Aus dem Zentrum für Innere Medizin des Universitätsklinikums Rostock
Stiftungsprofessur Naturheilkunde
(Frau Prof. Dr. K. Kraft)
und
der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Rostock
Labor für Neurodegenerative Erkrankungen
(Herr Prof. Dr. Dr. J. Pahnke, EFN)

Beeinflussung von β-Amyloid-Ablagerungen durch Extrakte von *Humulus lupulus, Hypericum perforatum* und *Valeriana officinalis* im Mausmodell der Alzheimer Demenz

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Andrea Volz
geboren am 03. September 1983
in Baden-Baden

Rostock, 19. März 2012

urn:nbn:de:gbv:28-diss2012-0101-6

Datum der Einreichung: 19. März 2012
Datum der Verteidigung: 19. September 2012

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. habil. Karin Kraft, Zentrum für Innere Medizin, Stiftungsprofessur Naturheilkunde, Universität Rostock

2. M.D., Ph.D. Jens Pahnke E.F.N., Neurodegeneration Research Lab (NRL), Universität Magdeburg

3. Prof. Dr. rer. nat. Manfred Gerlach, Labor für Klinische Neurobiologie und TDM, Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie, Universität Würzburg

Abkürzungsverzeichnis

℃	Grad Celsius
A	Fläche
AD	Alzheimer's disease
ADAM	a disintegrin and metalloprotease, α-Sekretase
AP-1	Aktivatorprotein 1
APH-1	anterior pharynx defective 1
ApoE4	Apolipoprotein E epsilon 4
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
Aβ	Amyloid beta
BACE	beta-site APP-cleaving enzyme
BCA	bicinchoninic acid
BMI	Body Mass Index
BP	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Ca^{2}	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
C/EBPβ	CCAAT/enhancer-binding protein beta
cCT	kraniale Computertomographie
COX-2	Cyclooxygenase-2
CREB	cAMP response element-binding protein
C-terminal	Carboxy-Terminus
Cu^{2+}	Kupfer
CYP	Cytochrome P450
d	dies, Tag
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
DEV	Dosis-Extrakt-Verhältnis
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EtOAc	Ethylacetat
EZR	Extrazellulärraum
FAD	familiäre AD
g	Gramm

GABA	gamma-aminobutyric acid
H1/H2	Hopfen 1/Hopfen 2
h	hora, Stunde
HDL	high-density lipoprotein
ICD	International Statistical Classification of Diseases & Related Health Problems
IHC	Immunhistochemie
IFN-γ	Interferon-gamma
IκB-α	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha
iNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase in Makrophagen/Mikrogliazellen
IZR	Intrazellularraum
Joha	Johanniskraut
kDa	kilo Dalton
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
M	Molar
mM	Millimolar
MAO	Monoaminooxidase
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MDR1	multi drug resistance
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm^2	Quadratmillimeter
MMSE	Mini-Mental State Examination
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NCT	Nicastrin
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
Nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSAID	non steroidal anti inflammatory drugs
N-terminal	Amino-Terminus
PBS	phosphat-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEN-2	presenilin-enhancer 2
PET	Positronenemissionstomographie

PFA	Paraformaldehyd
P-GP	P-Glykoprotein
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR-γ-Rez	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PS1	Präsenilin 1
PS2	Präsenilin 2
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PXR	Pregnane-X-Receptor
REM	rapid eye movement
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
Rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sAD	sporadische AD
SDS	sodium dodecylsulphate, Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwertes
SSRI	selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Th1	T-Helferzelle
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
v/v	Volumenanteil je Gesamtvolumen
WB	Western Blot
x	Mal
ZNS	zentrales Nervensystem
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
μm^2	Quadratmikrometer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
   1.1 Neurodegenerative Erkrankungen 1
   1.2 Demenzen 1
   1.3 Alzheimer Demenz 4
      1.3.1 Epidemiologie 6
      1.3.2 Ätiologie und Risikofaktoren 6
      1.3.3 Amyloid-Precursor-Protein 8
      1.3.4 Präsenilin 1 und 2 10
      1.3.5 Klinische Symptome 11
      1.3.6 Therapie 11
   1.4 Phytopharmaka bei AD 12
      1.4.1 Baldrian (Valeriana officinalis L.) 13
      1.4.2 Hopfen (Humulus lupulus L.) 15
      1.4.3 Johanniskraut (Hypericum perforatum L.) 16
   1.5 Mausmodell 18
2. Zielstellung 20
3. Material und Methoden 21
   3.1 Material 21
   3.2 Mausmodell 21
   3.3 Phyto-Extrakte 21
   3.4 Tierversuche, Applikationsdosis und Experimentdauer 22
   3.5 Tier- und Gewebe-Aufbereitung 23
   3.6 Genotypisierung der Mäuse mittels PCR 24
   3.7 Morphologische Analysen 24
      3.7.1 Immunhistochemie (IHC) 24
      3.7.2 Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung 25
   3.8 Gesamtproteinbestimmung 25
   3.9 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) 26
   3.10 Western Blot (WB) 27
      3.10.1 Protein-Extraktion zur Proteingewinnung 27
      3.10.2 Gelelektrophorese 27
      3.10.3 Western Blot und Proteinbestimmung 28
      3.10.4 Stripping 28
   3.11 Statistische Auswertung 28
4. Ergebnisse 30
   4.1 Genotypisierung der Mäuse mittels PCR 30

4.2 Phytotherapie über 35 bzw. 60 Tage (Kurzzeit-Experiment) 30
4.2.1 Bestimmung der Aβ42-Konzentration mittels ELISA 30
4.2.2 Analysen zur Plaque-Morphologie (IHC) 32
4.2.3 Bestimmung der Plaqueanzahl 34
4.2.4 Bestimmung der Plaquedichte 34
4.2.5 Bestimmung der Plaquegröße 35
4.2.6 Charakterisierung der Plaquegröße 36
4.2.7 Bestimmung der prozentualen Plaquebedeckung 38
4.2.8 Analysen der Mikroglia-Morphologie 38
4.2.9 Bestimmung der durch Mikroglia bedeckten Kortexfläche 40
4.2.10 Analysen der Sekretasen-Expression 41
4.2.11 Prozentuale Bestimmung der Expressionshöhe der Sekretasen 42
4.2.12 Morphologische- und Toxizitätsanalyse 44
4.3 Zusammenfassung 45
4.4 Phytotherapie mit Baldrian über ausgewählte Zeitpunkte zwischen 35 und 160 Tagen (Langzeit-Experiment) 46
4.4.1 Bestimmung der Aβ42-Konzentration mittels ELISA 46
4.4.2 Bestimmung der Plaqueanzahl 48
4.4.3 Bestimmung der Plaquedichte 49
4.4.4 Bestimmung der Plaquegröße 50
4.4.5 Charakterisierung der Plaquegröße 51
4.4.6 Bestimmung der prozentualen Plaquebedeckung 52
4.4.7 Bestimmung der durch Mikroglia bedeckten Kortexfläche 53
4.4.8 Prozentuale Bestimmung der Sekretasen mittels Western Blot 54
4.5 Morphologische- und Toxizitätsanalyse 56
4.6 Zusammenfassung 56
5. Diskussion 57
5.1 Erforschung von Morbus Alzheimer in Tiermodellen 57
5.2 Phytopharmaka für neue Ansätze in der Alzheimer-Therapie 57
5.2.1 Auswirkungen auf die Aβ42-Konzentration 58
5.2.2 Extrakteffekte auf Plaqueanzahl, -größe, -dichte und -bedeckung 61
5.2.3 Auswirkungen der Phytotherapie auf die zerebrale Immunantwort 62
5.2.4 Effekte der Phytotherapie auf die Sekretasen 66
5.2.5 Interpretation der erhobenen Ergebnisse 66
5.2.6 Verträglichkeit 69
5.2.7 Limitationen der Untersuchung 69
5.3 Aussicht und weitere Untersuchungen 71

6. Zusammenfassung 72
7. Thesen 74
8. Literaturverzeichnis 75
9. Anhang 85
9.1 Chemikalien 85
9.2 Geräte 86
9.3 Antikörper 86
9.4 Puffer 86
9.5 Kits 88
9.6 Primer 88
10. Eidesstattliche Erklärung 89
11. Danksagung 90

1. Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Diffuse atrophische Prozesse im zentralen Nervensytem (ZNS), die zu einem Zelluntergang führen, kennzeichnen das Krankheitsbild neurodegenerativer Erkrankungen. Abhängig von der Lokalisation des Untergangs zeigen sich klinisch und pathologisch unterschiedliche Hauptmerkmale [1]. Diese korrelieren mit der Progression der Atrophie und entstehen typischerweise schleichend. Charakteristisch sind intra- oder extrazelluläre Ablagerungen verschiedener Proteine (z. B. Aβ-Protein, Tau-Protein, α-Synuclein, Ubiquitin), welche altersunabhängig sporadisch oder genetisch bedingt auftreten.
Während Morbus Pick, Morbus Parkinson, Chorea Huntington und amyotrophe Lateralsklerose systemische Atrophien darstellen, finden bei Morbus Binswanger und der Alzheimer Krankheit diffuse, im Gehirn (aber auch an Gefäßen) lokalisierte Prozesse satt [2].

1.2 Demenzen

In Ländern der westlichen Welt sind Demenzen zu einem schwerwiegenden sozialen und gesundheitspolitischen Problem geworden. 2011 gab es ca. 33,9 Millionen Demenzkranke weltweit [3] wobei allein 1,2 Millionen Betroffene in Deutschland lebten. Die Prävalenz verdoppelt sich ab dem 60. Lebensjahr alle fünf Jahre von 1% bei den unter 60-Jährigen auf bis zu 35% bei den über 95-Jährigen. Im Jahr 2005 schätzte man die Inzidenz global auf 4,6 Millionen. Diese Zahl wird sich aufgrund des demographischen Wandels stark vervielfachen, so dass 2040 weltweit über 81,1 Millionen Menschen betroffen sein werden [4], [5].
Demenzen stellen eine soziale und finanzielle Belastung sowohl für Betroffene selbst, deren Angehörige und das zuständige Pflegepersonal als auch für die Gesamtheit des deutschen Gesundheitswesens dar. Der Aufwand der gesetzlichen Kranken- und Pflegeversicherung pro Patient wurde im Jahre 2002 auf rund 13000 € beziffert [6]. Dabei sind indirekte Kosten, die unter anderem die unentgeltliche Pflege und Betreuung durch die Angehörigen umfassen, nicht eingerechnet. Diese indirekten Kosten betrugen nach Hallauer im Jahr 2005 insgesamt 43750 € pro Patient [7]. Damit ist die AD bereits heute eine der teuersten Krankheiten, deren Kosten in Zukunft weiter steigen werden [8]. Die Dringlichkeit des Erforschens der Ursachen und Risiken und die Entwicklung neuer Therapieansätze spiegelt sich in den weltweit existierenden AD-Forschungseinrichtungen wider [9].

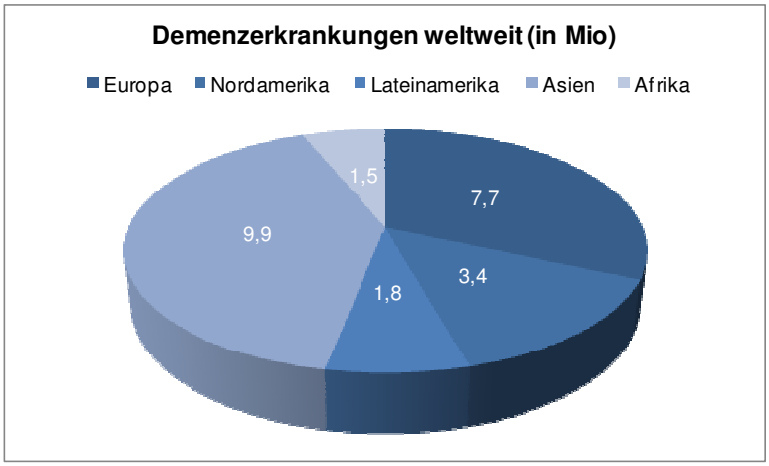

Abb. 1: Anzahl an Demenzerkrankten im Alter über 60 Jahre im Jahre 2001 (modifiziert aus [4]).

Betroffene erwerben im Laufe ihres Lebens kognitive Störungen, die zu Beeinträchtigungen im alltäglichen-, wie beruflichen Leben und somit insgesamt zu einer Verschlechterung des früheren Leistungsniveaus führen [10]. Eine selbständige Lebensführung ist im fortgeschrittenen Stadium nicht mehr möglich. Nach dem ICD-10 müssen zur Stellung der Diagnose „Demenz“ die Symptome „Beeinträchtigung höherer kortikaler Funktionen inklusive Gedächtnisstörung, Abbau des Denkvermögens, und Veränderung der Persönlichkeit“ über eine Dauer von mindestens sechs Monaten vorhanden sein und einen chronisch-progressiven Verlauf zeigen, der zu einer deutlichen Beeinträchtigung des alltäglichen Lebens führt [11].

Neben einem höheren Lebensalter sind genetische Dispositionen ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung einer Demenz. Arterielle Hypertension [12], hoher Body Mass Index (BMI) [13], Diabetes mellitus [14], [15], kardiovaskuläre Erkrankungen [16], übermäßiger Alkoholkonsum in Verbindung mit Apolipoprotein Eε4-Polymorphismus [17], Rauchen und psychosoziale Faktoren wie niedriges Ausbildungsniveau, sportliche Aktivitäten und Freizeitgestaltung sowie das soziale Netzwerk [18], [19] sind veränderbare, individuelle Risikoparameter, die als zusätzliche Ursachen diskutiert werden [20].

Dementielle Erkrankungen lassen sich in primäre Formen mit zerebraler Ursache und sekundäre Demenzen, die erst im Verlauf einer anderen Grundkrankheit auftreten, einteilen.

Sekundäre Demenzen sind selten (ca. 10%) und werden durch Tumore, Prionen- oder Viruserkrankungen wie die Creutzfeld-Jakob-Krankheit und HIV, Medikamente, Gifte und Traumata ausgelöst (**Abb. 2**).

Primäre Demenzen machen einen Anteil von rund 90% aus. Sie werden untergliedert in degenerative Demenzen, bei denen es zum Untergang von Neuronen kommt, und vaskuläre Demenzen, die aufgrund von Gefäßveränderungen und folgender zerebraler Minderperfusion auftreten. Zudem gibt es Mischformen aus degenerativer und vaskulärer Demenz [21]. Degenerative Formen werden anhand ihrer Lokalisation in kortikale und

subkortikale Störungen unterteilt. Während der subkortikale Demenztyp Störungen im Sozialverhalten, der Persönlichkeit sowie der gedanklichen Flexibilität beim Konzentrieren oder Planen betrifft, ist die kortikale Demenz durch Störungen beim Lernen und Denken gekennzeichnet. Auch Sprache und räumliche Orientierung sind betroffen [22], [23].
Abbildung 2 zeigt eine vereinfachte Übersicht zur Unterteilung der verschiedenen Demenzformen: Die Alzheimer Demenz (AD) gehört zu den neurodegenerativen Formen und macht mit rund 66% den größten Anteil aus.

