakt der aktivierten Zellen mit den Neuronen übertragen werden. Hierzu gibt es keine Erkenntnisse, da nicht ausgeschlossen werden kann, daß eine lösliche neurotoxische Komponente zu den Neuronenschäden beiträgt, oder diese gänzlich ausmacht. Senile Plaques bestehen unter anderem aus Komponenten der extrazellulären Matrix, A $\beta$  und glykierten Proteinen (AGEs). Diese Bestandteile weisen Modifikationen auf, die sich erst im Verlauf jahrelanger Prozesse entwickeln. Hierzu zählt die zunehmende fibrilläre Struktur des A $\beta$ , die durch Glykierungen zusätzlich verändert wird (Loske et al., 2000). Aber auch andere Proteine werden glykiert und zu größeren Aggregaten quervernetzt (Dickson et al., 1996).

Bei den nachweislich beteiligten Zellen handelt es sich um Gliazellen, vor allem um Astroglia und Mikrogliazellen (Lemke et al., 1999, Stephenson et al., 1999). Diese werden durch fibrilläres A $\beta$  oder durch Glykierung modifizierte Proteine (AGEs) aktiviert (Takeda et al., 1998, Chung et al., 1999). Besonders die chronische Aktivierung der Mikroglia steht mit dem Tod der Neuronen in engem räumlichem Zusammenhang (Combs et al., 1999, Giulian et al., 1998), während Astrogliazellen vorwiegend die Funktion der Mikroglia modulieren (Licastro et al., 1998).

Die Radikalproduktion der AGEs und der A $\beta$ -Fibrillen hat möglicherweise einen Einfluß auf die Mikrogliaaktivierung. Es zeigt sich aber, daß im Gegensatz zu den üblicherweise auftretenden Formen A $\beta$ <sub>(1-40)</sub> und A $\beta$ <sub>(1-42)</sub> die verkürzte Form A $\beta$ <sub>(25-35)</sub> keine Radikale produziert (Huang et al., 1999). Dennoch aktiviert dieses A $\beta$ <sub>(25-35)</sub> die Mikrogliazellen in gleichem Maße wie A $\beta$ <sub>(1-40)</sub> oder A $\beta$ <sub>(1-42)</sub>. Der Vergleich der Neurotoxizität zeigt, daß A $\beta$ <sub>(25-35)</sub> eine vergleichbare Wirkung hat, wie A $\beta$ <sub>(1-40)</sub> oder A $\beta$ <sub>(1-42)</sub> (Meda et al., 1995). Hier zeigt sich in vitro, daß die Konzentration der von A $\beta$  freigesetzten Radikale keinen Unterschied bezüglich der Neurotoxizität ausmacht. Für die Neuronenschädigung ist vielmehr die Aktivierung der Mikroglia ausschlaggebend, die in gleichem Maße durch fibrilläres A $\beta$ <sub>(25-35)</sub>, A $\beta$ <sub>(1-40)</sub> oder A $\beta$ <sub>(1-42)</sub> erfolgt.

Außer fibrillärem Abeta und aggregiertem AGE gibt es noch diverse andere Auslöser, die Mikroglia aktivieren können. Die Aktivierung der Mikroglia erfolgt relativ unspezifisch als Reaktion auf fibrilläre Strukturen. Sehr bekannt ist das Prionprotein (PRP), welches zu ebenfalls zu einer fibrillären Struktur aggregiert. Diese Prionenaggregate wirken nicht direkt schädigend auf die Neuronen, sondern sind nur in Anwesenheit von Mikroglia

neurotoxisch (Brown et al., 1996). Auch andere neurodegenerative Erkrankungen, wie beispielsweise die Amyotrophe Lateralsklerose, die Parkinson'sche Erkrankung und weisen eine Aktivierung von Mikrogliazellen auf (Stephenson et al., 1999, McGeer et al., 1998).

In Zellkultur zeigte sich, daß Konzentrationen von AGEs oder fibrillärem A $\beta$  im  $\mu$ M-Bereich keine direkte Toxizität zur Folge hatte. Die direkte Neurotoxizität tritt "in vitro" erst bei höheren Konzentrationen in der Größenordnung von 100  $\mu$ M AGE oder 100  $\mu$ M A $\beta$  auf. Dieser Wert ist möglicherweise in der Nähe von Plaques erreichbar, die toxische Wirkung würde aber auf die unmittelbare Nachbarschaft zu einem Plaque begrenzt. Die Inkubation der Mikrogliazellen mit 2  $\mu$ M "gealtertem" AGE beziehungsweise 2-3  $\mu$ M fibrillärem A $\beta$  führt bereits zu einer indirekten neurotoxischen Reaktion. Die indirekte Neurotoxizität ist also etwa 50-fach sensibler als die direkte Neurotoxizität. Andererseits ist nur etwa jede 13. Zelle im Gehirn eine Mikrogliazelle, so daß nicht immer eine räumlich Nähe der Plaques und der Mikroglia vorliegt. Durch die taktische Bewegungen können die Mikroglia die senilen Plaques erreichen. Ein quantitativer Vergleich der direkten und der indirekten Neurotoxizität ist unter den beschriebenen Umständen nicht möglich.

#### Extrazelluläre Einflüsse auf die Mikrogliaaktivierbarkeit

Verschiedene Interaktionen zwischen Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) und A $\beta$  Peptiden und AGEs sind bereits bekannt. Diese Wechselwirkungen tragen zu der Bildung und dem Fortbestehen der senilen Plaques bei (Snow et al., 1994). Die extrazelluläre Matrix beeinflusst die Biogenese von APP in Mikroglia Zellen (Monning et al., 1995), und diese erhöhen die neuronale APP-Produktion indem sie IL-1 freisetzen (Yang et al., 1998). Außerdem zeigte sich, daß das von den Mikroglia ausgeschüttete A $\beta$  den Abbau von Glykosaminoglykanen (GAGs) verhindern kann (Bame et al., 1997). Daher sollte hier auf den Einfluß verschiedener GAGs auf die Mikrogliaaktivierbarkeit eingegangen werden.

Hierzu wurden die Mikrogliazellen in Anwesenheit unterschiedlicher GAGs vorinkubiert und anschließend durch AGE aktiviert. Die GAGs Hyaluronsäure (HA), D-Glukuronsäure, N-Acetylglukosamin und Chondroitin-4-sulfat wurden verwendet. Die HA zeigt in ihrem Molekulargewicht enorme Unterschiede, von wenigen Disacchariden bis zu 2 Millionen



Dalton großen Komplexen. Andere GAGs wie D-glukuronsäure, N-azetylglukosamin oder Chondroitinsulfat weisen keine derartige Unterschiede in ihrer Größe oder Struktur auf. Von den untersuchten GAGs hatte vor allem die HA einen Einfluß auf die Aktivierbarkeit der Mikroglia. Es zeigte sich ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen der Mikrogliaaktivierbarkeit und dem Molekulargewicht der HA. Bei durchschnittlicher Molekülgröße von 0,5 MDa war bereits eine gesteigerte Aktivierbarkeit der Mikroglia zu erkennen. Die Tatsache, daß niedermolekulare HA-Fragmente eine NF- $\kappa$ B Aktivierung in murine Makrophagen bewirken (Noble et al., 1996), bestätigt den hier gefundenen Zusammenhang.

Im Folgenden wurde der zugrundeliegende Mechanismus der Schutzwirkung hochmolekularer HA vor Mikrogliaaktivierung untersucht. HA lagert sich an den Rezeptor CD44 auf der Mikrogliaoberfläche an. CD44 ist eine Rezeptor, der den Zelladhäsion über den Kontakt der Zelloberfläche zu Bestandteilen der extrazellulären Matrix vermittelt (Lee et al., 1992). Die Bindung an CD44 führt zu einer Aktivierung einer CD44-abhängigen Signalkaskade, die möglicherweise Einfluß auf die Mikrogliaaktivierung nimmt. Durch den inhibierenden Antikörper anti-CD44 wird die Interaktion zwischen HA und CD44 verhindert. Dennoch wurde durch die Zugabe dieses Antikörpers die protektive Wirkung der HMW-HA nicht vermindert, so daß eine AGE Stimulation weiterhin zu einer NF- $\kappa$ B Aktivierung führte. Die aktivierenden NF- $\kappa$ B Komplexe schienen sich allerdings in ihrer Zusammensetzung in den Rel-Familienmitgliedern zu unterscheiden. Um nähere Aussagen hierzu treffen zu können müßte zunächst einmal aufgeklärt werden, um welche Rel Familienmitglieder es sich handelt, und welche Signalkaskaden davon betroffen sind. Es bleibt daher fraglich, ob die protektive Wirkung der HMW-HA auf der Aktivierung von CD44-abhängigen Signalkaskaden beruht.

LMW-HA kann NF- $\kappa$ B in den Mikroglia aktivieren, auf welchem Wege dies geschieht ist noch nicht geklärt. Daher wurde hier ebenfalls der Antikörper gegen CD44 eingesetzt. Ein genaktivierender Komplex, bestehend aus nicht identifizierten NF- $\kappa$ B Familienmitgliedern wurde nahezu vollständig reduziert, während der zweite NF- $\kappa$ B Komplex nur eine minimale Verringerung aufwies. Dies zeigt, daß die LMW-HA bedingte NF- $\kappa$ B Aktivierung in Mikroglia zum Teil durch CD44 vermittelt wird.

Möglicherweise handelt es sich bei der protektiven Wirkung der HMW-HA um eine sterische Hemmung. Dadurch, daß sich HMW-HA an die Zelloberfläche anlagert wird

diese mit einer extrem dichten negativen Ladungshülle umgeben. Dies verhindert die Interaktion von AGEs und von A $\beta$  mit der Zelloberfläche, da beide eine negative Gesamtladung tragen und somit abgestoßen werden (Nagai et al., 2000).