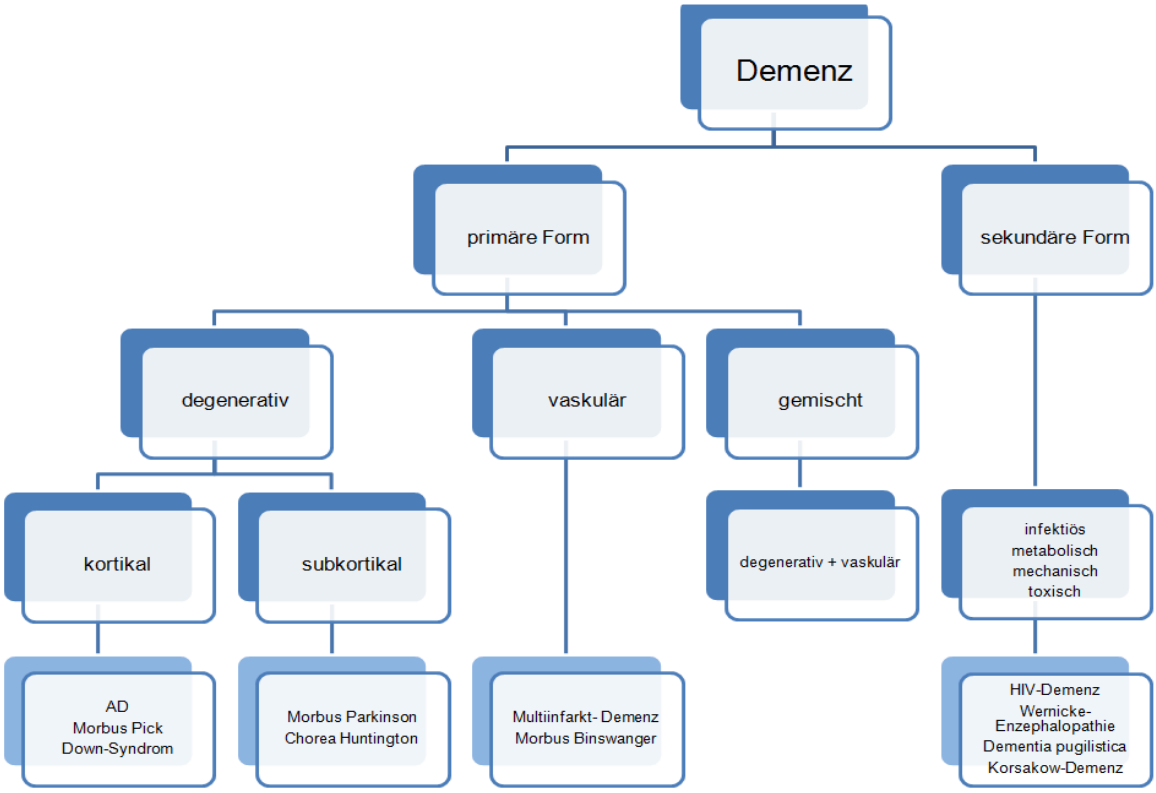

Abb. 2: Einteilung der Demenzformen (modifiziert aus [21] und [23])

Die Diagnostik einer Demenz erweist sich als schwierig. Meist kann die Diagnose erst spät gestellt werden, da es lange dauert, bis die ersten manifesten Symptome auftreten und richtig gedeutet werden. Zur Abgrenzung verschiedener Differentialdiagnosen ist die Anamnese, besonders auch die der Familienangehörigen wichtig. Mittels Bildgebender Verfahren wie kraniale Computertomographie (cCT), Magnetresonanztomographie (MRT) (**Abb. 3**) und Positronenemissionstomographie (PET) sind andere Gehirnerkrankungen auszuschließen. So kann zum Beispiel die Reduktion des hippocampalen Volumens, welche bei der AD für den Gedächtnisverlust ursächlich ist, beurteilt werden. Desweiteren wird mittels Mini-Mental State Examination (MMSE) und dem Uhren-Test der Verdacht einer Demenz bestätigt und die Progredienz überwacht [2].

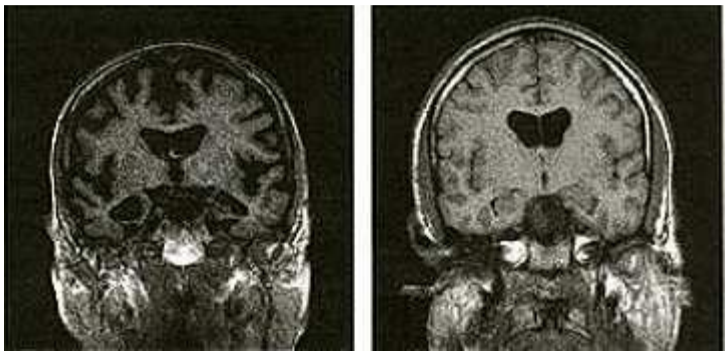

Abb. 3: Frontalschnittbild des Kortex im MRT. Vergleich eines an AD erkrankten Gehirns (links) mit einem gesunden Gehirn (rechts) [24].

Da die Inzidenz der Demenz in den kommenden Jahren weiter ansteigen wird, ist die Erkrankung seit einigen Jahren ein medizinischer Forschungsschwerpunkt. Um ihre verschiedenen Ursachen so früh wie möglich diagnostizieren zu können, besteht großes Interesse an der Pathophysiologie. Ziele für die Zukunft sind das Aufhalten der Krankheitsprogression bzw. sogar die Heilung [25].

1.3 Alzheimer Demenz

"Wie heißen Sie?" - "Auguste."
"Familienname?" - "Auguste."
"Wie heißt Ihr Mann?" - "Ich glaube, Auguste."

Dieser Dialog zwischen dem jungen Neurologen und Psychiater Alois Alzheimer (1864-1915) und seiner Patientin Auguste Deter im Jahre 1901 ist heute noch weltbekannt. Er ereignete sich in der Frankfurter Nervenklinik, in welche sie wegen ihrer Symptome - zunehmende Gedächtnisschwäche, Orientierungslosigkeit und Eifersuchts- und andere Wahnideen - eingeliefert wurde. So begann die Ära der AD, die heute Millionen Menschen weltweit betrifft [26].
Nach dem Tod von Auguste Deter am 8. April 1906, untersuchte Alzheimer ihr Gehirn und fand „eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“, die er bei der „XXXVII. Versammlung südwestdeutscher Irrenärzte“ in Tübingen präsentierte. Zum histologischen Befund schrieb er: „man finde über die ganze Rinde zerstreut, besonders zahlreich in den oberen Schichten […] miliare Herdchen, welche durch Einlagerung eines eigenartigen Stoffes in die Hirnrinde bedingt sind.“ Neben diesen so genannten extrazellulären Plaques entdeckte er auch intrazelluläre neurofibrilläre Bündel [27], [28].

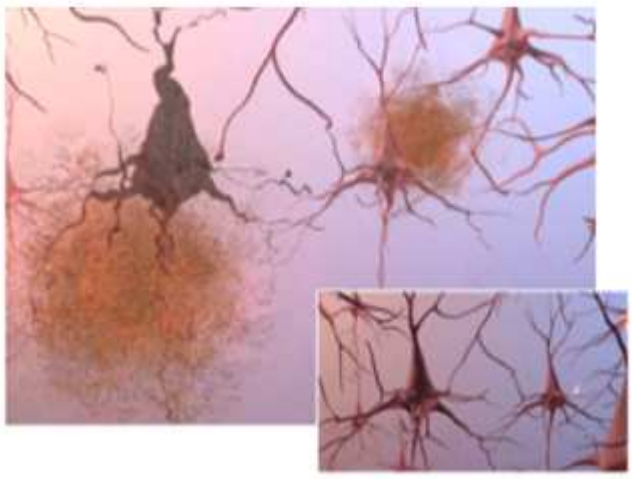

Abb. 4: Links mikroskopischer (Plaques und Zellen) und unten makroskopischer (Atrophie) Unterschied zwischen erkranktem und gesundem Gehirn [29], [30].

Diese beiden charakteristischen, neuropathologisch abgrenzbaren Merkmale der AD bilden auch heute noch die Grundlage der endgültigen post-mortem Diagnose der Krankheit. Sie sind hauptsächlich im Neocortex, im Hippocampus und in der Amygdala lokalisiert [31], [32].
Die sich intrazellulär ansammelnden neurofibrillären Bündel oder „Tangles“ entstehen durch Aggregation von paarigen helikalen Filamenten und beinhalten eine hyperphosphorylierte Form des ubiquitär exprimierten Tau-Proteins [9], [33].
Die physiologische Funktion des Tau-Proteins ist die Stabilisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts. Durch Phosphorylierung des Tau-Proteins wird die Affinität zwischen dem Tau-Protein und den Mikrotubuli reguliert [34]. Bei der AD und anderen Tauopathien (frontotemporale Demenz, Morbus Pick) löst sich das Tau-Protein durch verstärkte Phosphorylierung vom Mikrotubulus wodurch dieser einen Stabilitätsverlust erfährt. Die Tau-Proteine sammeln sich und aggregieren in neurofibrillären Bündeln [33], [35].
Amyloide Plaques kommen nur extrazellulär vor und bilden den zweiten pathologischen Befund der AD [32]. Neben neuritischen Plaques gibt es auch diffuse Plaques, welche sich mikroskopisch abgrenzen lassen. Diffuse Plaques sind ein Frühzeichen [36] der Amyloid-Ablagerung, zeigen jedoch keine Veränderungen der Neuriten und kommen auch in Gehirnen gesunder, alter Menschen vor [37]. In neuritischen Plaques hingegen sind die Neuriten dystroph aufgetrieben, um einen Amyloidkern angelegt [38] und von aktivierten Mikrogliazellen und reaktiven Astrozyten umgeben. Das Auftreten neuritischer Plaques soll mit dem Auftreten und dem Schweregrad einer Demenz korrelieren [36]. Allerdings beschreibt Anderton BH 1997, dass auch in gesunden Gehirnen neuritische Plaques detektiert werden können [37]. Das alleinige Vorkommen von Plaques beweist demnach nicht das Vorliegen einer Demenz; allerdings wird kontrovers diskutiert, ob sich diffuse Plaques in neuritische umwandeln können und als deren Vorläufer zählen [38], [39].

1.3.1 Epidemiologie

Die AD hat mit ca. 66% den größten Anteil an den Demenzerkrankungen [40]. Betroffen sind vor allem Menschen im Alter über 65 Jahre. Im Laufe der nächsten Jahre und Jahrzehnte wird sich die Anzahl der Alzheimerkranken vervielfachen, da das Lebensalter der Menschen durch die moderne Medizin weiter steigt [41]. Obwohl das Erkrankungsrisiko für Männer und Frauen gleich ist, erkranken aufgrund der höheren Lebenserwartung mehr Frauen (ca. 70%) als Männer [42], [43].

1.3.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Grundsätzlich gliedert man die AD bezüglich ihres Krankheitsbeginns in zwei Formen: eine early-onset Erkrankung, bei der das Erkrankungsalter unter 65 Jahren liegt und eine late-onset Form (über 65 Jahre). Weiterhin unterscheidet man die sporadische (sAD), welche über 90% der Fälle ausmacht, und die familiäre (FAD) Form. SAD und FAD sind klinisch und neuropathologisch identisch, sie unterscheiden sich lediglich durch das Erkrankungsalter und der Dauer der Erkrankung [40].

Während die Genese der sAD zumeist multifaktoriell ist, sind FAD-Fälle autosomal-dominant vererbt und führen bei Kindern der Genträger zu einem 50%igen Übertragungsrisiko. In den betroffenen Familien häuft sich die Erkrankung, die durch einen Krankheitsbeginn zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr, gelegentlich noch früher gekennzeichnet ist [44], [45].

Derzeit sind drei Gene bekannt, welche beim Betroffenen obligat zu einer FAD führen, Präsenilin 1 (PS1), Präsenilin 2 (PS2) sowie das Amyloid-Precursor-Protein (APP). Ein viertes Gen auf Chromosom 19, welches für das Apolipoprotein Eε4 (ApoE4) kodiert, wird als Risikofaktor für eine late-onset AD gewertet [46].

Eine autosomal-dominante Mutation des PS1 (ca. 50%), welches sich auf Chromosom 14 befindet, ist mit einer sehr frühen und aggressiven [47] Form der FAD assoziiert. Die Mutationen, von denen bis heute ca. 182 bekannt sind [48], führen zu einem Austausch von Aminosäuren und verändern so die Struktur des Genproduktes, eines Membranproteins. Das PS2 auf Chromosom 1 weist Homologien zum PS1 auf, bei dem drei Missense-Mutationen bekannt sind [47], die jedoch insgesamt viel seltener vorkommen. PS2 bildet einen Teil des γ-Sekretase-Komplexes und ist für die Entstehung des löslichen Aβ-Proteins zuständig.

Eine Punktmutation nahe der γ-Sekretase-Schnittstelle des APPs auf Chromosom 21 ist eine der zehn [49] bekannten Mutationen dieses Proteins und mit einem vermehrten Vorkommen des Aβ42 verbunden. Je nach Mutation kann auch die Aβ40-Konzentration ansteigen (der γ-Sekretase-Schnitt auf dem APP ist variabel, siehe S.14). Auch Down-Syndrom-Patienten, die durch eine Trisomie des Chromosom 21 charakterisiert sind, zeigen bereits in jungen Jahren ein dem klinischen und pathologischen Befund der AD stark ähnlichen Verlauf [50]. Sie

weisen bereits ab der 21. Schwangerschaftswoche eine Überexpression des APP auf. Ob dies jedoch stets zu einer Erhöhung des Aβ42 und dies wiederum zur typischen Plaquebildung führt, wird kontrovers diskutiert [51] und bedarf weiterer Erforschungen.
Die Präsenz des ApoE4-Gens im Genom ist ein weiterer Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer AD. Betroffen sind vor allem Menschen, deren ApoE4-Gen auf Chromosom 19q13.2 homozygot vorliegt [52]. Dieses Protein ist für den Transport des Cholesterins verantwortlich. Es existiert in drei Isoformen, die sich nur durch die beiden Aminosäuren auf Position 112 und 158 unterscheiden. Bei dem zu 15-20% vorkommenden ApoE4 ist auf beiden Positionen ein Arginin lokalisiert. Das Arginin auf Position 112 führt zu großer Instabilität des Proteins [52]. ApoE ist bei Patienten mit einer late-onset Form überrepräsentiert, spielt eine große Rolle im Aβ-Protein-Metabolismus und wird als Suszeptibilitätsgen bezeichnet [53].