### **Radikalbildung führt zum Abbau der HA**

Die Eigenschaft sowohl von A $\beta$  als auch von AGE freie Radikale zu erzeugen unterscheidet diese deutlich von anderen demenzfördernden Aggregaten wie beispielsweise dem Prionprotein. Selbst geringfügige Mengen an Radikalen haben einen gravierenden Einfluß auf die Struktur der extrazellulären Matrix. Die HA wird durch die freien Radikale in kleinere Fragmente zerlegt (Degunie et al., 1998). Dieser Effekt bestätigte sich sowohl für fibrilläres A $\beta_{(25-35)}$  als auch für AGEs. Die von diesen freigesetzten Radikale waren in der Lage die HA-Fragmentgröße innerhalb von 24 Stunden auf ein Fünftel zu reduzieren. Die Radikale schneiden die HA unspezifisch, so daß die durchschnittliche HA-größe anfangs rapide abnimmt, wenn eine hochmolekulare HA gespalten wird. Aufgrund der statistischen Wahrscheinlichkeit, daß zunehmend auch kleinere Fragmente gespalten werden reduziert sich die Fragmentgröße insgesamt langsamer. Die Wirkung geht ausschließlich von den freigesetzten Radikalen aus, da durch die Zugabe von SOD die Verringerung der HA-größe vollständig unterbunden wurde.

Erst nachdem die HA-größe reduziert wurde und die durchschnittliche HA-Fragmentgröße kleiner als 0,5 MDa ist, erfolgt eine deutliche Mikrogliaaktivierung durch AGEs oder fibrilläres A $\beta_{(25-35)}$ . Die Aktivierung wird dabei durch die entstandenen niedermolekularen HA-Fragmente zusätzlich verstärkt. Die Mikrogliaaktivierung ihrerseits trägt zu der Radikalausschüttung durch den "oxidativen burst" bei. Die dabei entstehenden freien Radikale, wie beispielsweise Peroxinitrit, tragen ebenfalls zum Abbau der HA bei (Li et al., 1997). Durch diese positive Rückkopplung kommt es zu einer chronischen Mikrogliaaktivierung, mit einer daraus resultierenden schwerwiegenden und rasch fortschreitenden Schädigung der Neuronen.

Dieser Prozeß wird durch die A $\beta$ -Überproduktion beschleunigt. Aktivierte Mikroglia produzieren APP welches zu A $\beta$  umgewandelt wird (Banati et al., 1993). Die Funktionen von APP und A $\beta$  sind noch weitgehend ungeklärt. Möglicherweise handelt es sich bei APP um eine neurotrophische Substanz, die das Wachstum der Neuronen nach einer

Schädigung reguliert (Salinero et al., 2000). Durch diese übermäßige Produktion von APP scheint diese postulierte Reparaturwirkung nicht mehr gewährleistet zu sein.

Eventuell hat A $\beta$  eine Funktion in der Aufrechterhaltung einiger Bestandteile der extrazellulären Matrix. A $\beta$ 1-40 bindet an Heparansulfat und verhindert dessen Abbau (Bame et al., 1997). Aufgrund der Eigenschaft von A $\beta$  zur Selbstaggregation kommt es zu einer verstärkten Plaquebildung, so daß A $\beta$  möglicherweise nicht mehr ausreichend frei zur Verfügung steht.

Außerdem wurde eine antioxidative Wirkung des A $\beta$  beschreiben, die ihre optimale Wirkung bei einer Konzentration von 0,1-1 nM A $\beta$  entfaltet, die der Menge im physiologischen Normalzustand entspricht (Kontush et al., 2001). Durch Erhöhung der A $\beta$  Konzentration vermindert sich die antioxidative Wirkung wieder.

### **Altersabhängigkeit der neurotoxischen Schäden**

In transgenen Mäusen, die APP im Hirn überexprimieren treten trotz massiver A $\beta$  Ablagerung nur wenig AD-spezifische neuropathologische Veränderungen wie Gliose, Läsionen und hyperphosphorylierendes MAP-Tau auf., und vor allem kein Neuronenverlust in dem Ausmaß wie es beim Menschen zu beobachten ist (Holcomb et al., 1998, Geula et al., 1998). Dies kann zum einen daran liegen, daß die kognitiven Fähigkeiten der Mäuse schwer zu standardisieren und zu messen sind, zum andere daran, daß das Tiermodell nicht vollständig übertragbar ist.

Bei Rhesusaffen und Marmorset-Affen ist ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Alter und Anfälligkeit für Demenz beschrieben (Geula et al., 1998). Hier wurden verschiedene Affenarten die Plaqueinhalten in das Gehirn injiziert. Dabei wurde gezeigt, daß die Mikogliaaktivität und die Neurotoxizität in Marmorset-Affen (8-11 Jahre alt) wesentlich höher ist, als in jungen Marmorset-Affen. Bei alten Rhesusaffen (25-28 Jahre alt), die insgesamt eine höhere Lebenserwartung haben, ist die Mikogliaaktivität und die Neurotoxizität doppelt so hoch. Hierbei kann es sich um speziesspezifische Unterschiede handeln, die andere Ursachen haben, als das Alter. Dennoch scheinen besonders solche Tiere empfänglich für mikrogliabedingte Neuronenschädigungen zu sein, die ein hohes Alter erreicht haben.

Mit zunehmendem Alter eines Menschen steigt das Risiko an der AD zu erkranken (Muller-Spahn et al., 1999). Dennoch treten im menschlichen Organismus AD typische

Plaques zuweilen bereits bei jungen Erwachsenen in postmortem-Gewebe auf, wobei diese Menschen keine AD-Symptome zeigten, und die Neuronen keine Schädigungen aufwiesen (Braak). Insgesamt ist daher anzunehmen, daß A $\beta$  Ablagerungen nicht alleine ursächlich für die neurotoxische Wirkung sind. Offensichtlich ist das Erreichen eines Alters von mehreren Jahrzehnten eine wichtige Voraussetzung für neurotoxische Auswirkungen.

Die fibrillären Strukturen von A $\beta$  entstehend in vitro sehr rasch, innerhalb von Minuten, was vermutlich auch in vivo relativ schnell vonstatten geht, während die Bildung der AGEs in vitro bereits mehrere Wochen bei 50°C dauert. Entsprechend langsamer finden diese Prozesse unter physiologischen Bedingungen statt. Aufgrund der wesentlich kürzeren Lebenserwartung der Maus gegenüber der eines Menschen bleibt somit weniger Zeit zur Entstehung von glykierten Proteinen in großem Umfang.

Diese AGE-Bildung ist möglicherweise eine der Hauptursachen für eine kontinuierliche Radikalfreisetzung, deren Auswirkung sich erst nach Jahrzehnten bemerkbar macht, abgesehen von den genetisch bedingte AD-Erkrankungen, die aufgrund der Defekte von Sekretasen zu extrem hohen A $\beta$ -Konzentration führen, und somit bereits in jungen und mittleren Jahren zu einer Demenz führen können (Selkoe et al., 1997).

Durch eine Radikalfreisetzung kann die durchschnittliche HA-Molekülgröße eventuell über Jahre hinweg vermindert werden. Von der HA-Größe ist bekannt, daß sie über Jahrzehnte hin in der extrazellulären Matrix abnimmt (Holmes et al., 1988). Durch das Vorhandensein von hochmolekularer HA ist eine chronische Mikrogliaaktivierung nicht sehr wahrscheinlich, wie hier in Zellkultur gezeigt wurde, so daß es in der Folge nicht zu mikrogliavermittelten Neuronenschäden kommt. Allerdings gibt es noch keinerlei verlässliche Aussagen über die Veränderungen der HA-größe in Mäusen entsprechend deren Alter, oder Vergleiche zum Menschen bezüglich der nativen HA-Größe oder von antioxidativen Schutzmechanismen. Bisher ist unbekannt, ob die HA-Größe im Gehirn in vivo tatsächlich abnimmt, besonders da der HA-Metabolismus in Gehirn noch ungeklärt ist.

## IV.2. Signaltransduktion in aktivierten Mikrogliazellen

### **Merkmale der Mikrogliaaktivierung**

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde zunächst ein Indikator gesucht, der die Mikrogliaaktivierung aufzeigt, und in engem Zusammenhang zu der Signalkaskade steht, die letztendlich zu der neurotoxischen Wirkung führt.

#### Beteiligte Rezeptoren

Die Aktivierung der Mikroglia an sich ist eine sehr unspezifische Reaktion, die nicht nur durch AGE oder A $\beta$  ausgelöst werden kann, sondern von vielen weiteren Faktoren, wie beispielsweise LPS, Virenstrukturen, usw., was im Hinblick darauf verständlich ist, daß die Mikroglia Substanzen aufnehmen, beziehungsweise abbauen können müssen, die ihnen "fremd" sind. Dabei ist noch offen, ob es sich bei dieser Form der Aktivierung um dieselbe Form handelt, die durch die Plaques der AD ausgelöst wird. Rezeptoren wie RAGE reagieren gleichermaßen auf AGEs und A $\beta$  (Bierhaus et al., 1997, Li et al., 1997, Du Yan et al., 1997, Honda et al., 1998).

Aber auch der MSR an sich kann sehr unterschiedliche Substanzen binden, darunter auch AGE oder A $\beta$ . Mikroglia internalisieren fibrilläres A $\beta$  durch den "Macrophage Scavenger Receptor" (MSR) (1998, Paresce et al., 1996, El Khoury et al., 1996 u. 1998). Wenn der MSR deaktiviert wird so sinkt die Aktivierbarkeit der Mikroglia deutlich (Suzuki et al., 1997).