Tabelle 1: Genetische Faktoren prädisponierend für AD (modifiziert aus [32]).

AD	Chromosom	Gen	Lebensalter bei Beginn	Phänotyp	Anteil in %
early-onset FAD, autosomal-dominant	21	APP	≥ 50	↑ aller Aβ-Peptid-Produktionen	< 1
Suszeptibilitätsgen late-onset AD	19	ApoE4	≥ 60	↑ Aβ-Plaque-Dichte und Gefäßablagerung	15-20
early-onset FAD, autosomal-dominant	14	PS1	40-50	↑ Aβ42-Peptid-Produktion	> 50
early-onset FAD, autosomal-dominant	1	PS2	≥ 50	↑ Aβ42-Peptid-Produktion	< 1

Auch Geschlecht, ethnische Zugehörigkeit, Bildungsstand, Schädel-Hirn-Traumen, neurologische- und kardiovaskuläre Erkrankungen (z. B. Hypertension), Apoplex und Stoffwechsel-Erkrankungen (z. B. Diabetes mellitus), hoher BMI sowie Alkoholkonsum sind Risikofaktoren, die die Entwicklung einer AD begünstigen [54], [55].
Harwood DG et al. zeigt an einer aktuellen Studie, dass Menschen mit einer Präsenz von ApoE4 und einer Alkoholanamnese (mehr als zwei alkoholische Getränke pro Tag) oder einer Raucheranamnese (über 20 Zigaretten pro Tag) im Mittel zwei bis drei Jahre eher an

einer AD erkranken als Personen ohne diese Risikofaktoren. Menschen mit allen drei Risikofaktoren erkranken sogar zehn Jahre vor der nicht vorbelasteten Population [17].

1.3.3 Amyloid-Precursor-Protein

Die in post-mortem untersuchten Gehirnpräparaten von AD-Patienten häufig vorkommenden senilen Plaques bestehen aus aggregiertem Amyloid, einem proteolytischen Spaltprodukt des APP, dem amyloiden Vorläuferprotein. APP ist ein Transmembranprotein mit einer großen N-terminalen Ektodomäne, einer Transmembrandomäne, sowie einem kleinen intrazellulären Anteil, dessen Gene auf Chromosom 21 lokalisiert sind. Es besteht aus 19 Exons. Exon 7, 8 und 15 können durch alternatives Spleißen der mRNA mehrere Isoformen mit unterschiedlicher Aminosäurenanzahl bilden. Die kürzeste Isoform des APP besteht aus 695 Aminosäuren (AS) und ist hauptsächlich in Neuronen lokalisiert, während das längere APP (770 AS) weniger und die 751-AS-lange Form je nach Region unterschiedlich stark vorkommen [56]. Die Funktion des APP ist bisher noch ungeklärt [57]. Bekannt ist, dass es für Zell-Zell-Interaktionen verantwortlich ist [57], [58]. Im Gehirn bindet es an extrazelluläre Membranproteine und interagiert mit dem Nerve Growth Faktor [59].

Durch unterschiedliche Sekretaseschnitte können zwei Prozessierungswege unterschieden werden: der nicht-sekretorische Weg, den die α-Sekretase katalysiert (**Abb. 5**), und der sekretorische Weg, der durch die β- und die γ-Sekretase vollzogen wird (**Abb. 6**).

Die α-Sekretase ist eine Metallo-Protease und gehört zur ADAM- (a disintegrin and metalloprotease) Familie, die in der Zellmembran verankert ist. Sie schneidet das APP neben ihrem transmembranalen Bereich in der Mitte der Aβ-Region an Position 16-17, so dass ein längeres extrazelluläres Bruchstück (sAPPα) entsteht, das wasserlöslich ist und in den Extrazellulärraum sezerniert wird, während ein ca. 10 kDa großes C-terminales Spaltprodukt in der Membran verbleibt [60].

Schneidet hingegen die Aspartat-Proteinase [62], [63], die auch β-Sekretase oder β-site APP-cleaving enzyme (BACE) genannt, am N-Terminus, so entsteht ein längerer transmembranaler Rest, der den Aβ-Bereich noch komplett beinhaltet. Die γ-Sekretase, ein Komplex aus PS1 oder PS2, Nicastrin (NCT), anterior pharynx defective (APH-1) und presenilin-enhancer 2 (PEN-2), schneidet nun am C-terminalen Ende und führt zur Bildung eines Aβ. Der γ-Sekretase-Schnitt ist variabel, so dass der entstehende Teil - das lösliche, unterschiedlich lange und 4 kDa [64] schwere intrazelluläre Aβ-Protein - 38, 40 bzw. 42 Aminosäuren enthalten kann. Dieser Schnitt hat einen entscheidenden Einfluss auf die Pathogenese der AD, da das Aβ42 eine stärkere Neigung zu Aggregationen hat als das weniger hydrophobe Aβ40 [65].

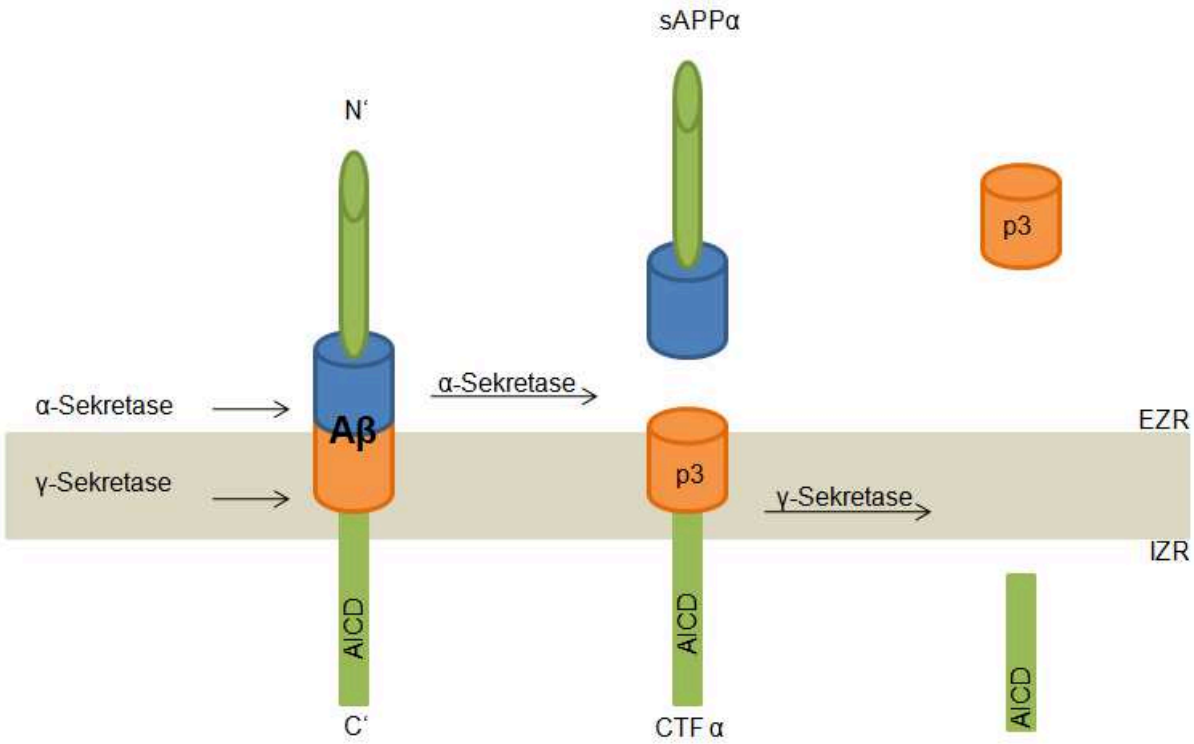

Abb. 5: Prozessierung von APP. Dargestellt ist der nicht-sekretorische Weg, bei dem durch einen physiologischen und proteolytischen Schnitt in der Aβ-Region die Entstehung des Aβ-Proteins verhindert wird (modifiziert aus [60], [61])

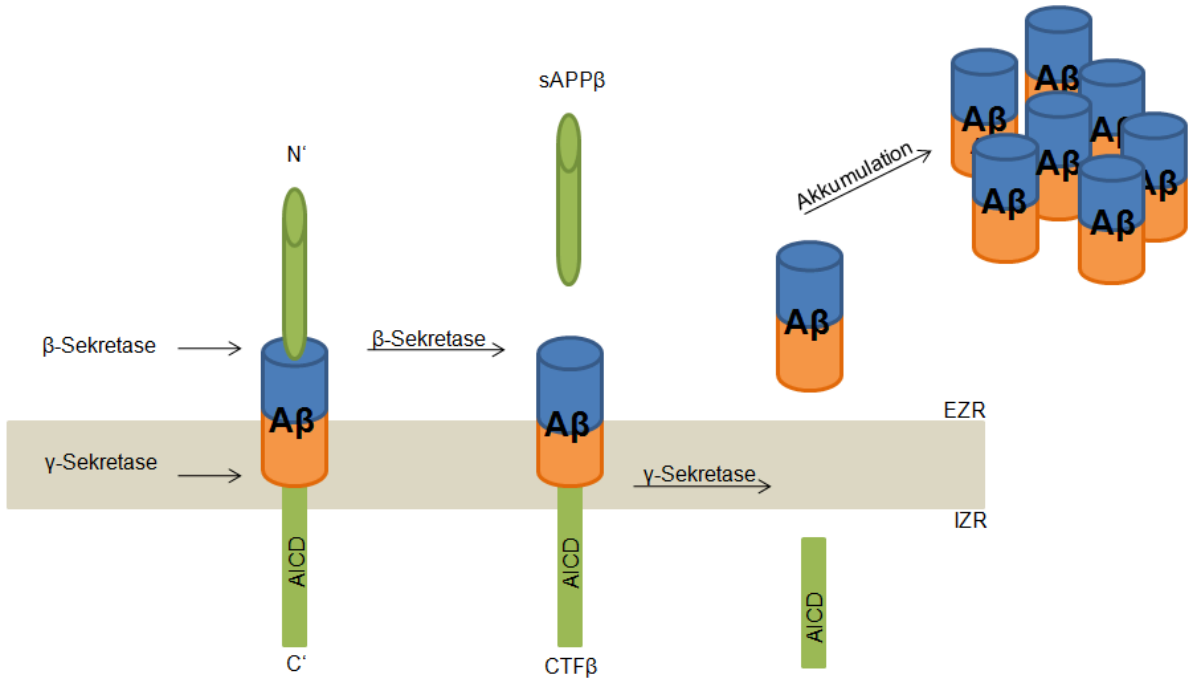

Abb. 6: Prozessierung von APP. Dargestellt ist der neurotoxische, amyloidogene Sekretaseweg, der durch den Schnitt der β-Sekretase am N-terminalen Ende des Aβ-Bereichs zum pathologischen Aβ-Protein führt. (modifiziert aus [61], [66])

Die einzelnen amyloidogenen und neurotoxischen Aβ42-Peptide fusionieren zu präfibrillären Oligomeren, die dann im Neuropil an Plasmamembranen von Zellfortsätzen zu diffusen Plaques aggregieren, welche das Initialstadium der Erkrankung charakterisieren [67]. Dieser Vorgang der Aggregation findet sich auch in der Media und Adventitia kortikaler und leptomeningealer Blutgefäßen (Amyloidangiopathie). Bei 80% der AD-Patienten konnten postmortal eine Amyloidangiopathie nachgewiesen werden [68].
Normalerweise entsteht - auch im gesunden Altershirn - nur ein kleiner Anteil dieser Aβ42-Bruchstücke. Liegt jedoch eine Punktmutation im γ-Sekretaseschnittbereich des APP vor (1-3%, 20-30 Familien weltweit), so verschiebt sich das Aβ40/Aβ42-Verhältnis zugunsten des Aβ42, so dass dessen Konzentration 1,5-1,9-fach steigt [69]. Dies ist für die Krankheitsentstehung verantwortlich [70] und lässt bei Betroffenen das Erkrankungsalter auf das 40. bis 50. Lebensjahr sinken [71].
Obwohl die amyloiden Plaques ein wichtiges Krankheitsmerkmal sind, weisen einige Studien darauf hin, dass das lösliche Aβ sowie die löslichen Oligomere für toxische Effekte und die Schwere der kognitiven Defizite verantwortlich sein dürften [65], [72], [73].
Desweiteren leiden Down-Syndrom-Patienten bereits in jungen Jahren an einer AD. Bei ihnen führt die Trisomie des Chromosoms 21 zur vermehrten APP-Produktion [51].

1.3.4 Präsenilin 1 und 2

Präsenilin 1 und 2 sind neben NCT, PEN-2 und APH-1 Basisbestandteile des γ-Sekretase-Komplexes. Sie bilden dessen katalytischen Anteil und schneiden Typ 1 Transmembranproteine wie das APP bei der AD, aber auch Notch und Syndecan 3 intramembranal im hydrophoben Teil der Membran. Der γ-Sekretase-Komplex (auch Aspartyl-Protease-Komplex genannt) kann allerdings nur bei Anwesenheit aller Teilkomponenten aktiviert werden und aktiv sein [74], [75].
PS1 und PS2 sind Membranproteine mit mehreren Transmembrandomänen und bestehen aus 467 (PS1) bzw. 448 (PS2) Aminosäuren, deren Gene auf Chromosom 14 (PS1) bzw. Chromosom 1 (PS2) liegen [76]. Dominant vererbte Mutationen sind Ursachen für einen frühen Krankheitsbeginn der AD. Im PS1-Gen sind bereits über 182 verschiedene Mutationen bekannt und machen einen Anteil von ungefähr 80% der FAD aus [48], [77]. Der Krankheitsbeginn liegt hier bereits zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr [71], [78].
Zusätzlich zu den bereits bekannten Missense-Mutationen N141I und M239V wurde 1998 die dritte Mutation V148I im PS2-Protein beschrieben [78]. Betroffene Familien erkranken zwischen dem 50. und 65. Lebensjahr. Diese Mutationen sind selten. Die meisten beschriebenen Mutationen sind Missense-Mutationen, die entweder dazu führen, dass weniger Aβ40 produziert wird (z. B. Mutation PS1-9, PS1-L166P) oder dass die Aβ42-

Konzentration ansteigt (Mutation PS1-G384A). Insgesamt scheinen das PS2 und Mutationen in seinem Gen weniger an der toxischen Aβ-Produktion beteiligt zu sein als das PS1 [75].

1.3.5 Klinische Symptome

Ablagerungen im menschlichen Gehirn treten bereits lange vor den ersten klinischen Manifestationen auf. Der nur langsam progrediente Verlauf der Erkrankung lässt Veränderungen lange unbemerkt, so dass bei Diagnosesicherung meist weniger als zehn Jahre Lebenszeit bleiben.

Die klinischen Symptome werden in drei verschiedene (mild, moderat, schwer) Stadien eingeteilt, die sich individuell unterschiedlich ausgeprägen [79]: Im Stadium 1 ist zunächst das Kurzzeitgedächtnis betroffen. Zudem finden sich Stimmungsschwankungen und amnestische Aphasien, wobei sich die Patienten durch Umschreiben der nicht erinnerten Wörter behelfen. Im Stadium 2 folgt eine Desorientiertheit zu Ort und Zeit, so dass die Betroffenen vertraute Umgebungen nicht mehr erkennen und Datum, Uhrzeit und Jahreszeit nicht mehr benennen können. Am Ende der Erkrankung (Stadium 3) steht ein Zustand, in dem sie selbst Angehörige und Freunde nicht mehr als diese wiedererkennen. Motorische Einschränkungen führen nach und nach zu Unselbständigkeit, so dass selbst alltägliche Dinge, wie Einkaufen, Waschen, Essen und Trinken nicht mehr erledigt werden können. Zuletzt erleiden die Patienten einen kompletten Kontrollverlust, der auch die Willkürmotorik einschließt [80], [81]. Die Infektanfälligkeit steigt, so dass meist rezidivierende Infekte (Pneumonien, Harnwegsinfekte) [82] zum Tod führen. Insgesamt ist die Mortalität unter an AD leidenden Menschen höher als die der gleichaltrigen nicht dementen Population.

1.3.6 Therapie

Neben einigen zur Therapie zugelassenen Medikamenten gibt es Trainingsprogramme für kognitive Funktionen. Außerdem werden in Gesprächen Bewältigungsstrategien für den Patienten selbst und dessen Familie entwickelt. Bis heute gibt es jedoch keine kurativen Ansätze.

Acetylcholinesteraseinhibitoren (Donepezil, Galantamin, Rivastigmin) sind bei leichter bis mittelschwerer Demenz (MMSE 26-10) [83] Mittel der ersten Wahl. Sie hemmen die Acetylcholinesterase reversibel. Durch den Anstieg der Konzentration von Acetylcholin sollen die kognitive Leistung verbessert und Verhaltensauffälligkeiten vermindert werden [84].

Memantin, das 2003 weltweit zugelassen wurde, ist ein Antagonist des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors. Durch Blockierung dieses Rezeptors wird eine postsynaptische Dauerstimulation verhindert. Damit kann durch die pathologisch gesteigerte Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt die postsynaptische Nervenzelle nicht mehr überstimuliert werden;

Sinneswahrnehmung und Gedächtnisleistung werden nicht gestört, kognitive Defizite und Neuronenzerfall im Sinne einer Exzitotoxizität werden verhindert [85], [86]. Memantin wird bei mittelschweren bis schweren Demenzen (MMSE < 14) eingesetzt. Studien belegen, dass sich eine dauerhafte Einnahme auf die Entwicklung der AD positiv auswirkt. Beispielsweise verbessern sich multiple kognitive Funktionen [87], dies führt unter anderem zu einer Reduktion der Abhängigkeit der Betroffenen von Pflegepersonal [88].
Acetylcholinesteraseinhibitoren und Memantin haben neben dem Nachteil, dass sie nur symptomatisch wirksam sind, auch noch eine relativ hohe Nebenwirkungsrate, die sich negativ auf die Langzeitcompliance auswirkt, und sie sind relativ teuer.

Deshalb werden weitere medikamentöse Therapieansätze geprüft wie z. B. NSAIDs, die die γ-Sekretase hemmen sollen, und Glitazone, die die Aktivität am Peroxisom-Proliferator-aktivierten-γ-Rezeptor (PPAR-γ-Rezeptor) erhöhen und somit die Stimulation der β-Sekretase hemmen. Der monoklonale Antikörper Bapineuzumab und Tarenflurbil, ein Aktivator der γ-Sekretase, wurden zwar in klinischen Studien geprüft, jedoch waren die geringen positiven Effekte klinisch nicht relevant [89].

1.4 Phytopharmaka bei AD

Phytopharmaka sind weltweit verbreitet. In der Europäischen Union (EU) sind sie vorwiegend zur Therapie von Schmerzen im Bewegungsapparat, Erkältungskrankheiten, Schlafstörungen, Verdauungsproblemen [90], Angst und Depressionen zugelassen. Seit Ende 2005 stehen nur noch pflanzliche Extrakte zur Verfügung, die, in gleicher Weise wie synthetische Arzneimittel nach dem Arzneimittelgesetz hinsichtlich Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit geprüft sind. Im Gegensatz zu diesen sind Phytopharmaka komplexe Vielstoffgemische mit wirksamkeitsrelevanten, agonistischen, synergistischen und auch noch unbekannten Anteilen. Sie besitzen multiple, pharmakophore Gruppen, wirken pleiotrop, aber unselektiv an mehreren Targets und haben durch Addition mehrerer Einzeleffekte ein breites Wirkprofil mit weniger wirkungsmechanistisch bedingten Nebenwirkungen.
Auch bei der AD kommen pflanzliche Arzneimittel zum Einsatz. Phytopharmaka mit antidepressiven, antiinflammatorischen, antioxidativen und antipsychotischen Wirkungen sind hier vorteilhaft, denn in späten Stadien entwickeln sich neben zellulären Veränderungen, die mit potentieller Entzündungs- und Infektionsgefahr einhergehen, auch zusehends psychische Veränderungen [91].
Der Ginkgo Biloba-Extrakt EGb 761 wird seit Jahrzehnten zur Demenzbehandlung eingesetzt, seine symptomatische Wirkung in den frühen Stadien der AD ist in vielen klinischen Studien belegt. Eine aktuelle Metaanalyse umfasste insgesamt neun Studien mit

2372 Patienten, die zwischen 12 und 52 Wochen mit diesem Extrakt behandelt wurden. Sie litten entweder an einer AD, an vaskulärer Demenz oder an einer Mischform. Während bei allen Diagnosegruppen die Therapie mit Ginkgo im Vergleich zu Placebo die geistige Leistungsfähigkeit signifikant besserte, ergab sich in Bezug auf die Aktivitäten des täglichen Lebens keine deutliche Besserung. In der Analyse der Subgruppe AD wurden dagegen beide Zielparameter hochsignifikant gebessert [92]. Deshalb sind in Deutschland mehrere Pharmaka, die EGb 761 (Tagesdosis 240 mg) enthalten, für die Therapie der Demenz zugelassen. Die Kosten werden von den gesetzlichen Krankenkassen erstattet. Sie sind deutlich nebenwirkungsärmer und preiswerter als Acetylcholinesteraseinhibitoren und Memantin. Das Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) kam nach der Analyse der Studien mit EGb 761 zu folgender Bewertung: Für das Therapieziel „Aktivitäten des täglichen Lebens“ gibt es einen Beleg für den Nutzen bei Verwendung einer Tagesdosis von 240 mg. Für die Therapieziele „kognitive Fähigkeiten“ und „allgemeine psychopathologische Symptome“ sowie für das Therapieziel „Lebensqualität der Angehörigen“ gibt es bei einer Tagesdosis von 240 mg Hinweis auf einen Nutzen. Hinweise auf schädigende unerwünschte Ereignisse ergaben sich nicht. Ein besonders guter Therapienutzen ergibt sich bei den Patienten, die psychische Begleitsymptome der nachlassenden Hirnleistung wie emotionale Labilität, Anspannung oder Unruhe aufweisen [93]. Die hippocampale Aβ-Konzentration wird zwar durch EGb 761 nicht reduziert [94], dennoch verzögert der Extrakt die Progression der Symptome [95] und wirkt antioxidativ [96]. Auch eine präventive Wirkung von EGb 761 beim altersabhängigen kognitiven Abbau konnte gezeigt werden.
Das Gewürz Kurkuma (aus dem Rhizom von *Curcuma longa* L.) wirkt anti-amyloidisch, antiinflammatorisch und hat einen positiven Effekt auf die α-Sekretase [97]. Erste Untersuchungen von Knoblauch [98], grünem Tee [99] und Tenuigenin, einem Inhaltstoff von *Polygala tenuifolia* L. [100], lassen in der Zukunft auf ein potentes AD-Therapeutikum hoffen.

In diesem Kontext sind die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu sehen, in denen drei seit Jahrzehnten bei Schlafstörungen, Unruhe bzw. depressiven Episoden verwendete pflanzliche Drogen, Baldrianwurzel, Hopfenzapfen und Johanniskraut, auf ihre Wirkung bei einem Tiermodell der AD geprüft werden sollen.

1.4.1 Baldrian (Valeriana officinalis L.)

Baldrian ist eine Arzneipflanze mit langer Tradition. Offizinell verwendet werden die getrocknete Wurzel (Valerianae radix) und die daraus hergestellten Extrakte.

Abb. 7: Valeriana officinalis (mit freundlicher Genehmigung [101])

Der 40-70%ige ethanolische Wurzelextrakt ist zugelassen zur Therapie von leichten nervösen Spannungszuständen und Schlafstörungen sowie bei psychischem Stress. Wegen des allmählichen Einsetzens der Wirkung eignet sich der Extrakt nicht für die akute Intervention. Die kontinuierliche Anwendung über mindestens 2-4 Wochen wird empfohlen, da durch längere Einnahme die klinischen Symptome besser beeinflusst werden, als bei kurzer Einnahmedauer [102]. Aufgrund der klinischen Studien, die die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit belegen, hat dieser Extrakt bei der EMA den Status „well-established use“ erhalten. Es sind bis auf eine individuell bestehende Hypersensitivität gegen den Wirkstoff keine Kontraindikationen bekannt. Aufgrund einer nicht ausreichenden Datenlage wird der Gebrauch bei Kindern unter 12 Jahren, in der Schwangerschaft sowie während der Stillzeit nicht empfohlen [103]. Selten auftretende Nebenwirkungen sind gastrointestinale Symptome (Übelkeit und abdominelle Krämpfe). Bei 20-facher Überdosierung [104] aber auch in Kombinationen mit Benzodiazepinen [105] können reversible toxische Symptome wie Tremor, abdominelle Krämpfe, Angina pectoris, Schwindel und Mydriasis auftreten. Ein Abhängigkeitspotenzial besteht nicht.

Die Inhaltsstoffe der Wurzeldroge lassen sich in verschiedene Substanzgruppen einteilen: den größten Anteil (0,5-2%) machen die Valepotriate Valtrat (50-80%) und Isovaltrat aus. Weitere Inhaltsstoffe sind u. a. Valerensäure, ätherisches Öl (0,3-0,8% Valeriansäure, Borneol, Sesquiterpene (Valeranon, Valerenol, Valerenal)), Flavonoide (Hesperidin, Linarin), Alkaloide (0,01-0,05%) wie Valerianin und Aktinidin, sowie Phenolkarbonsäuren und Aminosäuren [102]. Die sedierenden und einschlaffördernden Wirkungen von Baldrianwurzel

können bisher keiner spezifischen Substanzgruppe zugeordnet werden. Die enthaltenen Sesquiterpene, Lignane und Flavonoide, die am Adenosin-1-Rezeptor [106] agonisieren und an den 5-HT1A-Rezeptor, der Einfluss auf den Schlaf-Wach-Rhythmus hat, binden, werden diskutiert. Unterstützt wird dieser schlaffördernde Effekt durch das 6-Deoxysaccharosyl-Olivil, welches auch Koffein von seinem Rezeptor verdrängen kann [107].

Die **Valerensäure** ist ein Modulator des gamma-aminobutyric acid-$(GABA)_A$-Rezeptors, dem bedeutsamsten inhibierenden Rezeptor im zentralen Nervensystem [108]. Durch Valerensäure kommt es, ähnlich der Wirkweise der Benzodiazepine, zu einer verstärkten GABA-Wirkung am Rezeptor und dadurch zu einem anxiolytischen, beruhigenden und entspannenden Effekt [109]. Auch Borneol wirkt als positiver $GABA_A$-Modulator [110]. Weitere Inhaltsstoffe der Baldrianwurzel binden sich an die GABA- und Benzodiazepinbindestelle des Rezeptors, hemmen den präsynaptischen GABA-Reuptake und unterstützen den GABA-Transport ins Gehirn [110], [111].

Ein Ethylacetat-Extrakt, der Valeranon und Valerenol enthielt, reduzierte die Aktivität des Transkriptionsfaktors nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' B (NF-κB) auf unter 25% des Ausgangswertes [112].

1.4.2 Hopfen (Humulus lupulus L.)

Hopfen gehört zur Familie der Hanfpflanzen (*Cannabaceae*).

Abb. 8: Humulus lupulus [113]

Hopfen wird als zerkleinerte Teedroge und als 45 bzw. 60%iger ethanolischer Extrakt zur Linderung von leichten Symptomen von mentalem Stress und zur Unterstützung des Schlafes benutzt [114]. Im Gegensatz zu $GABA_A$-Rezeptoragonisten, die die wichtigen rapid eye movement-(REM-)Schlaf-Phasen unterdrücken, beeinflussen Hopfenextrakte und andere Phytopharmaka das physiologische Schlafmuster nicht [115]. Infolge der nur mäßigen Datenlage bei klinischen Studien wurden Hopfenzapfenextrakten von der EMA dem Status des „traditional use“ zugeordnet. Interaktionen und unerwünschte Nebenwirkungen sind bisher nicht bekannt. Da keine ausreichenden Daten zu Wirksamkeit und

Unbedenklichkeit vorliegen, wird der Gebrauch bei Kindern unter 12 Jahren, in der Schwangerschaft und während der Stillzeit nicht empfohlen. Die Einnahme von Hopfenzapfen(-extrakt) könnte die Fahrtauglichkeit vermindern. Ein Abhängigkeitspotenzial besteht nicht [114].