Besonders für AGE liegt eine hohe Redundanz der Rezeptoren vor, außer RAGE und MSR bindet AGE auch an galectin-3 und ost-48 (Thornalley et al., 1998). Das Fehlen eines einzelnen Rezeptors hat daher keine schwerwiegenden Folgen für die Mikrogliaaktivierbarkeit. Daher bot es sich an einen Merkmal zu suchen, das die Mikrogliaaktivierung für einen möglichst frühen Zeitpunkt repräsentiert. Aufgrund der sehr breitgefächerten Anzahl der Rezeptoren für die Mikrogliaaktivierung ist eine Verfolgung des Signalweges vom Rezeptor zu möglichen Effektoren wenig aussichtsreich. Daher wurde ein Merkmal gesucht, das die Mikrogliaaktivierung belegt und mit der Neurotoxizität korreliert.

Hier stellte sich NF- $\kappa$ B als besonders geeignet heraus, das aufgrund der AGE oder A $\beta$  Behandlung in den Mikrogliazellen aktiviert wird. Als Transkriptionsfaktor aktiviert NF- $\kappa$ B die Genexpression von Zytokinen und anderen potentiell neurotoxischen Substanzen. Hier wurden zunächst einmal die Signalkaskade untersucht, die zu NF- $\kappa$ B Aktivierung in den Mikrogliazellen führen. Dazu wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt, die ein möglichst breites Spektrum der potentiell beteiligten Signalkaskaden abdecken sollten. Durch eine Eingrenzung mit zunehmend spezifischeren Inhibitoren sollte sich ein einzelner Signalweg herauskristallisieren, von dem ausgehend Rückschluß auf die Beteiligung eines bestimmten Rezeptors möglich ist.

Außer der HMW-HA waren diverse weitere Inhibitoren erfolgreich darin die NF- $\kappa$ B Aktivierung zu unterbinden. Die Inhibition der MAP-Kinase p38, von ERK1 und ERK2 und der MAP-Kinase-Kinase (=MEK1) durch die Inhibitoren SB203580, PD98059 und GF109203X reduzieren die NF- $\kappa$ B Aktivierung um 70 bis 90 %. Eine allgemeine Inhibierung der Tyrosin-Kinasen durch den Inhibitor Genistein zeigte ebenfalls eine Reduktion der NF- $\kappa$ B Aktivierung um 70%. Dadurch daß die eingesetzten Inhibitoren trotz der unterschiedlichen Ansatzpunkte alle eine relativ deutliche Reduktion der NF- $\kappa$ B Aktivierung zeigten, war es nicht möglich eine bestimmte Signalkaskade herauszustellen, die zu der mikroglia bedingten Neurotoxizität führt. Aufgrund der Vielzahl von Signalwegen, war anzunehmen, daß nicht alle unmittelbar an der mikroglia bedingten Neurotoxizität beteiligt sind. Aus diesem Grunde wurde es notwendig, einen Zusammenhang zwischen der mikroglia bedingten Neurotoxizität und der Signaltransduktion in den Mikroglia herzustellen.

Daher wurde ein "in vitro Modell" entwickelt, um die Inhibierung der Signalkaskaden mit der daraus resultierenden Neurotoxizität zu verbinden. Aufgrund der Tatsache, daß es keine humane Mikrogliazelllinie gibt, wurde mit murinen Zellen experimentiert. Diese zeigen Unterschiede zu humanen Zellen, beispielsweise besitzen murine Mikroglia eine induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) während die Stickstoffmonoxidsynthase der humanen Mikroglia nicht veränderlich ist (Akama et al., 1998). Außerdem ist zu beachten, daß durch die Verwendung des "in vitro Modells" möglicherweise Effekte nicht beobachtet werden, die einen direkten Kontakt zwischen den Mikrogliazellen und den neuronalen Zellen benötigen. Hierbei kann es sich sowohl um neuroprotektive als auch um neurodegenerative Effekte handeln. Gerade die Zytokinexpression zeigt ein ambivalentes

Verhalten, das von Konzentrationen und Kombinationen der ausgeschütteten Zytokinen abhängig ist (Mattson et al., 1997).

In dem vorliegenden Modell wurden Mikroglia mit verschiedenen Inhibitoren vorbehandelt, durch AGE oder A $\beta$ -Aggregate aktiviert. Nachdem die Mikroglia gewaschen wurden wurde frisches Medium zugegeben. Das Medium und die darin sezernierten Substanzen ohne die Mikrogliazellen wurde als "konditioniertes Medium" weiterverwendet, um murine Neuronen darin zu kultivieren. Der Einfluß des konditionierten Mediums auf die Überlebensrate der Neuronen wurde mit Zelluntersuchungen bestimmt (MTT und LDH). Die aktivierten Mikrogliazellen wurden parallel dazu bezüglich der intrazellulären Signalweiterleitung untersucht. Durch den Vergleich der Neurotoxizität mit der Veränderung einzelner Signalwege konnte eine Aussage über deren Relevanz für die Überlebensrate der Neuronen gemacht werden. Grundsätzlich ist ein solches Modell nur bedingt auf die Vorgänge "in vivo" übertragbar. Der direkte Kontakt zwischen den Mikroglia und den Neuronen wird hier nicht berücksichtigt, ebenso ist die Auswirkung sehr kurzlebiger Substanzen in diesem Modell nicht enthalten, da der Transfer des konditionierten Mediums auf die Neuronen wesentlich langsamer erfolgt, als die Diffusionsprozesse über interzelluläre Distanzen benachbarter Zellen. Dennoch zeigte sich hier eine Situation, in der eine eindeutige Abhängigkeit der Neuronenüberlebensrate von der Mikrogliaaktivierung zu beobachten war.

Ein ganz wesentlicher Vorteil des verwendeten "in vitro Modells" ist die Tatsache, daß hier die Signalkaskaden in Zusammenhang zu der neurotoxischen Auswirkung der Mikrogliazellen untersucht werden kann. Aufgrund der Vielzahl der beteiligten Signalkaskaden und deren Genprodukten konnte angenommen werden, daß nicht alle zu einer neurotoxischen Wirkung beitragen würden.

Eine Auswirkung der Inhibitoren auf die Neuronen ist nicht anzunehmen, da das Medium nach der Inkubation gewechselt wird, und die Mikrogliazellen mehrfach in Puffer gewaschen werden, um darauf in frischem Medium für weitere 12 Stunden inkubiert zu werden. Erst nachdem die Mikroglia entfernt wurden wird dieses Medium für eine nachfolgende Inkubation mit den Neuronen eingesetzt.

Nach erfolgter AGE Stimulation der Mikrogliazellen schädigte das mikroglia-konditionierte Medium 79% der Neuronen. Die Inhibitoren der Xanthinoxidase, der Lipoxygenase und der Cyclooxygenase hatten keinen auffälligen protektiven Einfluß. N<sup>G</sup>-methyl-L-arginin

inhibiert die NO-Produktion und zeigte eine Reduktion der Toxizität auf 60 %, so daß ein geringer Einfluß der NO Radikale auf die mikrogliabedingte Neurotoxizität zu bestehen scheint. Die Hemmung der NADPH Oxidase mit DPI zeigte die beste Wirkung und reduzierte diese Zahl der geschädigten Neuronen auf 27%.

Die Vermittlung der Neurotoxizität benötigt keine Transkription oder Translation, da die Neurotoxizität auch dann auftrat, wenn entweder die Transkription oder die Translation gehemmt war. Die NADPH Oxidase ist im Ruhezustand in Einzelkomponenten im Zytoplasma und an der Zellmembran aufgeteilt, die nur noch aggregieren müssen, um einen funktionsfähigen Enzymkomplex zu bilden. Hierzu wird weder die Transkription noch die Translation benötigt, was die Rolle der NADPH Oxidase untermauert.

Mitochondriale Funktionen sind als Ursache der Toxizität unwahrscheinlich, da weder die Entkopplung der Atmungskette noch die vollständige Blockade derselben eine signifikante Veränderung der Neurotoxizität nach sich zogen.

Um die Signalkaskaden zu möglichst frühen Zeitpunkten zu untersuchen, wurden verschiedene Kinase-Inhibitoren eingesetzt. Die Inhibitoren Genistein und PDTC zeigten eine deutliche Reduktion der Toxizität auf knapp 40 %, GF109203X war noch effektiver mit einer Resttoxizität von etwa 30%. Da die NADPH Oxidase Superoxidanionen ausschüttet, die wiederum zu ROS umgewandelt werden können, welches NF- $\kappa$ B aktiviert (Vogt et al., 1998), besteht eine enge Verbindung zwischen der Aktivierung der NADPH Oxidase und der von NF- $\kappa$ B.

Den drei Inhibitoren ist gemeinsam, daß sie indirekt auf die NADPH Oxidase einwirken. GF109203X hemmt die PKC, wodurch die Phosphorylierung der NADPH Oxidase Untereinheit p47<sup>phox</sup> verhindert wird (Ishibashi et al., 1999). PDTC hemmt die NADPH Oxidase (Bhunja et al., 1997) und Genistein wirkt durch die Hemmung der Tyrosinkinase über Lyn und Syk auf die PKC, die wiederum auf die NADPH Oxidase wirkt (Combs et al., 1999). Die Aktivierung der NADPH Oxidase findet demnach vor der NF- $\kappa$ B Aktivierung statt.