1.4.2.1 Pharmakologie der Inhaltsstoffe

Hopfenzapfen enthalten 15-30% Harz (mit den instabilen Bitterstoffen Humulon (α-Säure) und Lupulon, Adlupulon, Colupulon (β-Säuren) und die daraus entstehenden Verbindungen wie 2-Methyl-3-buten-ol), ätherisches Öl (0,35%, hauptsächlich Mycren, Farnesen, Humulen, α- und β-Caryophyllen) und Flavonoide/Polyphenole (0,5-1,5%, mit dem Hauptbestandteil Xanthohumol, sowie Quercetin, 8-Prenylnaringenin und Kaempferolglykoside). Ferner wurden Eiweiße, Mineralstoffe und Gerbstoffe gefunden [116].
Humulon und Lupulon hemmen die Produktion des Cytokins Interleukin 6 (IL-6) durch Blockierung des Tumornekrosefaktor α (TNF-α) und erzielen so einen antiinflammatorischen Effekt. Außerdem inhibieren sie die Signalübertragung des proinflammatorischen Transkriptionfaktors NF-κB, das Aktivatorprotein 1 (AP-1) und das cAMP response element-binding protein (CREB) [117].
Xanthohumol wirkt antiinflammatorisch, antioxidativ und antiproliferativ. Durch Suppression von NF-κB werden T-Zell-Proliferation, Entwicklung der IL-2-aktivierten Killerzellen, Zell-vermittelte Zytotoxizität und die Produktion der Th1-Cytokine IL-2, Interferon-gamma (IFN-γ) und TNF-α gehemmt [118]. Ferner hemmt Xanthohumol das proinflammatorische Cytokin monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Mausmakrophagen und menschlichen Monozyten. Dieses Cytokin spielt zusammen mit dem TNF-α eine große Rolle bei Komplikationen von Adipositas [119].
8-Prenylnaringenin, Xanthohumol und Isoxanthohumol aktivieren die Aromatase, ein Schlüsselenzym für die Östrogen-Synthese [120], [121].

1.4.3 Johanniskraut (Hypericum perforatum L.)

Johanniskraut gehört zu der Familie *Hypericaceae*. Offizinell genutzt werden das blühende Kraut (Hyperici herba) und die daraus hergestellten Zubereitungen.

Abb. 9: Hypericum perforatum [122]

Aus der Monographie der EMA zum „well-established use“ sind folgende Aspekte bedeutsam: Für die Therapie leichter bis mittelschwerer depressiver Episoden (entsprechend ICD-10) werden 80%ige methanolische oder ethanolische Extrakte verwendet. Als Tagesdosierung sind 600-1800 mg Extrakt zugelassen. 50-68%ige ethanolische Extrakte sind nur für die kurzzeitige Anwendung bei leichten depressiven Episoden in Tagesdosierungen zwischen 500 und 1200 mg zugelassen. Infolge der guten Datenlage bei klinischen Studien wurde Johanniskraut für diese Indikation der Status des „well-established use“ zuerkannt [123].

Bei bekannter individueller Hypersensitivität gegenüber dem Wirkstoff sollte auf eine Einnahme verzichtet werden. Weitere Kontraindikationen sind die regelmäßige Einnahme von Cyclosporin, Tacrolimus (nur systemisch), Amprenavir, Indinavir und andere Proteaseinhibitoren, sowie Irinotecan und Warfarin, da Johanniskraut eine induzierende Wirkung auf das Cytochrom-P450-System und P-Glycoprotein (P-GP) besitzt. Ebenso sollte während der Behandlung eine starke Exposition gegenüber UV-Strahlen vermieden werden [123]. Eine Phototoxizität wurde jedoch bei therapeutischen Dosierungen nicht beschrieben [124]. Da Hypericumextrakte über den Pregnan-X-Rezeptor (PXR) die Synthese von CYP3A4, CYP2C9 und CYP2C19 aktivieren [125] und die Produktion von P-GP induzieren, ist eine Reduktion der Plasmakonzentrationen von Substanzen wie Amitriptylin, Fexofenadin, Benzodiazepinen, Methadon, Simvastatin, Digoxin und Finasterid, die durch diese Enzyme metabolisiert werden, möglich. Frauen, die orale Kontrazeptiva verwenden, sollten zusätzliche kontrazeptive Maßnahmen nutzen [123]. Vor einer elektiven chirurgischen Maßnahme sollte Johanniskraut im Fall der Verwendung von interagierenden Narkosemitteln eine Woche vor dem Eingriff abgesetzt werden [126], [127]. Bei Kombination mit Serotonin-

Reuptake-Inhibitoren (z. B. Sertralin, Paroxetin, Nefazodon), Buspiron oder Triptanen können serotonerge Effekte auftreten [128]. Neben gastrointestinalen Problemen, allergischen Hautreaktionen (durch die Photosensibilität des Hypericins), Fatigue und Unruhe, können insbesondere hellhäutige Personen mit intensivem Sonnenbrand bei starker Sonneneinstrahlung reagieren. Akute und chronische toxische Wirkungen therapeutischer Dosierungen wurden in präklinischen Studien nicht beschrieben, ebenso keine genotoxischen oder reproduktionstoxischen Effekte. Da keine ausreichenden Daten vorliegen, wird der Gebrauch bei Kindern und Jugendlichen unter 18 Jahren, in der Schwangerschaft und während der Stillzeit nicht empfohlen [123].

1.4.3.1 Inhaltsstoffe

Johanniskrautextrakt enthält ätherisches Öl, 0,1-0,15% Napthodianthrone (z. B. Hypericin und Pseudohypericin), 2-4% Phloroglucinderivate (z. B. Hyperforin), 2-4% Flavonoide (z. B. Quercetin, Hyperosid, Kämpferol, Luteolin, Biflavonoide, Xanthone) sowie Gerbstoffe [129].

Hypericin hemmt die Monoaminooxidase, die Proteinkinase C, die Dopamin-β-Hydroxylase, die reverse Trankskriptase, Telomerase, sowie das Cytochrom P450-System [130]. Somit hemmt es die synaptosomale Aufnahme von Noradrenalin, Serotonin und Dopamin. Desweiteren kann Hypericin das Tumorzellwachstum durch Einleitung der Apoptose verhindern [131].

Hyperforin ist ZNS-gängig [123], an der antidepressiven Wirkung beteiligt und für die Wechselwirkungen mit anderen Pharmaka verantwortlich [132]. Es induziert dosisabhängig die Bildung von CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 und P-GP durch Aktivierung des PXR. Die subchronische Behandlung mit dem Extrakt führt zu einer kortikalen Downregulation von ß-Adrenozeptoren sowie Upregulation von 5-HT2-Rezeptoren [133], [134].

Flavonoide wie z. B. Quercetin hemmen die IL-6-Produktion. Dies stellt einen Erklärungsansatz für die antiinflammatorische Wirkung von Hypericum dar und stärkt auch die Hypothese des antidepressiven Effekts [135]. Quercetin agiert wie ein Antihistaminikum und kann hochdosiert *in vitro* die Thrombozytenaggregation hemmen [136].

1.5 Mausmodell

In diesen Untersuchungen wurde ein Mausmodell mit Mutationen im APP-Gen (KM670/671NL, sog. schwedische Doppelmutation) und im PS1-Gen (L166P) verwendet. Hierbei kommt es unter dem Thy1-Promoter zu einer Überexpression des mutierten APP sowie des mutierten PS1 [137]. Dieser Mausstamm, gezüchtet in einem C57Bl/6 Inzucht-Hintergrund (APPPS1-B6), besitzt besondere Charakteristika: Das Mausmodell ist mit einem sehr frühen Erkrankungsalter und einer aggressiven Form assoziiert und damit eines der

schnellsten, das derzeit weltweit existiert. Diese Mäuse weisen bereits im Alter von 50 Tagen pathologische Veränderungen wie erste β-Amyloid-Ablagerungen auf, die durch stark zunehmende Ablagerungen von Proteinaggregaten bis ins hohe Alter (300 Tage) gekennzeichnet sind. Die Spaltprodukte des APP (Peptide Aβ42 und Aβ40) führen zur ausgeprägten Plaqueanreicherung und damit zur Entwicklung dieser aggressiven Form der Amyloidose [137].

Dennoch ist das Mausmodell nicht direkt auf den Menschen übertragbar. Nicht nur, dass es bisher kein Modell gibt, welches alle Charakteristika der AD zeigt, auch die Tatsache, dass das Modell nur Teilaspekte liefert (kurze Lebensspanne der Maus, Beziehung zwischen Aβ-Akkumulation und weiteren pathologischen Veränderungen, die zum komplexen Krankheitsbild der AD beitragen), zeigen die begrenzte Nutzung des untersuchten Tiermodells [138].

2. Zielstellung

Die AD ist bislang unheilbar, die Ursachen sind weitgehend unbekannt. Bisher verfügbare Medikamente können nur die Progression der Erkrankung verlangsamen und haben lediglich geringe positive Effekte auf die Lebensqualität der Betroffenen sowie deren Familien. Auch in Anbetracht der steigenden Kosten im Gesundheitswesen ist es wichtig, neue Denkansätze und mögliche Alternativen zu herkömmlichen Therapieansätzen bei der Behandlung einer dementiellen Erkrankung - insbesondere der AD - zu entwickeln.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss verschiedener Extrakte von Phytopharmaka auf die Pathogenese der AD zu untersuchen. Als Modell wurden APP-transgenen Mäuse verwendet, bei denen einen Demenz im Sinne der humanen AD durch Mutation im APP und PS1 frühzeitig auftritt und bei denen der Phänotyp der AD (Bildung der Plaques) rasch ausgeprägt wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit standen folgende Fragestellungen in Vordergrund:

1. Sind Behandlungen eines AD-Mausmodells mit Extrakten aus Hopfenzapfen, Johanniskraut und Baldrianwurzel im Vergleich mit Placebo in der Lage AD-typische, pathologische Charakteristika zu beeinflussen?

1.1. In wie weit wird der intrazerebrale Gehalt des toxischen Aβ42 beeinflusst?

1.2. Kommt es zu Veränderungen bei den Aβ-Ablagerungen? Werden Anzahl, Größe und Dichte der Plaques durch eine tägliche Extraktgabe verändert? Kommt es zu Unterschieden in der Größenverteilung der Plaques?

1.3. Welche Auswirkung haben die Extrakte auf die Plaque-beeinflussenden Mikroglia?

2. In wie weit wirken die Behandlungen über verschiedene Zeiträume hinweg auf den Fortlauf der Erkrankung im AD-Mausmodell?

3. Verändert die tägliche Behandlung mit den Pflanzenextrakten die Expression APP-prozessierender Sekretasen (α- und β-Sekretase)?

4. Führt eine tägliche orale Extraktgabe zu histologischen Veränderungen in Organen wie u.a. Leber, Milz, Niere, Herz, Lunge und verschiedenen Bereichen des Darmtraktes?

3. Material und Methoden

3.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Geräte, Antikörper, Puffer, Kits und Primer finden sich im Anhang (Kapitel 9.1 bis 9.6).

3.2 Mausmodell

Für die Experimente wurde das von Radde et al. 2006 entwickelte transgene Mausmodell (APPPS1-B6) verwendet, da sich dieses durch frühzeitige und starke Amyloid-Ablagerungen auszeichnet. Der Mausstamm exprimiert das beim Menschen autosomal-dominant vererbte, doppelt mutierte Gen des Amyloid-Precursor-Proteins (APPswe, KM670/671NL) sowie das PS1 (L166P). Hier ist an Position 166 Leucin gegen Prolin ersetzt, was zur bisher aggressivsten Verlaufsform der AD führt, die schon im Alter von 24 Jahren beginnt. Bei der Maus beginnt die Amyloid-Ablagerung bereits im Alter von 6-8 Wochen [137].

3.3 Phyto-Extrakte

Die Experimente wurden mit vier verschiedenen Trockenextrakten aus pflanzlichen Drogen durchgeführt. Verwendet wurden die pflanzlichen Drogen *Lupuli flos* („Hopfen 1“ (H1) und „Hopfen 2“ (H2)), *Hyperici herba* („Johanniskraut“) und *Valerianae radix* („Baldrian“). Die Herstellung sowie die Bereitstellung der Extrakte erfolgte durch die Firma Finzelberg GmbH und Co KG, Andernach (Deutschland). Die Extrakte wurden bei Raumtemperatur (RT) trocken gelagert und täglich frisch mit Wasser angesetzt. Die Herstellung des jeweils verabreichten Extrakt-Wasser-Gemischs erfolgte bei allen Extrakten in gleicher Weise. Exemplarisch sei hier die Erklärung zum Extrakt Hopfen 1 beschrieben: Ausgehend von einer Tagesdosis von 150 mg/kg KG (0,15 mg/g) und einem Nativanteil von 80%, ergibt sich für ein Extrakt mit 100% Nativanteil eine zu verabreichende Menge von 0,1875 mg/g (0,15 mg/g * 100%/80%). Für eine Maus von 20 g entspricht dies 3,75 mg. Diese Menge wurde in 100 µl Wasser gelöst. **Tabelle 2** zeigt die Zusammensetzung der einzelnen Extrakte.

Tabelle 2: Extrakte und deren Inhaltstoffe

Extrakt	Inhaltsstoffe
Hopfen 1 (Auszugsmittel 80% EtOH v/v)	80% Nativextrakt 20% Trockenhilfsstoffmischung (17% Laktose, 3% hochdisperses SiO_2)
Hopfen 2 (Auszugsmittel Wasser)	50% Nativextrakt 50% Trockenhilfsstoffmischung (20% Maltodextrin 27,2% Lactose 2,8% Farbstoff (E150c))
Johanniskraut (Auszugsmittel 80% EtOH v/v)	70% Maltodextrin 14% Nativextrakt (mit 0,09% Hypericin und 0,32% Hyperforin) 14% Zellulose 2% SiO_2
Baldrian (Auszugsmittel 35% EtOH v/v)	60% Nativextrakt 40% Hilfsstoffmischung (28% mikrokristalline Zellulose, 10% Maltodextrin, 1% Kieselsäure, 1% Kieselerde)

3.4 Tierversuche, Applikationsdosis und Experimentdauer

Pro Extrakt und Untersuchungsgruppe wurden jeweils fünf männliche APPPS1-Mäuse täglich durch eine orale Gabe mit den entsprechenden in Wasser gelösten Extrakten behandelt. Die Therapie erfolgte intragastral durch Schlündeln des Extrakt-Wasser-Gemischs mit einer abgestumpften Schlündelsonde. Fünf männliche Kontrolltiere wurden entsprechend täglich mit Wasser behandelt.

Es wurden zwei Teilversuche durchgeführt:

1. Die Kurzzeit-Experimente dienten dem Screening der Extrakte auf ihre Wirkung hinsichtlich morphologischer Aspekte des charakteristischen AD-Krankheitsbildes in einem „frühen“ Alter. Die Schlündelung erfolgte erstmals in einem Alter von 40 Tagen über einen Zeitraum von 35 bzw. 60 Tagen, dementsprechend erfolgte die Gewebeentnahme in einem

Alter von 75 und 100 Tagen. Der Zeitpunkt der ersten Gabe liegt ca. eine Woche vor dem Nachweis der ersten Aβ-Ablagerungen. Die Extrakte Hopfen 1 und Hopfen 2 wurden ausgehend von einer Tagesdosis von 150 mg/kg KG in einer Dosis von 3,75 bzw. 6 mg/20g Maus (H2) verabreicht. Der Johanniskrautextrakt wurde entsprechend einer Tagesdosis von 400 mg/kg KG in einer Dosis von 57,14 mg/20g Maus gegeben, beim Baldrianextrakt betrug die Tagesdosis 900 mg/kg KG, woraus sich eine Dosis von 30 mg/20g für die Mäuse ergab.