Der Inhibitor PD98059 hemmt zwar die ERK1 und reduziert die NF- $\kappa$ B Aktivierung um 75% (Abb.14), die Neurotoxizität aber nur um wenige Prozent (Abb. 18). Dies würde bedeuten, daß NF- $\kappa$ B nicht zwingend an der mikrogliavermittelten Neurotoxizität beteiligt



ist. Aus diesem Grunde wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen von dem Indikator NF- $\kappa$ B zu dem Indikator NADPH Oxidase verlagert.

### **IV.3. Die Bedeutung der NADPH Oxidase für die mikroglia-vermittelte Neurotoxizität**

Die NADPH Oxidase ist ein membranassoziierter Enzymkomplex, der maßgeblich für den "oxidativen burst" ist, und der große Mengen Superoxid produziert, indem er den Transfer von Elektronen von NADPH zu Sauerstoff katalysiert (Bianca et al., 1999). Dieser Prozess ist ein wesentlicher Verteidigungsmechanismus gegen Mikroorganismen. Der "oxidative burst" erfolgt innerhalb eines kurzen Zeitraums von etwa 20 min (Lavigne et al., 2001). In den hier gewonnenen Daten zeigte sich, daß das gesuchte neurotoxische Agens bereits innerhalb der ersten 30 min nach dem Kontakt mit AGE von den Mikroglia sezerniert wurde, was sehr gut mit der Hypothese übereinstimmt, daß diese neurotoxische Komponente von der NADPH Oxidase im Rahmen des "oxidativen bursts" abgegeben wird.

Das von den aktivierten Mikroglia freigesetzte Superoxid kann zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) weiterreagieren (Geiszt et al., 2000). Aufgrund der geringen Halbwertszeiten dieser Radikale, die überwiegend im Bereich von wenigen Sekunden liegen, sind nur geringe Reichweiten innerhalb eines Gewebes zu erwarten. Daher wäre zu erwarten, daß sich die Schäden nur auf die nähere Umgebung von Plaques begrenzen. Wasserstoffperoxid, das ebenfalls gebildet wird, wäre in der Lage größere Distanzen zu überwinden, da es langlebiger ist.

Widersprüchlich dazu erscheinen hingegen die Messungen zu der Größe des toxischen Agens zu sein. In den durchgeführten Filtrationsexperimenten wurde festgestellt, daß das neurotoxische Agens größer als 50 kDa ist, und die gesamte Toxizität des konditionierten Mediums ausmacht, während im Durchfluß des Filtrats keine toxischen Stoffe vorkamen. Kleine Moleküle und freie Radikale scheinen daher als Ursache der Neuronenschädigung auszuschließen.

Denkbar wäre aber, daß die freien Radikale Proteine oder Lipide oxidieren, die somit eine neurotoxische Wirkung auch über größere interzelluläre Distanzen transportieren können.

Bemerkenswerterweise sind Mikroglia und Makrophagen in der Lage LDL (low density lipoprotein) zu oxidieren (Rosenblat et al., 1999, Aviram et al., 1998). Für diese makrophagen/mikroglia-vermittelte Oxidation von LDL ist die Aktivierung der NADPH Oxidase zwingend notwendig (Aviram et al., 1996). LDL ist kugelförmig, mit einem Durchmesser von 22 nm, einer Masse von  $3 \times 10^6$  Dalton und enthält einen Kern von etwa 1500 Cholesterinmolekülen, die zu langkettigen Fettsäuren verestert sind. Es wird von einem Lipidmonolayer umgeben, der etwa 800 Phospholipide und 500 nichtveresterten Cholesterinmoleküle enthält. Die LDL-Partikel werden von den Neuronen je nach Bedarf aufgenommen. Erst in der oxidierten Form (ox-ldl) sind diese toxisch für die Neuronen (Keller et al., 1999, Keller et al., 1999).

Übergangsmetalle sind eine wesentliche Voraussetzung für eine ox-ldl vermittelte Toxizität gegen Endothelzellen (Kuzuy et al., 1991). Mit Hilfe einer Dialyse gegen EDTA in einer Salzlösung können diese Übergangsmetalle komplexiert werden, und mit anschließender Dialyse gegen die Salzlösung ausgeschlossen werden.

Diese Vorgehensweise wurde mit dem konditionierten Medium von AGE präinkubierten Mikrogliazellen durchgeführt. Wie sich zeigte war daraufhin keine Toxizität in dem konditionierten Medium feststellbar, während nach eine Dialyse des konditionierten Mediums gegen die Salzlösung weiterhin eine toxische Wirkung vorhanden war. Diese entsprach derjenigen eines nicht dialysierten konditionierte Medium aus AGE inkubierten Mikrogliazellen.

Dies deutet darauf hin, daß die Oxidation von LDL einer der Reaktionswege ist, der zu der mikroglia bedingten Neurotoxizität führt. Diese Hypothese wird durch den Einfluß des Apolipoprotein E (ApoE) auf die AD gestützt. Dieses hat in seinen vier verschiedenen Varianten unterschiedlich starke antioxidative Auswirkung auf LDL. Möglicherweise begründet dies die deutliche Korrelation der antioxidativ schwächsten Variante ApoE4 mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit an der AD zu erkranken (Myers, 2000).

Durch die Verwendung von pharmakologischen Inhibitoren kann ein Einwirken auf andere Signalkaskaden nie ganz ausgeschlossen werden, so daß weiterhin Zweifel an dem direkten kausalen Zusammenhang zwischen der aktivierten NADPH Oxidase und der mikroglia bedingten Neurotoxizität bestehen. Aus diesem Grund sollte die NADPH Oxidase genetisch inaktiviert werden, um eine eindeutige Aussage machen zu können.

Dadurch, daß die Zelllinie N11 nur ein x-Chromosom aufweist, mußte nur ein Gen auf einem Chromosom in einer homologen Rekombination ersetzt werden. Nach erfolgter Selektion und Überprüfung der Integration in das Genom reagiert die Subzelllinie N11/6 auf die AGE oder A $\beta$ -Stimulation nicht mehr mit einem "oxidativen burst". Das konditionierte Medium dieser Subzelllinie zeigt zudem nahezu keine Neurotoxizität. Weiterhin ungeklärt bleibt, ob das ausgeschüttete Superoxid oder andere Effekte der aktivierten NADPH Oxidase für die neurotoxische Wirkung verantwortlich sind.

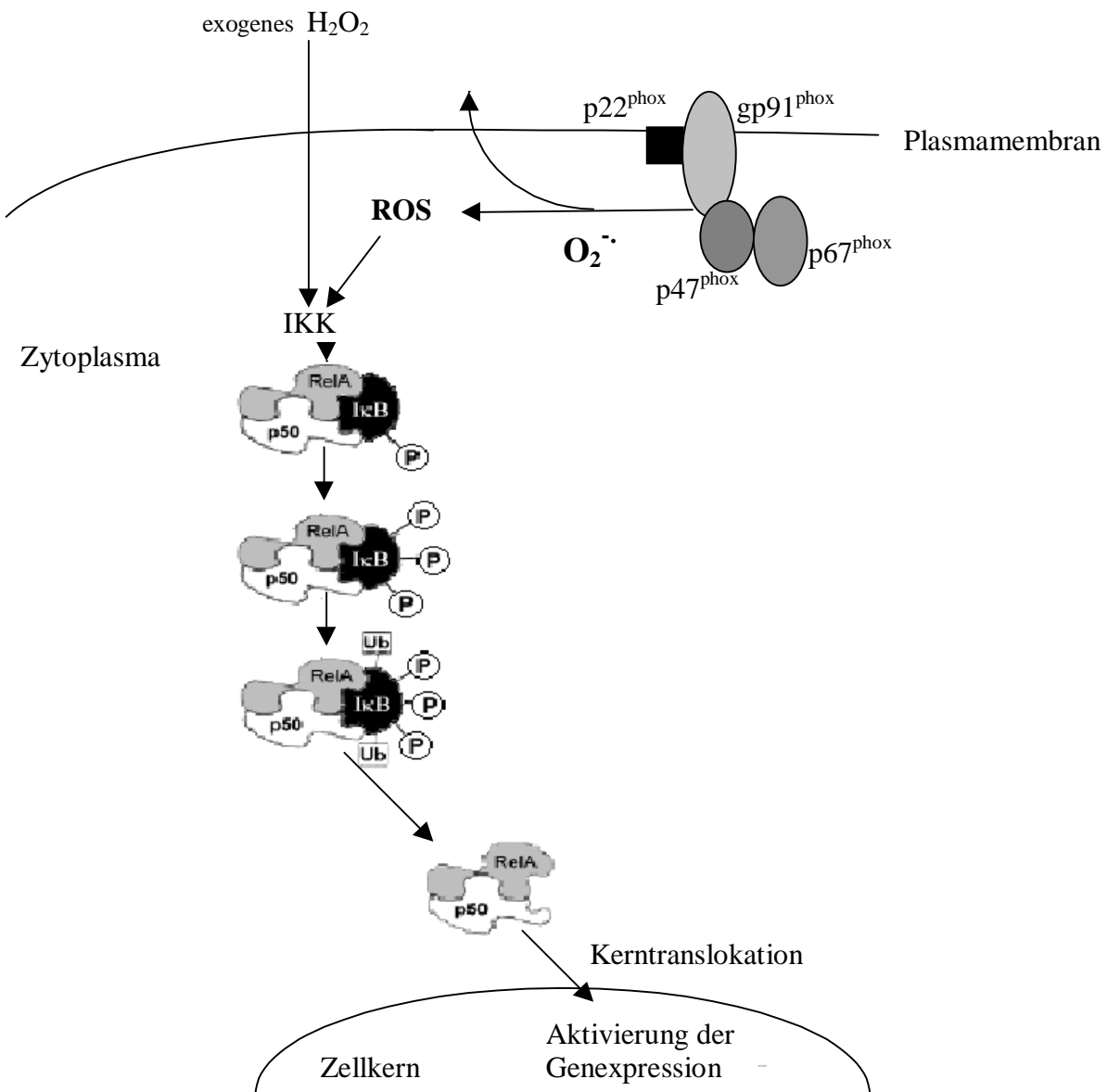


Abb. 36) Aktivierte NADPH Oxidase und NF-κB Signaltransduktion in aktivierten Mikroglia. Die aktivierte NADPH Oxidase der Mikrogliazellen an der Zellmembran oder in zellulären Vesikelmembranen setzt Superoxidanionen frei, die zu ROS umgewandelt werden können. Diese aktivieren NF-κB durch die I-κB Kinase (IKK), die den I-κB Abbau veranlaßt. Dies erklärt die Korrelation der aktiven NADPH Oxidase mit der NF-κB Aktivierung. NF-κB kann aber auch durch exogenes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über weitgehend unbekannte Signalwege aktiviert werden kann.