2. Im Fall positiver Befunde wurde ein Langzeit-Experiment angeschlossen, um zu prüfen, ob die bei den Kurzzeit-Experimenten erreichten Effekte auch über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden können und ob sich weitere Veränderungen manifestieren. Das Langzeit-Experiment wurde mit dem Baldrianextrakt in entsprechender Dosis von 30 mg/20g Mausgewicht durchgeführt. Begonnen wurde auch hier am 40. Lebenstag. Die Therapie wurde vergleichbar zu der des Kurzzeit-Experiments durchgeführt. Die Tötung der Mäuse und die Gewebeentnahme erfolgten hier an Tag 125, 150, 175 und 200 (**Tabelle 3**).

Tabelle 3: Extrakte und Therapielänge

	75 d	100 d	125 d	150 d	175 d	200 d
Hopfen 1	5	5				
Hopfen 2	5	5				
Johanniskraut	5	5				
Baldrian	4	4	5	5	4	5

3.5 Tier- und Gewebe-Aufbereitung

Die Mäuse wurden in einem 12 h Tag-Nacht-Zyklus bei 22°C mit freiem Zugang zu Futter und Wasser im Maushaus der neurologischen Klinik entsprechend der geltenden Tierschutzbestimmungen untergebracht. Die Experimente wurden mit Genehmigung der zuständigen Behörde des Landes Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-048/08) durchgeführt.

Zur Gewebeaufbereitung wurden die Mäuse am letzten Tag der Therapie durch zervikale Dislokation getötet und durch zügige linksseitige intrakardiale Injektion mit PBS gespült. Das Großhirn wurde heraus präpariert, je eine Hemisphäre wurde in 4% Paraformaldehyd fixiert oder flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

3.6 Genotypisierung der Mäuse mittels PCR

Zur Überprüfung des transgenen Status der Mäuse wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genutzt, eine Methode zur Amplifizierung von Nukleinsäure-Fragmenten *in vitro*. Hiermit lässt sich durch mehrmalige Wiederholung der Arbeitsschritte der gewünschte DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigen, um den relevanten Genotyp nachzuweisen (siehe Abb. 11). Durch Biopsie des Mausschwanzes wurde Gewebe gewonnen, das mit 200 µl Lysepuffer und 3 µl Proteinase K über Nacht bei 55°C inkubiert wurde. Durch 30-minütiges Erhitzen der Bioptate auf 95°C wurde die Proteinase K inaktiviert. Der nach Zentrifugieren entstandene Überstand enthielt die genomische DNA. Zur Genotypisierung der APPPS1-Mäuse wurden Primer (APPswe-forward/reverse) benutzt, die im Falle einer APPPS1-positiven Maus ein 250 Basenpaar großes Amplifikat lieferten.

Die PCR erfolgte nach folgendem Protokoll: Denaturierung der DNA bei 95°C zur Trennung der Doppelstränge, Abkühlung auf 62°C und Anlagerung der Primer (Annealing), Elongation mittels Taq-Polymerase bei 72°C zur Gewinnung identischer Doppelstränge. Dieser Zyklus wurde 35x wiederholt, die Endprodukte mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

3.7 Morphologische Analysen

3.7.1 Immunhistochemie (IHC)

An einem histologischen Schnitt kann die Verteilung bestimmter Antigene sichtbar gemacht werden, indem man die Spezifität von Antikörpern mittels IHC zur Analyse der Morphologie des Gewebes nutzt. Die betreffenden Gewebe wurden nach Entnahme in 4% PFA fixiert. Nach 8 bis 14 Tagen wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert und in Paraffin eingebettet. Dann wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Anschließend wurden diese mit primären Antikörpern aufbereitet, wobei IBA1 (anti-Kaninchen-Antikörper) zum Nachweis von Mikroglia und Aβ-clone 6F3D (anti-human Aβ-Antikörper) zum Nachweis von amyloiden Plaques eingesetzt wurden. Der Fokus der Analyse lag auf der Bestimmung der Unterschiede der Plaqueverteilung im Hinblick auf das Lebensalter der Mäuse, die Größe der Plaques, sowie die Verteilung und Anzahl der Plaque-abwehrenden Mikroglia.

Es wurden je vier Sagittalschnitte durch das Corpus callosum angefertigt, die mit dem Mirax Slide Scanner (Auflösung: 230 nm/Pixel) digitalisiert wurden. Zur Analyse wurden anschließend die Kortizes zweier Schnitte ausgewählt, die mittels der Axio Vision-Software hinsichtlich Anzahl, Größe und Dichte der Plaques, relative Kortexbedeckung und Mikroglia-

Expression ausgewertet wurden. Bei der Hopfen 2- und Johanniskrautgruppe wurden jeweils vier, ansonsten wurden fünf Tiere pro Gruppe analysiert.

3.7.2 Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung

Die HE-Färbung ist eine Routinemethode, die einen schnellen Überblick über die Auswirkung der Extraktgabe auf das Gewebe verschafft. Saure Moleküle wie die Kerne färben sich blau-violett, Zytoplasma und Kollagen rosa.
In dieser Arbeit wurden neben Gehirn und Leber auch Herzmuskulatur, Lunge, Magen, Milz, Duodenum, Jejunum, Kolon, Niere, Hoden sowie Skelettmuskel der Mäuse entnommen und auf pathologische Veränderungen und mögliche Nebenwirkungen der verabreichten Extrakte untersucht. Mit Ausnahme der Hopfen 2- und Johanniskrautgruppe (n=4) wurden auch hier fünf Tiere pro Gruppe analysiert.

3.8 Gesamtproteinbestimmung

Das Gesamtprotein wurde bestimmt, um den spezifischen Anteil der Sekretasenproteine zu ermitteln. Zur Bestimmung der Proteinmenge stehen zwei Methoden zur Verfügung.
1. Quantitative Gesamtproteinbestimmung mit Hilfe eines BCA-Kits (nach PIERCE).
Diese Methode beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der Proteine mit Cu^{2+} in alkalischer Lösung einen Komplex bilden. Die Cu^{2+}-Ionen des Komplexes werden zu Cu^{+} reduziert, die mit der Bicinchinon-Säure zu einem violetten Farbkomplex reagieren, dessen Absorption bei 562 nm gemessen werden kann. Als Standard diente das bovine Serum-Albumin, welches in den Konzentrationen 0; 0,2; 0,5; 0,8; 1,1; 1,4; 1,7 und 2 µg/µl mitgeführt wurde.
Nach langsamem Auftauen auf Eis und anschließendem gründlichen Vortexen der zum Western Blot aufbereiteten Proteinfraktionen und des Standards wurden je 10 µl Probe oder Standard im Doppelansatz auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zugabe von 200 µl BCA-Reagenz (angesetzt entsprechend mitgeliefertem Protokoll) folgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C und 300 rpm im Schüttler. Nach Abkühlung auf RT schloss sich die photometrische Bestimmung bei 562 nm im Tecan Spektrophotometer an; Auswertung und Proteinkonzentrationsbestimmung folgten anhand der Standardkurve in der gelieferten Software.
2. Quantitative Gesamtproteinbestimmung mittels Nanodrop ND-1000. Hierbei wurden 2 µl der Probe auf das Pedestral aufgetragen und bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen.

3.9 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

ELISAs werden zur quantitativen Analyse spezifischer Proteine angewendet. Das zu testende Antigen wird durch monoklonale Antikörper erfasst, die an zwei unterschiedlichen Epitopen selektiv binden und so einen „Sandwich-Komplex“ bilden. Mit dieser Methode können die Effekte der Extrakte von Hopfen, Johanniskraut und Baldrian auf die Aβ42-Konzentration analysiert werden.

Die durch flüssigen Stickstoff schockgefrorenen und bei -80°C gelagerten Hemisphären wurden nach Zugabe von 500 µl RNAlater® 1 h auf Eis aufgetaut und bei 6000 rpm für 15 s im Precellys24®-Homogenisator homogenisiert. Zur Untersuchung wurden 20 mg des Homogenats mit der 1,6-fachen Menge des Carbonatpuffers und Proteasehemmer versehen, homogenisiert und anschließend 20 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 8 M Guanidinpuffer gemischt, gevortext und wie zuvor 20 min zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde erneut abgenommen und stellt die Carbonat-lösliche Fraktion dar. Auf das nach dem ersten Zentrifugieren entstandene Pellet wurde die errechnete Menge (bezogen auf die initiale Homogenatmenge) des 5 M Guanidinpuffers gegeben und für 3 h bei 1400 rpm und 25°C schüttelnd inkubiert. Anschließend folgte eine weitere Zentrifugierung bei 4°C für 20 Minuten und 14000 rmp. Der Überstand bildete die unlösliche GuanidinHCl Fraktion. Alle Fraktionen wurden bei -80°C gelagert.

Jeweils 50 µl dieser löslichen oder unlöslichen Fraktion des Aβ42-Proteins beziehungsweise des Standards wurden im Doppelansatz zusammen mit 50 µl Antikörper-Biotinkonjugatverdünnung auf die bereits mit einem Fang-Antikörper versehene Mikrotiterplatte aufgetragen. Dieser Fangantikörper erkennt und bindet selektiv das C-terminale Ende des Antigens. Während der Inkubation über Nacht bilden sich Antikörper-Amyloid-Antikörper-Komplexe. Nicht gebundene Substanzen wurden durch Waschen entfernt. Der Antikörper-Amyloid-Antikörper-Komplex wurde im nächsten Schritt indirekt über eine Biotin-Streptavidin-Bindung an Horse Radish Peroxidase (HRP) gekoppelt und 30 min auf dem Schüttler bei 800 rpm und RT inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundenes HRP abgewaschen, bevor das Chromogen aufgetragen wurde. In 30-minütiger Inkubation katalysierte das HRP die Umwandlungsreaktion des Chromogens in ein farbiges Produkt, welche durch die Stop-Lösung beendet wurde. Die Farbintensität wurde photometrisch bei 420 nm gemessen. Die so bestimmte Extinktion korreliert direkt mit der Aβ42-Konzentration der jeweiligen Probe und kann durch den Vergleich mit dem Standardkurve quantitativ ermittelt werden.

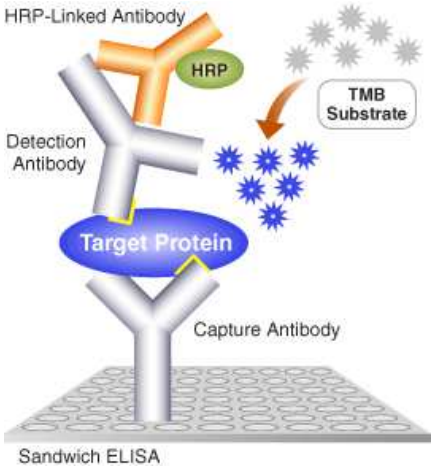

Abb. 10: Schematische Darstellung eines ELISAs (mit freundlicher Genehmigung [139])

3.10 Western Blot (WB)

3.10.1 Protein-Extraktion zur Proteingewinnung

Mittels WB wurden die beiden Enzyme α- und β-Sekretase ermittelt, die über das Spaltungsverhalten des APP im Gehirn entscheiden. Die Proteinaufarbeitung erfolgte nach Lesné [140]. 20 mg des Hirnhomogenats wurden dazu mit 500 µl Proteinlysepuffer 1 und 71,43 µl Proteasehemmer versetzt, 5 s bei 5000 rpm homogenisiert und anschließend 5 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C aufbewahrt. Das verbliebene Pellet wurde mit 100 µl Proteinlysepuffer 2 (TNT-Puffer) vermischt und 90 min bei 13000 rpm zentrifugiert, bevor Überstand 2, der die lösliche Fraktion der zytoplasmatischen Proteine bildet, abgenommen wurde. Nun wurden 110 µl Proteinlysepuffer 3 (Proteinpuffer C) zugefügt und nach weiteren 90 min Zentrifugieren Überstand 3 gewonnen, der ebenfalls bei -80°C aufbewahrt wurde. Dieser Schritt lieferte die membranständigen Proteine.

3.10.2 Gelelektrophorese

Mit Hilfe eines SDS-Polyacrylamidgels werden Proteine, die durch ein elektrisches Feld wandern, ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Gel besteht aus einem 12%igen Acrylamid-Trenngel und einem darüber aufgetragenen Sammelgel. Beide polymerisieren durch Zugabe von Ammoniumpersulfat und Tetramethylethylendiamin aus. Die Proben wurden mit einem Bromphenolblau-haltigen Proteinprobenpuffer und destilliertem Wasser versetzt, gemischt und ebenso wie ein Marker, der mehrere Proteine bekannter Größe beinhaltet, auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde über 30 min bei 80 V und für weitere 1,5 h bei 100 V in SDS-haltigem TRIS-Glycin-Laufpuffer durchgeführt.

3.10.3 Western Blot und Proteinbestimmung

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden in einem senkrecht zum Gel gerichteten elektrischen Feld in 2 h bei 50 V auf eine durch Methanol aktivierte Polyvinylidendifluorid-Membran übertragen.
Um unspezifische Bindestellen zu blocken, wurde die Membran in TBS Tween-20 mit 5% Milchpulver 1 h bei RT inkubiert, anschließend 3x 5 min in TBST gewaschen, bevor der spezifische Antikörper in einer 2% TBST-Milchpulver-Mischung über Nacht aufgetragen wurde. Durch Waschen der Membran in TBST für 3x 5min wurden nicht gebundene Primärantikörper abgewaschen. Anschließend wurde der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper aufgetragen und 1 h bei RT inkubiert. Einem weiteren Waschgang folgte die Entwicklung mittels der Reagenzien A und B aus dem Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents-Kit in einem Verhältnis von 40:1 durch eine Chemilumineszenzreaktion in einem Decon DC Science Tec. Detektiert wurden in jeweils drei Tieren pro Gruppe die α- und β-Sekretase sowie das sich in Muskelfasern befindende Aktin mittels den jeweiligen Primärantikörpern ADAM10 (1:1000), BACE-1 (1:1000) und β-Aktin (1:20000) und den Sekundärantikörpern anti-Kaninchen HRP (1:2500 auf ADAM10 und BACE-1), sowie anti-Maus HRP (1:2500 auf β-Aktin).

3.10.4 Stripping

Wurden mehrere Proteine nachgewiesen, so wurden nach Nachweis des ersten Proteins Antikörper und Sekundärantikörper durch das so genannte Stripping wieder von der PVDF-Membran entfernt. Hierzu wurde die Membran 2x für 10 min in Stripping-Puffer inkubiert. Nach anschließendem Waschen der Membran erfolgte ihre Reaktivierung durch eine Methanol-Inkubation von 1 min. Anschließend wurde die Membran in TBST mit 5% Milchpulver 1 h bei RT geblockt und nach wiederholtem Waschen mittels TBST, wurde sie mit neuen Primärantikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert.