Aufgrund der Signalwirkung von Superoxid,  $H_2O_2$  oder reaktiven Sauerstoffspezies kann NF- $\kappa$ B aktiviert werden (Derevianko et al., 1998, Schreck et al., 1991, Vogt et al., 1998). Diese Aktivierung wird zum Teil durch die I- $\kappa$ B Kinase (IKK) bewirkt (Deng et al., 2001). Als Folge daraus bewirkt das aktivierte NF- $\kappa$ B die Genexpression von Zytokinen, aber auch von anderen potentiell neurotoxischer Produkten wie beispielsweise NO (Bianca et al., 1999).

Durch die exogene Zugabe von  $H_2O_2$  wird NF- $\kappa$ B in den NADPH Oxidase defizienten Zellen aktiviert, wobei die Signaltransduktionswege unbekannt sind. Trotz der NF- $\kappa$ B Aktivierung ist keine neurotoxische Wirkung des von diesen Zellen konditionierten Mediums feststellbar. Die Neurotoxizität ist unabhängig von der NF- $\kappa$ B Aktivierung und vermutlich ebenso von den durch NF- $\kappa$ B aktivierten Genprodukten, wie beispielsweise Zytokinen (Abb. 36). Im Gegensatz dazu besteht eine direkte Korrelation zwischen der NADPH Oxidase Aktivität und der neurotoxischen Wirkung des konditionierten Mediums.

Der Zusammenhang zwischen Mikrogliaaktivierung und AGE oder A $\beta$  ist nicht nur in der Zellkultur und im Tiermodell gegeben, auch für AD Patienten wurde gezeigt, daß AGEs und aktivierte Mikroglia in AD Gehirnen kolokalisiert sind (Takeda et al., 1998). Diese räumliche Nähe wurde ebenso für A $\beta$  belegt (Paris et al., 1999). Aktuelle Forschungsergebnisse im Rahmen einer Studie zeigen, daß die NADPH Oxidase auch in Mikrogliazellen im Gehirn von Alzheimer-Patienten aktiviert wird (Shimohama et al., 2000).

Wie sich gezeigt hat, sind gealterte AGEs und fibrilläres A $\beta$  gleichermaßen in der Lage Mikroglia zu aktivieren, wenn das extrazelluläre Umfeld geeignet ist. Daher ist es vermutlich nicht ausreichend, ausschließlich die A $\beta$ -Produktion zu unterbinden, wie dies momentan mit Hilfe der Sekretasehemmung oder der Entwicklung von Impfstoffen gegen A $\beta$  versucht wird. Durch glykierte Proteine, ohne Beteiligung der A $\beta$  Fibrillen, wäre eine Mikrogliaaktivierung weiterhin wahrscheinlich.

Die zugrundeliegenden Erkenntnis, daß die NADPH Oxidase maßgeblich an der mikrogliavermittelte Neurotoxizität beteiligt ist, gestattet die Entwicklung neuer Ansätze für mögliche Therapieformen. Die Mikrogliaaktivierung könnte durch die Blockierung eines Rezeptors verhindert werden, die Aktivierung der NADPH Oxidase gehemmt, oder geeignete Antioxidantien eingesetzt werden, um die Auswirkungen eines "oxidativen

bursts" zu mildern.

Durch eine Blockade bestimmter Rezeptoren wäre eine Aktivierung der NADPH Oxidase eventuell vermeidbar. Galectin-3 ist ein ein solcher Rezeptor, der durch AGE aktiviert wird, und unmittelbar zu einer Aktivierung der NADPH Oxidase führt (Karlsson et al., 1998). Auch hier gilt, daß A $\beta$  Fibrillen trotz dieser Rezeptorblockade weiterhin die NADPH Oxidase aktivieren könnten. Da auch unspezifische Rezeptoren wie der MSR-A die AGEs und fibrilläres A $\beta$  binden, sowie die NADPH Oxidase aktivieren können, führt eine Rezeptorblockade möglicherweise nur zu einer Abschwächung der mikroglia bedingten Neurotoxizität.

Effektvoller wäre eventuell die Hemmung der NADPH Oxidase. Dabei ist zu beachten, daß die NADPH Oxidase eine wichtige Funktion in der Abwehr gegen Mikroorganismen innehat, so daß ihre Funktionsunfähigkeit schwerwiegende Folgen haben kann. Patienten mit der Erbkrankheit "Chronische Granulomatöse Erkrankung" (CGD) haben eine vollständig defekte NADPH Oxidase, mit der Folge, daß scheinbar harmlose Infektionen lebensbedrohlich werden können. Daher wäre hier ein sehr dosiertes Eingreifen notwendig, das eventuell nur befristete Zeitphasen umfaßt. Dennoch könnte eine solche Hemmung der NADPH Oxidase das Voranschreiten der Neuronenschädigungen schnell und effektiv reduzieren, wenn nicht gar stoppen.

Daß Radikalschäden zu dem Verlauf der AD beitragen wurde bisher schon mehrfach beschrieben, so daß eine Therapieform gegen diese reaktiven Radikale naheliegend ist. Entsprechend wurden Antioxidantien bereits eingesetzt (Linert et al., 1999). Der tatsächliche Nutzen verschiedener Antioxidantien wie beispielsweise von "nonsteroidal anti-inflammatory drugs", (NSAIDs) ist noch umstritten (Sramek et al., 1999). Indem Näheres über den Entstehungsort und die hauptsächlich auftretenden Typen der Radikale bekannt wird, kann hier gezielter eingegriffen werden. Durch das Wissen, daß der "oxidative burst" die Hauptquelle der Radikalproduktion ist, können Antioxidantien eingesetzt werden, die besonders geeignet sind eine Schutzwirkung gegen Superoxid und daraus resultierende ROS im extrazellulären Bereich zu erzielen.

## V. Literaturverzeichnis

Akama, K. T., Albanese, C., Pestell, R. G., and Van Eldik, L. J. (1998). Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFkappaB-dependent mechanism. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* 95, 5795-800 issn: 0027-8424.

Akiyama, H., Mori, H., Saido, T., Kondo, H., Ikeda, K., and McGeer, P. L. (1999). Occurrence of the diffuse amyloid beta-protein (Abeta) deposits with numerous Abeta-containing glial cells in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Glia* 25, 324-31 issn: 0894-1491.

Aviram, M., Rosenblat, M., Etzioni, A., and Levy, R. (1996). Activation of NADPH oxidase required for macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Metabolism* 45, 1069-79 issn: 0026-0495.

Babior, B. M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464-76.

Baeuerle PA.(1998) IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control. *Cell*. 95, 729-31

Baldwin AS.(1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 14.;649-83.

Bame, K. J., Danda, J., Hassall, A., and Tumova, S. (1997). Abeta(1-40) prevents heparanase-catalyzed degradation of heparan sulfate glycosaminoglycans and proteoglycans in vitro. A role for heparan sulfate proteoglycan turnover in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 272, 17005-11.

Banati, R. B., Gehrman, J., Czech, C., Monning, U., Jones, L. L., Konig, G., Beyreuther, K., and Kreutzberg, G. W. (1993). Early and rapid de novo synthesis of Alzheimer beta A4-amyloid precursor protein (APP) in activated microglia. *Glia* 9, 199-210.

Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R., and Schubert, D. (1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77, 817-27.

Behl C.(1999) Vitamin E and other antioxidants in neuroprotection. *Int J Vitam Nutr Res*.69, 213-9.

Bhunja, A. K., Han, H., Snowden, A., and Chatterjee, S. (1997). Redox-regulated signaling by lactosylceramide in the proliferation of human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 272, 15642-9.