3.11 Statistische Auswertung

Die Abbildungen und Diagramme repräsentieren stets den arithmetischen Mittelwert und den Standardfehler des Mittelwertes (engl. standard error of the mean, SEM). Die statistische Analyse der Daten durch den Lilliefors Test ergab eine logarithmische Normalverteilung der Messwerte. Die Messdaten wurden daher logarithmiert, um sie auf eine Normalverteilung zu transformieren und anschließend mittels Student's t-Test auf Signifikanz zu testen. *P*-Werte ≤ 0,05 wurden als signifikant angesehen. Höhere Signifikanzniveaus werden aufgrund der niedrigen Tieranzahl pro Gruppe nicht angegeben. Messwerte, welche sich signifikant von

den Kontrollwerten unterscheiden, werden in den Diagrammen durch einen Stern symbolisiert.

4. Ergebnisse

4.1 Genotypisierung der Mäuse mittels PCR

Zur Zucht der transgenen APPPS1-Mäuse wurden APPPS1-negative Mäuse mit APPPS1 heterozygoten Mäusen gepaart. Um das Vorhandensein der Mutation zu bestätigen, wurde, wie oben beschrieben, der Genotyp der Mäuse bestimmt, da nach dem Mendelschen Vererbungsgesetz nur 50% der Nachkommen Träger des mutierten Gens sind. Das APP-Fragment wurde mit Hilfe der PCR amplifiziert und über eine anschließende TAE-Gelelektrophorese (Bande bei ca. 250 Basenpaare) sichtbar gemacht.

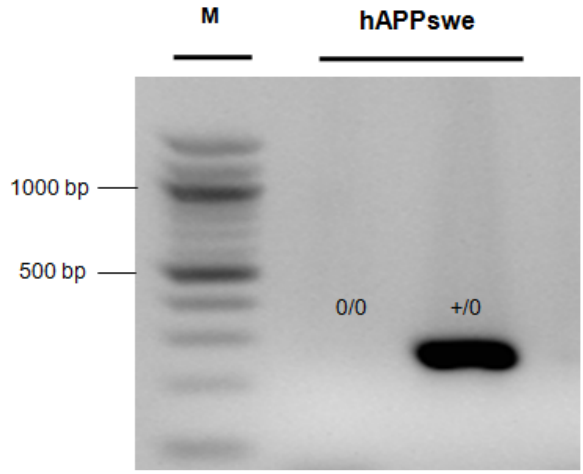

Abb. 11: Genotypisierung der APPPS1-Maus mit der PCR. Das heterozygote Tier weist bei 250 Basenpaare eine Bande auf.

4.2 Phytotherapie über 35 bzw. 60 Tage (Kurzzeit-Experiment)

Pro Gruppe wurden jeweils fünf Mäuse eingeplant. Jede Maus erhielt ab dem 40. Lebenstag einen der Extrakte Hopfen 1, Hopfen 2, Johanniskraut oder Baldrian in oben genannter Dosis, die ihrem Gewicht angepasst wurde. Die Therapie erfolgte täglich einmal über 35 Tage bei der Gruppe 75 d bzw. über 60 Tage für Tiere der Gruppe 100 d.

4.2.1 Bestimmung der Aβ42-Konzentration mittels ELISA

Aβ42-Bruchstücke entstehen, wenn das APP durch die β- und γ-Sekretase geschnitten wird. Durch Aggregation der einzelnen noch löslichen, neurotoxischen Stücke entwickeln sich Oligomere, die schließlich irreversibel zu unlöslichen Plaques aggregieren. Die Konzentration der löslichen und unlöslichen Fraktionen wurde quantitativ mit Hilfe des sog. Sandwich-ELISA, bei dem zwei unterschiedliche Antikörper an das Antigen binden und

detektiert werden, analysiert. Die Carbonat-lösliche Fraktion charakterisiert die löslichen Veränderungen, die GuanidinHCl-lösliche Fraktion die unlöslichen Plaques.

Die folgende Abbildung (**Abb. 12**) stellt den Aβ42-Gehalt verglichen mit dem Gesamtprotein zum Zeitpunkt 75 Tage dar. Die mit Hopfen 1 therapierte Gruppe zeigt weder in der unlöslichen noch in der löslichen Fraktion einen Unterschied zur Kontrollgruppe. Bei der Gruppe, die mit Hopfen 2 therapiert wurde, steigt hingegen die GuanidinHCl-Fraktion signifikant an. Auch die Carbonat-Fraktion nimmt zu. Die Johanniskraut-Gruppe zeigt einen höheren Guanidin-Anteil als die Kontrollgruppe, die Baldriangruppe weist lediglich einen signifikanten Abfall der Carbonat-Fraktion auf.

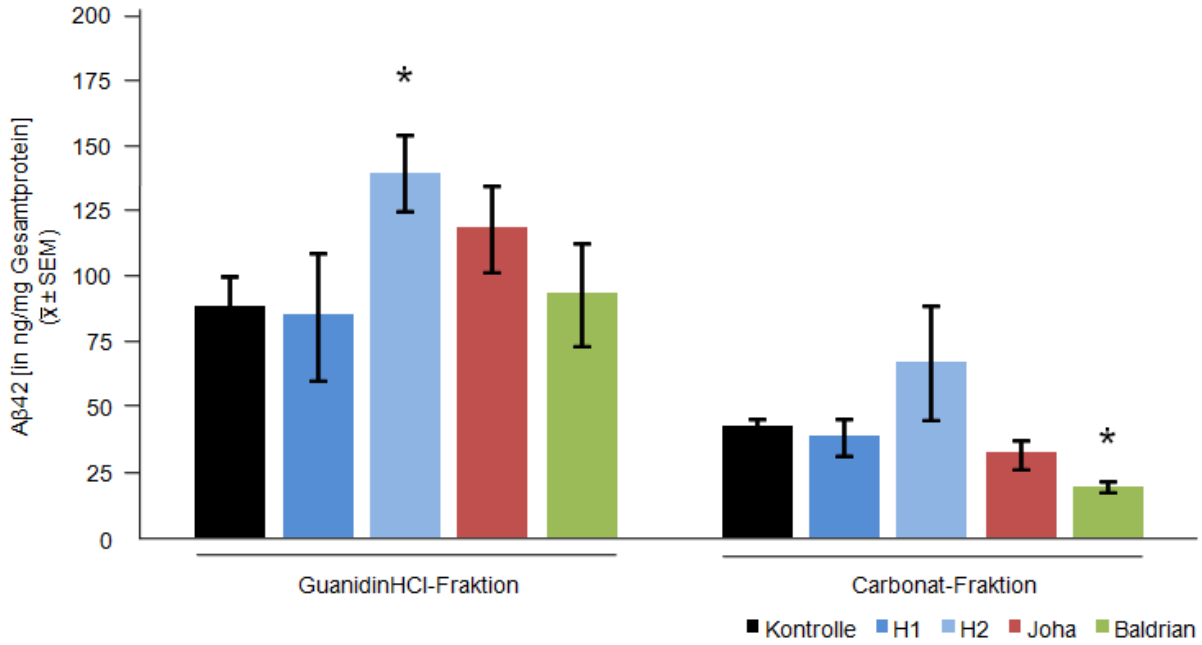

Abb. 12: Aβ42-Konzentration der mit pflanzlichen Extrakten behandelten AD-Mäuse zum Zeitpunkt 75 Tage (H1 (Hopfen 1) n=5, H2 (Hopfen 2) n=5, Joha (Johanniskraut) n=5, Baldrian n=4) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (n=10). * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

Nach 100 Tagen ist in allen Gruppen der GuanidinHCl-Fraktion mit Ausnahme der Hopfen 1-Gruppe ein Anstieg der Aβ42-Konzentration zu erkennen, wobei einzig die Fraktion der Baldriantiere signifikant von der Kontrollgruppe abweicht. In der Carbonat-Fraktion sind die Level der Hopfen 1-, Hopfen 2- und Johanniskrautgruppe signifikant angestiegen, während die Baldriangruppe hier keine signifikanten Werte im Vergleich zu den Kontrolltieren liefert (**Abb. 13**).

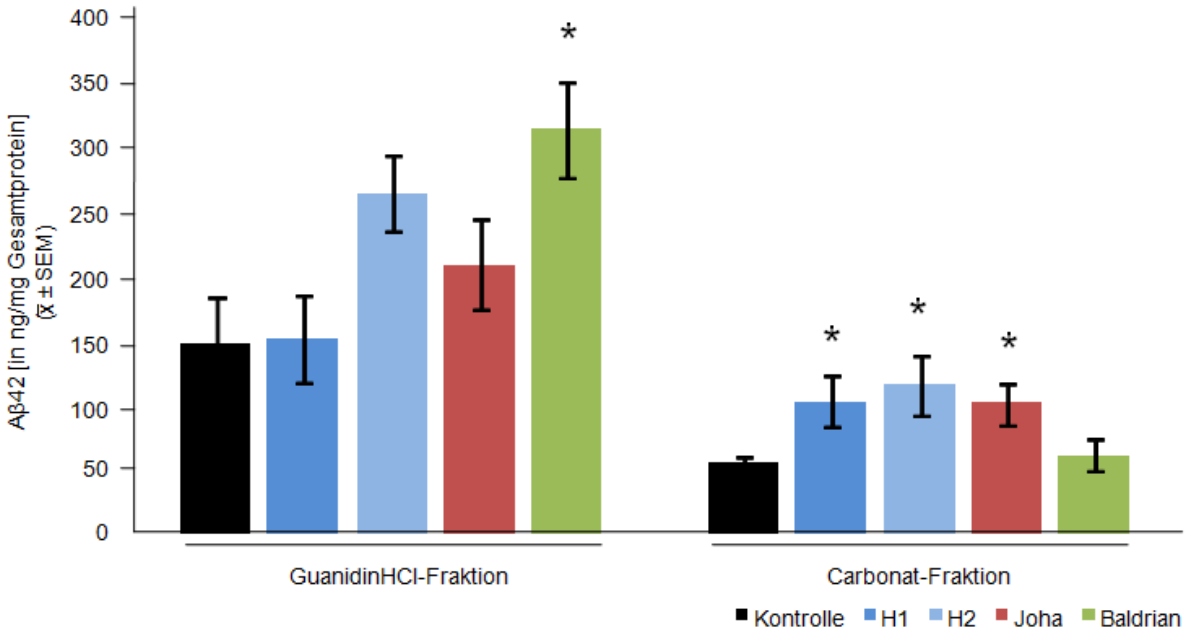

Abb. 13: Aβ42-Konzentration bei mit Extrakten behandelten AD-Mäusen zum Zeitpunkt 100 Tage (GuanidinHCl-Fraktion: H1 (Hopfen 1) n=4, H2 (Hopfen 2) n=3, Joha (Johanniskraut) n=5, Baldrian n=4, Carbonat-Fraktion: H1 (Hopfen 1) n=5, H2 (Hopfen 2) n=5, Joha (Johanniskraut) n=6, Baldrian n=5) im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe (GuanidinHCl-Fraktion n=11, Carbonat-Fraktion n=10). * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

4.2.2 Analysen zur Plaque-Morphologie (IHC)

Amyloide Plaques sind eine der charakteristischen Veränderungen bei der AD. Sie wurden in folgender Abbildung (**Abb. 14**) durch das Antigen 6F3D sichtbar gemacht. Die Abbildung stellt den Zeitpunkt 100 d dar. Die Gruppen wurden für 60 Tage mit Hopfen 1 (C und D), Hopfen 2 (E und F), Johanniskraut (G und H) oder Baldrian (I und J) behandelt. Die Bilder in der linken Spalte (A, C, E, G, I) zeigen jeweils eine Gesamtübersicht der entsprechenden Region mit einem Maßstab von 500 µm. Auf der rechten Seite (B, D, F, H, J) ist jeweils eine Vergrößerung (1:40) zur besseren Plaquedarstellung mit einem Maßstab von 50 µm abgebildet. A und B zeigen die Hirnregion und Plaquevergrößerung einer APP-Kontrollmaus zum Vergleich. Im Hirnschnitt einer Maus der Baldriangruppe (J), aber auch der Hopfen 1- (D) und Hopfen 2- (F) Gruppe erkennt man den Plaque-Größenunterschied infolge der Therapie.

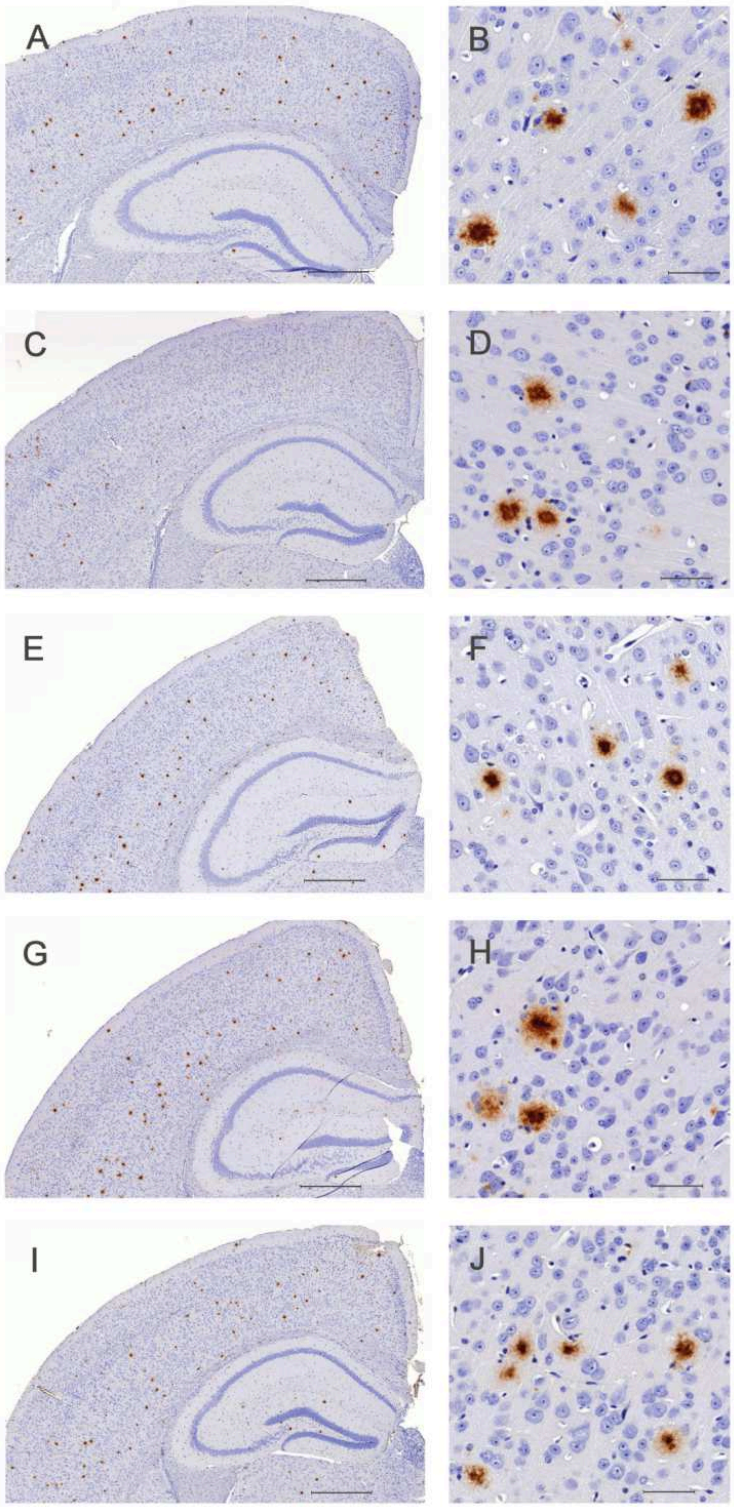

Abb. 14: Durch den Antikörper clone 6F3D sichtbar gemachte Plaques auf koronalen Hirnschnitten (im Bereich Bregma -1.5 mm bis -2 mm) unbehandelter und behandelter APPPS1-Mäuse. A und B zeigen den Hirnschnitt einer Kontrollmaus (links: Gesamtübersicht, rechts: Detailansicht 1:40) zum Zeitpunkt 100 d. Im Vergleich dazu von Tieren der Gruppen Hopfen 1 (C und D), Hopfen 2 (E und F), Johanniskraut (G und H) und Baldrian (I und J) zum gleichen Zeitpunkt. Die Plaques werden durch die Behandlung mit den Extrakten kleiner (sehr gut sichtbar in Bild J, aber auch in D und F, im Vergleich mit der Kontrollmaus im Bild B dargestellt). Der Maßstab der linken Spalte (A, C, E, G, I) beträgt 500 µm, der der rechten (B, D, F, H, J) 50 µm.