- Bianca, V. D., Dusi, S., Bianchini, E., Dal Pra, I., and Rossi, F. (1999). beta-amyloid activates the O-2 forming NADPH oxidase in microglia, monocytes, and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease. *J-Biol-Chem* 274, 15493-9 issn: 0021-9258.
- Bierhaus, A., Illmer, T., Kasper, M., Luther, T., Quehenberger, P., Tritschler, H., Wahl, P., Ziegler, R., Muller, M., and Nawroth, P. P. (1997). Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* 96, 2262-71.
- Bozner P, Grishko V, LeDoux SP, Wilson GL, Chyan YC, Pappolla MA. (1997) The amyloid beta protein induces oxidative damage of mitochondrial DNA. *J Neuropathol Exp Neurol.* 156,1356-62.
- Brown, D. R., Schmidt, B., and Kretzschmar, H. A. (1996). Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 380, 345-7.
- Brownlee M. (2000) Negative consequences of glycation. *Metabolism.* 49, 9-13.
- Butterfield, D. A., Yatin, S. M., Varadarajan, S., and Koppal, T. (1999). Amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress, neurotoxicity, and Alzheimer's disease. *Methods Enzymol* 309, 746-68.
- Carubelli R, Schneider JE, Pye QN, Floyd RA.(1995) Cytotoxic effects of autoxidative glycation.*Free Radic Biol Med.* 18, 265-9.
- Chung, H., Brazil, M. I., Soe, T. T., and Maxfield, F. R. (1999). Uptake, degradation, and release of fibrillar and soluble forms of Alzheimer's amyloid beta-peptide by microglial cells. *J-Biol-Chem* 274, 32301-8 issn: 0021-9258.
- Colaco, C., and Harrington, C. (1996). Inhibitors of the Maillard Reaction. *CNS Drugs* 6, 167-177.
- Combs, C. K., Johnson, D. E., Cannady, S. B., Lehman, T. M., and Landreth, G. E. (1999). Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of beta-amyloid and prion proteins. *J Neurosci* 19, 928-39.
- Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE.(2001) {beta}-Amyloid Stimulation of Microglia and Monocytes Results in TNF{alpha}-Dependent Expression of Inducible Nitric OxideSynthase and Neuronal Apoptosis. *J Neurosci.*21, 1179-1188.
- Dahlgren, C., Karlsson, A. Respiratory burst in human neutrophils (1999) *J.Immunol. Methods* 232, 3-14

- Deguine V, Menasche M, Ferrari P, Fraisse L, Pouliquen Y, Robert L. (1998) Free radical depolymerization of hyaluronan by Maillard reaction products: role in liquefaction of aging vitreous. *Int J Biol Macromol* 22, 17-22.
- Deng L, Lin-Lee YC, Claret FX, Kuo MT. (2001) 2-Acetylaminofluorene Up-regulates Rat *mdr1b* Expression through Generating Reactive Oxygen Species That Activate NF-kappa B Pathway. *J Biol Chem.* 276, 413-420.
- Derevianko, A., Graeber, T., R, D. A., and Simms, H. H. (1998). The role of neutrophil-derived oxidants as second messengers in interleukin 1beta-stimulated cells. *Shock* 10, 54-61 issn: 1073-2322.
- Dickson, D. W., Sinicropi, S., Yen, S. H., Ko, L. W., Mattiace, L. A., Bucala, R., and Vlassara, H. (1996). Glycation and microglial reaction in lesions of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 17, 733-43.
- Durany N, Munch G, Michel T, Riederer P. (1999) Investigations on oxidative stress and therapeutical implications in dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*;249,68-73.
- Du Yan, S., Zhu, H., Fu, J., Yan, S. F., Roher, A., Tourtellotte, W. W., Rajavashisth, T., Chen, X., Godman, G. C., Stern, D., and Schmidt, A. M. (1997). Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* 94, 5296-301 issn: 0027-8424.
- Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, Salbaum JM, Lemaire HG, Kang J, Muller-Hill B, Masters CL, Beyreuther K.(1998) Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J.* 7, 949-57.
- El Khoury, J., Hickman, S. E., Thomas, C. A., Cao, L., Silverstein, S. C., and Loike, J. D. (1996). Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils [see comments]. *Nature* 382, 716-9.
- El Khoury, J., Hickman, S. E., Thomas, C. A., Loike, J. D., and Silverstein, S. C. (1998). Microglia, scavenger receptors, and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol-Aging* 19, S81-4 issn: 0197-4580.
- Fonseca, M. I., Head, E., Velazquez, P., Cotman, C. W., and Tenner, A. J. (1999). The presence of isoaspartic acid in beta-amyloid plaques indicates plaque age. *Exp-Neurol* 157, 277-88 issn: 0014-4886.
- Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8010-4.



- Geula, C., Wu, C., Saroff, D., Lorenzo, A., Yuan, M., and Yankner, B. (1998). Aging renders the brain vulnerable to amyloid  $\beta$ -protein neurotoxicity. *Nature Medicine* 4, 827-831.
- Giulian, D. (1998). A strategy for identifying immunosuppressive therapies for Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12, 0893-0341.
- Giulian, D. (1999). Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease. *Am-J-Hum-Genet* 65, 13-8.
- Hartmann H, Eckert A, Muller WE. (1994) Apolipoprotein E and cholesterol affect neuronal calcium signalling: the possible relationship to beta-amyloid neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 200, 1185-92.
- Hartmann T, Bieger SC, Bruhl B, Tienari PJ, Ida N, Allsop D, Roberts GW, Masters CL, Dotti CG, Unsicker K, Beyreuther K. (1997) Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med.*, 1016-20.
- He CJ, Zheng F, Stitt A, Striker L, Hattori M, Vlassara H.(2000) Differential expression of renal AGE-receptor genes in NOD mice: possible role in nonobese diabetic renal disease *Kidney Int.* 2000 58, 1931-40.
- Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K.(1998) Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med.* 4, 97-100.
- Holmes, M. W., Bayliss, M. T., and Muir, H. (1988). Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size. *Biochem J* 250, 435-41.
- Honda, M., Akiyama, H., Yamada, Y., Kondo, H., Kawabe, Y., Takeya, M., Takahashi, K., Suzuki, H., Doi, T., Sakamoto, A., Ookawara, S., Mato, M., Gough, P. J., Greaves, D. R., Gordon, S., Kodama, T., and Matsushita, M. (1998). Immunohistochemical evidence for a macrophage scavenger receptor in Mato cells and reactive microglia of ischemia and Alzheimer's disease. *Biochem-Biophys-Res-Commun* 245, 734-40 issn: 0006-291x.
- Huang, X., Atwood, C. S., Hartshorn, M. A., Multhaup, G., Goldstein, L. E., Scarpa, R. C., Cuajungco, M. P., Gray, D. N., Lim, J., Moir, R. D., Tanzi, R. E., and Bush, A. I. (1999). The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* 38, 7609-16 issn: 0006-2960.
- Ishibashi, S. (1999). [Cooperation of membrane proteins and cytosolic proteins in metabolic regulation--involvement of binding of hexokinase to mitochondria in regulation of glucose metabolism and association and complex formation between membrane proteins

and cytosolic proteins in regulation of active oxygen production]. *Yakugaku-Zasshi* 119, 16-34 issn: 0031-6903.

Islam KN, Takahashi M, Higashiyama S, Myint T, Uozumi N.(1995) Fragmentation of ceruloplasmin following non-enzymatic glycation reaction. *J Biochem* 118, 1054-60.

Karlsson, A., Follin, P., Leffler, H., and Dahlgren, C. (1998). Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. *Blood* 91, 3430-8.

Kato S, Horiuchi S, Liu J, Cleveland DW, Shibata N, Nakashima K, Nagai R, Hirano A, Takikawa M, Kato M, Nakano I, Ohama E. (2000) Advanced glycation endproduct-modified superoxide dismutase-1 (SOD1)-positive inclusions are common to familial amyotrophic lateral sclerosis patients with SOD1 gene mutations and transgenic mice expressing human SOD1 with a G85R mutation *Acta Neuropathol (Berl)*. 100, 490-505.

Keller JN, Pang Z, Geddes JW, Begley JG, Germeyer A, Waeg G, Mattson MP.(1997) Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by abeta-peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J Neurochem* 69, 273-84.

Keller, J. N., Hanni, K. B., and Markesbery, W. R. (1999). Oxidized low-density lipoprotein induces neuronal death: implications for calcium, reactive oxygen species, and caspases. *J Neurochem* 72, 2601-9.

Keller, J. N., Hanni, K. B., Pedersen, W. A., Cashman, N. R., Mattson, M. P., Gabbita, S. P., Friebe, V., and Markesbery, W. R. (1999). Opposing actions of native and oxidized lipoprotein on motor neuron-like cells. *Exp Neurol* 157, 202-10.

Kontush, A., Berndt, C., Weber, W., Akopyan, V., Arlt, S., Schippling, S., Beisiegel, U. Amyloid- $\beta$  is an antioxidant for lipoproteins in cerebrospinal fluid and plasma (2001) *Free Radical Biology & Medicine* 30, 119-28.

Kuzuya, M., Naito, M., Funaki, C., Hayashi, T., Asai, K., and Kuzuya, F. (1991). Lipid peroxide and transition metals are required for the toxicity of oxidized low density lipoprotein to cultured endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1096, 155-61.

Lansbury PT.(1992) In pursuit of the molecular structure of amyloid plaque: new technology provides unexpected and critical information. *Biochemistry* 32, 6865-70.

Lavigne MC, Malech HL, Holland SM, Leto TL.(2001) Genetic requirement of p47phox for superoxide production by murine microglia. *FASEB J.* 15, 285-287.

Lee, T. H., Wisniewski, H. G., and Vilcek, J. (1992). A novel secretory tumor necrosis factor-inducible protein (TSG-6) is a member of the family of hyaluronate binding proteins, closely related to the adhesion receptor CD44. *J Cell Biol* 116, 545-57.

- Lee, H. G., and Cowman, M. K. (1994). An agarose gel electrophoretic method for analysis of hyaluronan molecular weight distribution. *Anal Biochem* 219, 278-87.
- Lemke, R., Hartlage Rubsamen, M., and Schliebs, R. (1999). Differential injury-dependent glial expression of interleukins-1 alpha, beta, and interleukin-6 in rat brain. *Glia* 27, 75-87 issn: 0894-1491.
- Lemke R, Rossner S, Schliebs R (1999) Leukemia inhibitory factor expression is not induced in activated microglia and reactive astrocytes in response to rat basal forebrain cholinergic lesion. *Neurosci Lett.* 267, 53-6.
- Lernbecher T, Muller U, Wirth T.(1993) Distinct NF-kappa B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation. *Nature* 365, 767-70.
- Li, J., and Schmidt, A. M. (1997). Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 272, 16498-506.
- Li, M., Rosenfeld, L., Vilar, R. E., and Cowman, M. K. (1997). Degradation of hyaluronan by peroxynitrite. *Arch-Biochem-Biophys* 341, 245-50 issn: 0003-9861.
- Licastro, F., Mallory, M., Hansen, L. A., and Masliah, E. (1998). Increased levels of alpha-1-antichymotrypsin in brains of patients with Alzheimer's disease correlate with activated astrocytes and are affected by APOE 4 genotype. *J-Neuroimmunol* 88, 105-10 issn: 0165-5728.
- Linert, W., Bridge, M. H., Huber, M., Bjugstad, K. B., Grossman, S., and Arendash, G. W. (1999). In vitro and in vivo studies investigating possible antioxidant actions of nicotine: relevance to Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Biochim-Biophys-Acta* 1454, 143-52 issn: 0006-3002.
- Lorenzo, A., and Yankner, B. A. (1994). Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12243-7.
- Loske C, Neumann A, Cunningham AM, Nichol K, Schinzel R, Riederer P, Munch G. (1998) Cytotoxicity of advanced glycation endproducts is mediated by oxidative stress. *J Neural Transm.* 105, 1005-15.
- Loske C, Gerdemann A, Schepl W, Wycislo M, Schinzel R, Palm D, Riederer P, Munch G.(2000) Transition metal-mediated glycooxidation accelerates cross-linking of beta-amyloid peptide. *Eur J Biochem.* 2000 267, 4171-8.
- Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques *J Neurol Sci* 158, 47-52.

Masters CL, 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.* 2757-63.

Mattson, M. P., Barger, S. W., Furukawa, K., Bruce, A. J., Wyss Coray, T., Mark, R. J., and Mucke, L. (1997). Cellular signaling roles of TGF beta, TNF alpha and beta APP in brain injury responses and Alzheimer's disease. *Brain-Res-Brain-Res-Rev* 23, 47-61 issn: 0165-0173.

Mayo, L. A., and Curnutte, J. T. (1990). Kinetic microplate assay for superoxide production by neutrophils and other phagocytic cells. *Methods Enzymol* 186, 567-75.

McDonald, D. R., Brunden, K. R., and Landreth, G. E. (1997). Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide production in microglia. *J-Neurosci* 17, 2284-94 issn: 0270-6474.

McGeer, E. G., and McGeer, P. L. (1999). Brain inflammation in Alzheimer disease and the therapeutic implications. *Curr-Pharm-Des* 5, 821-36 issn: 1381-6128.

McGeer, P. L., and McGeer, E. G. (1998). Glial cell reactions in neurodegenerative diseases: pathophysiology and therapeutic interventions. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12, 0893-0341.

Meda, L., Cassatella, M. A., Szendrei, G. I., Otvos, L., Jr., Baron, P., Villalba, M., Ferrari, D., and Rossi, F. (1995). Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 374, 647-50.

Monnier VM, Cerami A. (1981) Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science.* 211, 491-3.

Monning, U., Sandbrink, R., Weidemann, A., Banati, R. B., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1995). Extracellular matrix influences the biogenesis of amyloid precursor protein in microglial cells. *J Biol Chem* 270, 7104-10.

Montine TJ, Picklo MJ, Amarnath V, Whetsell WO, Graham DG.(1997) Neurotoxicity of endogenous cysteinylcatechols. *Exp Neurol.* 148, 26-33.

Muller-Spahn F, Hock C. (1999) Risk factors and differential diagnosis of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 249 Suppl 3:37-42

Munch, G., Mayer, S., Michaelis, J., Hipkiss, A. R., Riederer, P., Muller, R., Neumann, A., Schinzel, R., and Cunningham, A. M. (1997). Influence of advanced glycation end-products and AGE-inhibitors on nucleation-dependent polymerization of beta-amyloid peptide. *Biochim Biophys Acta* 1360, 17-29.

- Munch G, Thome J, Foley P, Schinzel R, Riederer P.(1997) Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev.* 23 134-43
- Munch, G., Schinzel, R., Loske, C., Wong, A., Durany, N., Li, J. J., Vlassara, H., Smith, M. A., Perry, G., and Riederer, P. (1998). Alzheimer's disease--synergistic effects of glucose deficit, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *J Neural Transm* 105, 439-61.
- Myers A, Holmans P, Marshall H, Kwon J, Meyer D, Ramic D, Shears S, Booth J, DeVrieze FW, Crook R, Hamshere M, Abraham R, Tunstall N, Rice F, Carty S, Lillystone S, Kehoe P, Rudrasingham V, Jones L, Lovestone S, Perez-Tur J, Williams J, Owen MJ, Hardy J, Goate AM.(2000) Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10 *Science.* 290, 2304-5.
- Nagai R, Matsumoto K, Ling X, Suzuki H, Araki T, Horiuchi S.(2000) Glycolaldehyde, a reactive intermediate for advanced glycation end products, plays an important role in the generation of an activeliganand for the macrophage scavenger receptor. *Diabetes.* 2000 49, 1714-23.
- Narindrasorasak S, Lowery D, Gonzalez-DeWhitt P, Poorman RA, Greenberg B, Kisilevsky (1991) R. High affinity interactions between the Alzheimer's beta-amyloid precursor proteins and the basement membrane form of heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem.* 1991 15, 12878-83.
- Narindrasorasak S, Altman RA, Gonzalez-DeWhitt P, Greenberg BD, Kisilevsky R (1995). An interaction between basement membrane and Alzheimer amyloid precursor proteins suggests a role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Lab Invest* 72, 272-82.
- Noble, P. W., McKee, C. M., Cowman, M., and Shin, H. S. (1996). Hyaluronan fragments activate an NF-kappa B/I-kappa B alpha autoregulatory loop in murine macrophages. *J Exp Med* 183, 2373-8.
- Pappolla M, Bozner P, Soto C, Shao H, Robakis NK, Zagorski M, Frangione B, Ghiso J.(1998) Inhibition of Alzheimer beta-fibrillogenesis by melatonin. *J Biol Chem.*273,7185-8.
- Paresce, D. M., Ghosh, R. N., and Maxfield, F. R. (1996). Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron* 17, 553-65.
- Paris, D., Town, T., Parker, T. A., Tan, J., Humphrey, J., Crawford, F., and Mullan, M. (1999). Inhibition of Alzheimer's beta-amyloid induced vasoactivity and proinflammatory

response in microglia by a cGMP-dependent mechanism. *Exp-Neurol* 157, 211-21 issn: 0014-4886.

Pike, C. J., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G., and Cotman, C. W. (1991). In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res* 563, 311-4.

Poirier, J., and Sevigny, P. (1998). Apolipoprotein E4, cholinergic integrity and the pharmacogenetics of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 53, 199-207.

Retz, W., Gsell, W., Munch, G., Rosler, M., and Riederer, P. (1998). Free radicals in Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 54, 221-36.

Rosenblat, M., Belinky, P., Vaya, J., Levy, R., Hayek, T., Coleman, R., Merchav, S., and Aviram, M. (1999). Macrophage enrichment with the isoflavan glabridin inhibits NADPH oxidase-induced cell-mediated oxidation of low density lipoprotein. A possible role for protein kinase C. *J-Biol-Chem* 274, 13790-9 issn: 0021-9258.

Salinero O, Moreno-Flores MT, Wandosell F.(2000) Increasing neurite outgrowth capacity of beta-amyloid precursor protein proteoglycan in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2000 60, 87-97.

Schreck, R., Rieber, P., and Baeuerle, P. A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO-J* 10, 2247-58 issn: 0261-4189.

Schubert, P., Ogata, T., Miyazaki, H., Marchini, C., Ferroni, S., and Rudolphi, K. (1998). Pathological immuno-reactions of glial cells in Alzheimer's disease and possible sites of interference. *J Neural Transm Suppl* 54, 167-74.

Selkoe, D. J. (1997). Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science* 275, 630-1.

Selkoe DJ.(1998) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 8, 447-53.

Shi X, Dong Z, Huang C, Ma W, Liu K, Ye J, Chen F, Leonard SS, Ding M, Castranova V, Vallyathan V.(1999) The role of hydroxyl radical as a messenger in the activation of nuclear transcription factor NF-kappaB. *Mol Cell Biochem.* 194,63-70.

Shimohama, S., Tanino, H., Kawakami, N., Okamura, N., Kodama, H., Yamaguchi, T., Hayakawa, T., Nunomura, A., Chiba, S., Perry, G., Smith, M., and Fujimoto, S. (2000). Activation of NADPH Oxidase in Alzheimer's Disease Brains. *BBRC* 273, 5-9.

- Simm A, Diez C. (1999) Density dependent expression of PDGF-A modulates the angiotensin II dependent proliferation of rat cardiac fibroblasts. *Basic Res Cardiol.* 94, 464-71.
- Simon, A. R., Rai, U., Fanburg, B. L., and Cochran, B. H. (1998). Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am-J-Physiol* 275, C1640-52 issn: 0002-9513.
- Smith, M. A., Harris, P. L., Sayre, L. M., and Perry, G. (1997). Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* 94, 9866-8 issn: 0027-8424.
- Smith, M. A., Harris, P. L., Sayre, L. M., and Perry, G. (1998). Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Brain Res* 787, 15-8.
- Snow AD, Sekiguchi R, Nochlin D, Fraser P, Kimata K, Mizutani A, Arai M, Schreier WA, Morgan DG.(1994) An important role of heparan sulfate proteoglycan (Perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar A beta-amyloid in rat brain *Neuron.*12, 219-34.
- Sramek, J. J., and Cutler, N. R. (1999). Recent developments in the drug treatment of Alzheimer's disease. *Drugs-Aging* 14, 359-73 issn: 1170-229x.
- Stephenson, D., Rash, K., Smalstig, B., Roberts, E., Johnstone, E., Sharp, J., Panetta, J., Little, S., Kramer, R., and Clemens, J. (1999). Cytosolic phospholipase A2 is induced in reactive glia following different forms of neurodegeneration. *Glia* 27, 110-28 issn: 0894-1491.
- Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T., Matsumoto, A., Azuma, S., Noda, T., Toyoda, Y., Itakura, H., Yazaki, Y., Kodama, T., and et al. (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386, 292-6.
- Takeda, A., Yasuda, T., Miyata, T., Goto, Y., Wakai, M., Watanabe, M., Yasuda, Y., Horie, K., Inagaki, T., Doyu, M., Maeda, K., and Sobue, G. (1998). Advanced glycation end products co-localized with astrocytes and microglial cells in Alzheimer's disease brain. *Acta-Neuropathol-Berl* 95, 555-8 issn: 0001-6322.
- Tessier F, Obrenovich M, Monnier VM.(2000) Structure and mechanism of formation of human lens fluorophore LM-1. Relationship to vesperlysine A and the advanced Maillard reaction in aging, diabetes, and cataractogenesis. *J Biol Chem.* 274, 20796-804.
- Thal, D. R., Arendt, T., Waldmann, G., Holzer, M., Zedlick, D., Rub, U., and Schober, R. (1998). Progression of neurofibrillary changes and PHF-tau in end-stage Alzheimer's

disease is different from plaque and cortical microglial pathology. *Neurobiol-Aging* 19, 517-25 issn: 0197-4580.

Thal DR, Hartig W, Schober R.(1999) Diffuse plaques in the molecular layer show intracellular A beta(8-17)-immunoreactive deposits in subpial astrocytes. *Clin Neuropathol* 18, 226-31.

Thomas, T., Thomas, G., McLendon, C., Sutton, T., and Mullan, M. (1996). beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage [see comments]. *Nature* 380, 168-1

Thornalley PJ. (1998) Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol* ;44, 1013-23.

Urban MB, Schreck R, Baeuerle PA. (1991) NF-kappa B contacts DNA by a heterodimer of the p50 and p65 subunit. *EMBO J.* 199110,1817-25.

Vogt M, Bauer MK, Ferrari D, Schulze-Osthoff K.(1998) Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95 (APO-1/Fas) ligand expression in microglial cells. *FEBS Lett.* 429, 67-72.

Watson DJ, Lander AD, Selkoe DJ. (1997) Heparin-binding properties of the amyloidogenic peptides Abeta and amylin. Dependence on aggregation state and inhibition by Congo J *Biol Chem.* 272, 31617-24.

Weih F, Lira SA, Bravo R.(1996) Overexpression of RelB in transgenic mice does not affect I kappa B alpha levels: differential regulation of RelA and RelB by the inhibitor protein. *Oncogene.*12, 445-9.

Yamaguchi H, Maat-Schieman ML, van Duinen SG, Prins FA, Neeskens P, Natte R, Roos RA. (2000) Amyloid beta protein (Abeta) starts to deposit as plasma membrane-bound form in diffuse plaques of brains from hereditary cerebral J *Neuropathol Exp Neurol.* 59, 723-32.

Yan, S. D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D., and Schmidt, A. M. (1996). RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease [see comments]. *Nature* 382, 685-91.

Yang Y, Quitschke WW, Brewer GJ.(1998) Upregulation of amyloid precursor protein gene promoter in rat primary hippocampal neurons by phorbol ester, IL-1 and retinoic acid, but not by reactive oxygen species. *Brain Res Mol Brain Res.*60, 40-9.

Yang, E. Y., Guo Ross, S. X., and Bondy, S. C. (1999). The stabilization of ferrous iron by a toxic beta-amyloid fragment and by an aluminum salt. *Brain-Res* 839, 221-6



## Abkürzungen

A.dest	destilliertes Wasser
A $\beta$	Beta-Amyloid
AGE	Advanced Glyc(osyl)ation Endproducts
APP	Amyloid Precursor Protein
BSA	Bovin Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
Cyt c	Cytochrom c
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	N,N,N',N',-Ethyldiamintetraacetat
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FKS	Fötales Kälberserum
HA	Hyaluronsäure (Hyaluronic Acid)
HMW	hochmolekulare (High Molecular Weight)
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LMW	niedermolekular (Low Molecular Weight)
min	Minuten
MTT	(3-(4,5-dimethyl (thiazol-2-yl)-3,5-duphenyl)tetrazolium
NBT	Nitroblau-tetrazoliumchlorid-Toulidinsalz
OD	Optische Dichte
RT	Raumtemperatur
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
sec	Sekunden
t	Zeit
V	Volt

## **Publikationen**

### **Orginalarbeiten**

Munch, G., Mayer, S., Michaelis, J., Hipkiss, A. R., Riederer, P., Muller, R., Neumann, A., Schinzel, R., and Cunningham, A. M.

Influence of advanced glycation end-products and AGE-inhibitors on nucleation-dependent polymerization of beta-amyloid peptide.

(1997) Biochim Biophys Acta 1360, 17-29.

Loske, C., Neumann, A., Cunningham, A.M., Nichol, K., Schinzel, R., Riederer, P., Münch, G.

Cytotoxicity of advanced glycation endproducts is mediated by oxidative stress

(1998) J Neural Transm.; 105(8-9): 1005-15.

Neumann, A., Schinzel, R., Palm, D., Riederer, P., and Munch, G.

High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproduct-induced NF-kappaB activation and cytokine expression.

(1999) FEBS Lett 453, 283-7.

Daoud, S., Schinzel, R., Neumann, A., Loske, C., Fracorollo, D., Diez, C., Simm, A.

Advanced Glycation Endproducts: Activators of cardiac remodelling

(2001) submitted,

Neumann, A., Münch G., Schinzel, R.

Beta-amyloid activation of microglial NADPH oxidase is crucial for microglia mediated neurotoxicity

(2001) submitted,

### **Tagungsbeiträge**

Münch, G., Loske, C., Neumann, A., Weßels, A., Schinzel, R., Riederer, P.

Transition metal catalysed glycooxidation accelerates  $\beta$ -amyloid deposition in Alzheimer's disease Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie 1997, Tübingen  
Biol Chem. 1997; 378 : S139

Neumann, A., Schinzel, R., Münch G.

High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproduct induced NF- $\kappa$ B activation in microglia. Fourth International Symposium on Neurobiology and Neuroendocrinology of Aging, Bregenz 1998

Neumann A., Loske, C.

Oxidativer Stress und Mikrogliaaktivierung in der Pathogenese der Alzheimer Demenz 8. Tagung, Deutsche Gesellschaft für Altersforschung 1998 Vortrag

Loske, C., Neumann, A., Schinzel, R., Riederer, P., Münch, G.

Advanced Glycation Endproducts increase  $\beta$ -amyloid toxicity and cause energy depletion in neurons 29<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Miami Beach, USA, 1999 Abstracts SFN, Vol 25, 1562

Loske, C., Neumann, A., Wong, R., Schinzel, S., Dukic-Stefanovic, S., Münch, G.

Effects of Advanced Glycation Endproducts in Alzheimers disease - energy depletion and inflammation  
30<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, USA, 2000  
Abstracts SFN

Münch, G., Loske, C., Wong, A., Neumann, A., Durany, N., Riederer, P.

AGEs as an important progression factor in Alzheimer's disease  
Barcelona 1999 VI European Congress of Neuropathology, Neuropathology & Applied Neurobiology Vol 25 Supplement

Neumann, A., Münch G., Schinzel, R.

Is NF- $\kappa$ B involved in microglia-mediated Neurodegeneration in Alzheimer's Disease?  
Symposium "Advanced Glycation End Products (AGEs)" 2000 Jena

# Lebenslauf

Name: Arne Walter Gero Neumann

Geburtsdatum: 05.01.1969

Geburtsort: Erlangen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

1975-1979 Grundschule, Wiesentheid

1979-1989 Gymnasium, Donauwörth

1989 Allgemeine Hochschulreife abgeschlossen

1989-1990 Grundwehrdienst in Donauwörth

1990-1996 Studium der Biologie an der Universität Erlangen-Nürnberg

1992 Vordiplomprüfung in Biologie

1995-1996 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik der Universität Erlangen-Nürnberg unter Anleitung von Prof. Dr. G. Fey zu dem Thema „Analyse partieller cDNA Klone für mRNA-Spezies mit differenzierungs-induzierten Konzentrationsänderungen in menschlichen Tumorzelllinien.

1996 Diplomhauptprüfung in Biologie

seit 1996 Dissertation (Biol) Würzburg

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den .....

## Danksagung

Der praktische Teil dieser Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie I unter der Betreuung von PD Dr. R. Schinzel und PD Dr. G. Münch angefertigt.

Herrn PD Dr. R. Schinzel danke ich für die interessante Themenstellung, für die Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit, sowie der ständigen Ansprechbarkeit und prompten Hilfe bei Fragen und Problemen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. J. Kreft für die Übernahme des Koreferates und die Betreuung der Arbeit innerhalb der biologischen Fakultät

Prof. Dr. D. Palm und PD. Dr. G. Münch danke ich für die Diskussionsbereitschaft und den wissenschaftlichen Rat, sowie dem gesamten Arbeitskreis Palm für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gemeinsamen Unternehmungen.

Ganz besonders danke ich meiner Frau Brigitte Neumann, meinen Eltern und allen anderen Familienmitgliedern für die Zeit, Geduld und das Verständnis, das mir mit solcher Selbstverständlichkeit entgegengebracht wurde.