4.2.3 Bestimmung der Plaqueanzahl

Neben den morphologischen Veränderungen wurden auch die Plaqueanzahl, deren Dichte, Größe, die prozentuale Bedeckung des Kortex sowie die Plaquegrößenverteilung im Gehirn quantitativ bestimmt und analysiert. Die auftretenden Plaques wurden mit Hilfe der Axio Vision Software quantifiziert und verglichen. Hierbei zeigt sich zu den Zeitpunkten 75 d und 100 d eine starke Variabilität, wobei nur die Anzahl der Plaques der mit Johanniskraut therapierten Mäuse bis zum Tag 75 signifikant abnimmt. Der Hopfenextrakt 2 bewirkt zu beiden Zeitpunkten eine stärkere Abnahme als der Extrakt 1, wobei die Anzahl der Plaques beider Gruppen die der Kontrolltiere zum Zeitpunkt 100 d sogar übersteigt. Der Anstieg ist jedoch nicht signifikant. Bei der Baldriangruppe nimmt die Plaqueanzahl, die bis Tag 75 fast auf die Hälfte im Vergleich zu den Kontrolltieren gefallen ist, bis zum Zeitpunkt 100 d signifikant zu. Zwischen den beiden Zeitpunkten zeigt sich insgesamt in allen Gruppen ein signifikanter Anstieg der Plaques (**Abb. 15**).

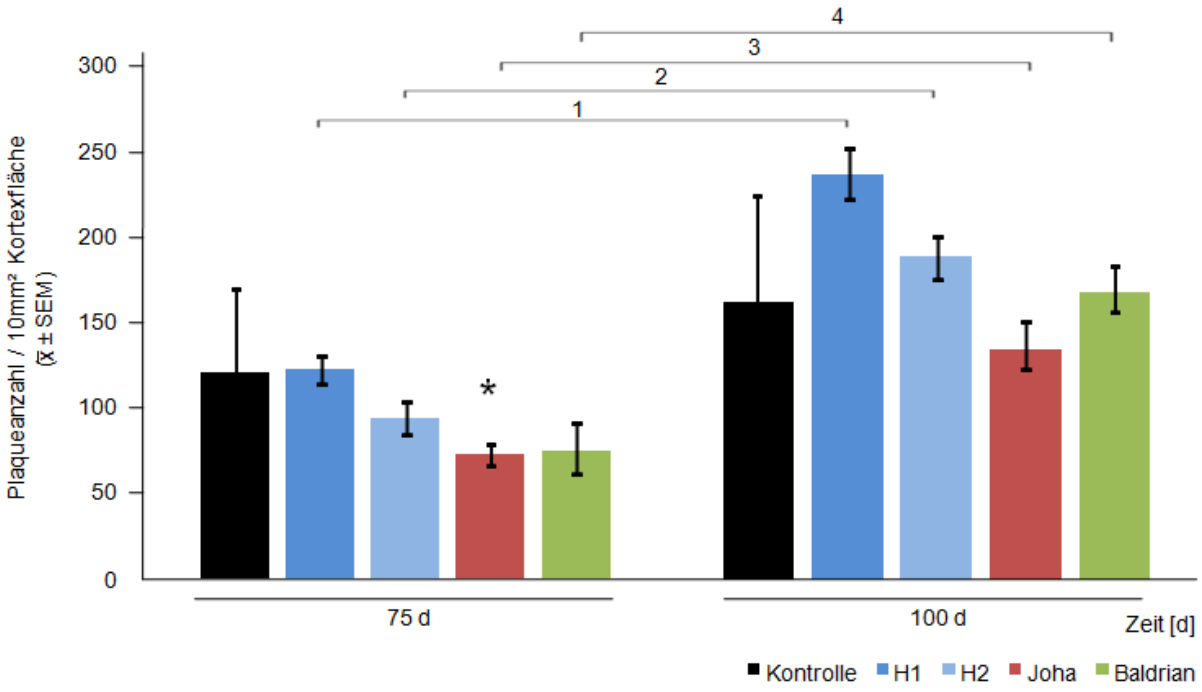

Abb. 15: Plaqueanzahl der mit Extrakten behandelten AD-Mäuse (Zeitpunkt 75 d: H1 (Hopfen 1) n=5, H2 (Hopfen 2) n=4, Joha (Johanniskraut) n=4, Baldrian n=4; Zeitpunkt 100 d: H1 (Hopfen 1) n=5, H2 (Hopfen 2) n=5, Joha (Johanniskraut) n=6, Baldrian n=4) im Vergleich zur Kontrollgruppe (75 d n=13, 100 d n=4). * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrolle; 1-4 zwischen den Zeitpunkten 75 d und 100 d innerhalb der therapierten Gruppen.

4.2.4 Bestimmung der Plaquedichte

Die Plaquedichte unterscheidet sich zwischen den therapierten Tieren und der Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten 75 d und 100 d signifikant (**Abb. 16**).

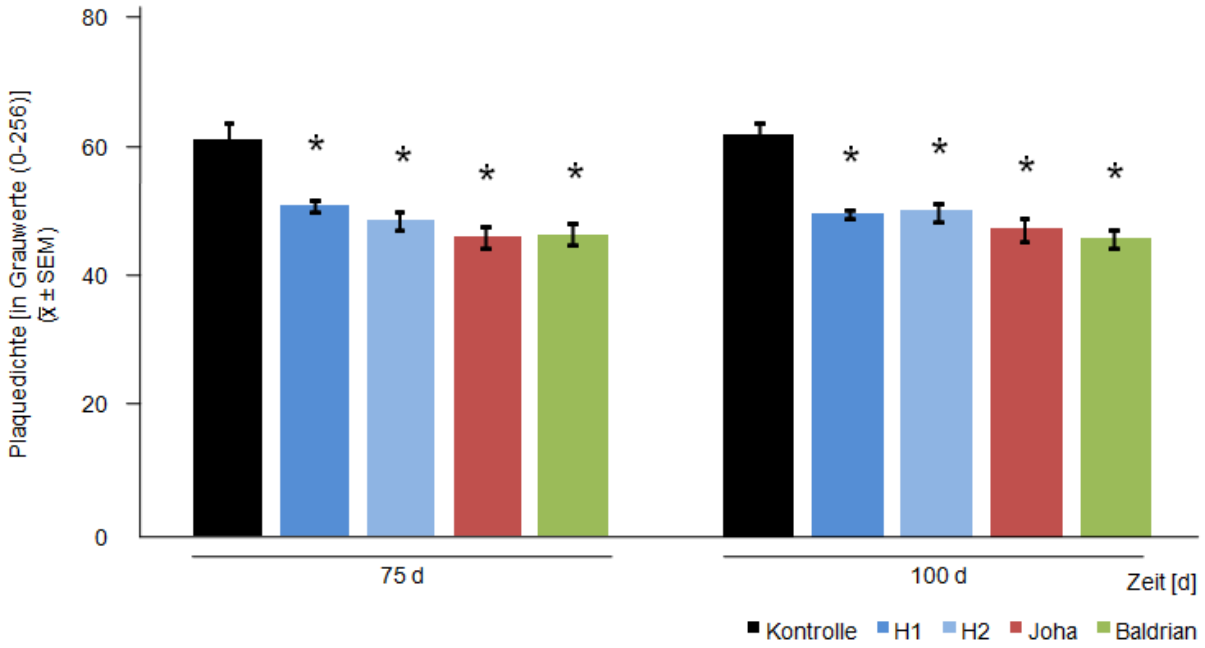

Abb. 16: Plaquedichte der mit Extrakten behandelten AD-Mäuse (Zeitpunkt 75 d: H1 (Hopfen 1) n=5, H2 (Hopfen 2) n=4, Joha (Johanniskraut) n=4, Baldrian n=4; Zeitpunkt 100 d: H1 (Hopfen 1) n=5, H2 (Hopfen 2) n=5, Joha (Johanniskraut) n=6, Baldrian n=4) im Vergleich zur Kontrollgruppe (75 d n=13, 100 d n=4). * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

4.2.5 Bestimmung der Plaquegröße

Hinsichtlich der Plaquegröße ist, verglichen mit den Kontrolltieren, zum Zeitpunkt 75 d in der Hopfen 2- sowie der Baldriangruppe eine signifikante Größenabnahme der einzelnen Plaques zu erkennen. Im weiteren Verlauf bis Tag 100 weisen alle Gruppen eine signifikant reduzierte Plaquegröße auf (**Abb. 17**).

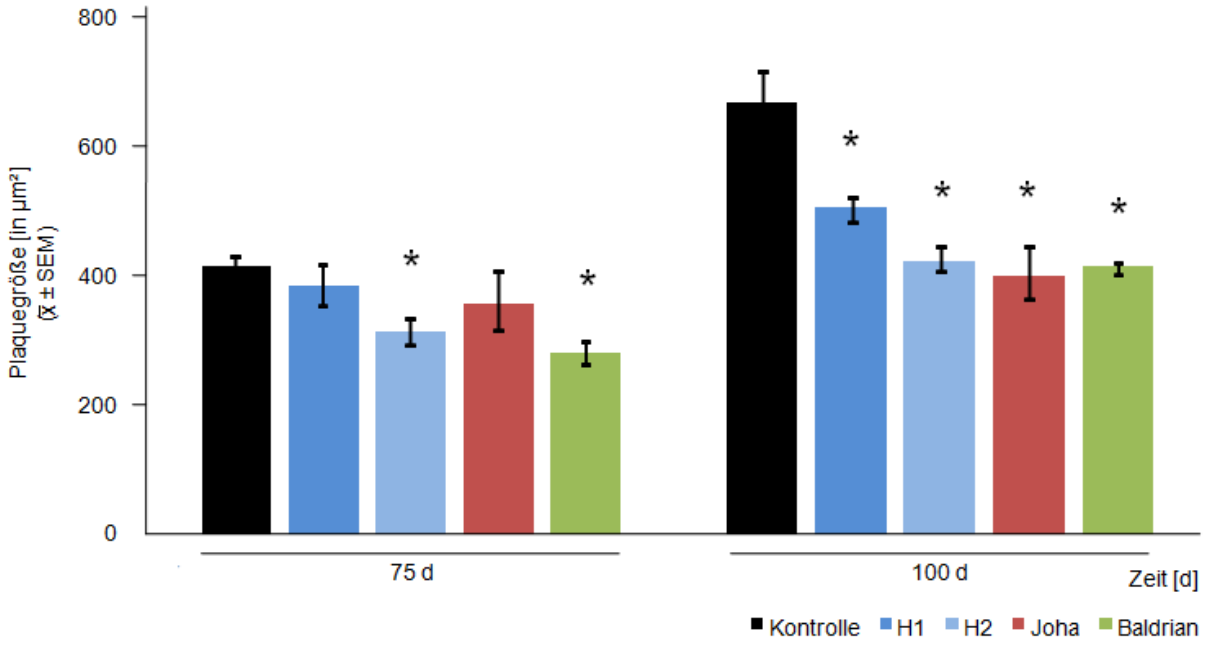

Abb. 17: Plaquegröße der mit Extrakten behandelten AD-Mäuse (Zeitpunkt 75 d: H1 (Hopfen 1) n=5, H2 (Hopfen 2) n=4, Joha (Johanniskraut) n=4, Baldrian n=4; Zeitpunkt 100 d: H1 (Hopfen 1) n=5, H2 (Hopfen 2) n=5, Joha (Johanniskraut) n=6, Baldrian n=4) im Vergleich zur Kontrollgruppe (75 d n=13, 100 d n=4). * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.2.6 Charakterisierung der Plaquegröße

Das nächste Diagramm (**Abb. 18**) zeigt das relative Verteilungsmuster der Plaquegröße in den verschiedenen Gruppen. Zum Zeitpunkt 75 d (im Diagramm oben dargestellt) ist zu erkennen, dass in allen Gruppen die kleinen Plaques bis Größe A ≤ 400 µm² mit über 50% vertreten sind. Während die Hopfen 1-Gruppe mit der Kontrollgruppe annähernd vergleichbar ist, gibt es in den restlichen Gruppen anteilmäßig mehr kleine Plaques. Im Vergleich sinkt der Anteil an mittelgroßen (400 µm² < A ≤ 700 µm²) und großen Plaques (A > 700 µm²) sowohl in der Johanniskraut- als auch der Baldriangruppe signifikant.

Bis Tag 100 d (unteres Diagramm) ist die Anzahl der kleinen Plaques in allen behandelten Gruppen leicht angestiegen. Gleichzeitig ist der Anteil der großen Plaques in den Gruppen der mit Hopfen 2, Johanniskraut und Baldrian therapierten Tiere gegenüber der Kontrollgruppe signifikant abgefallen.

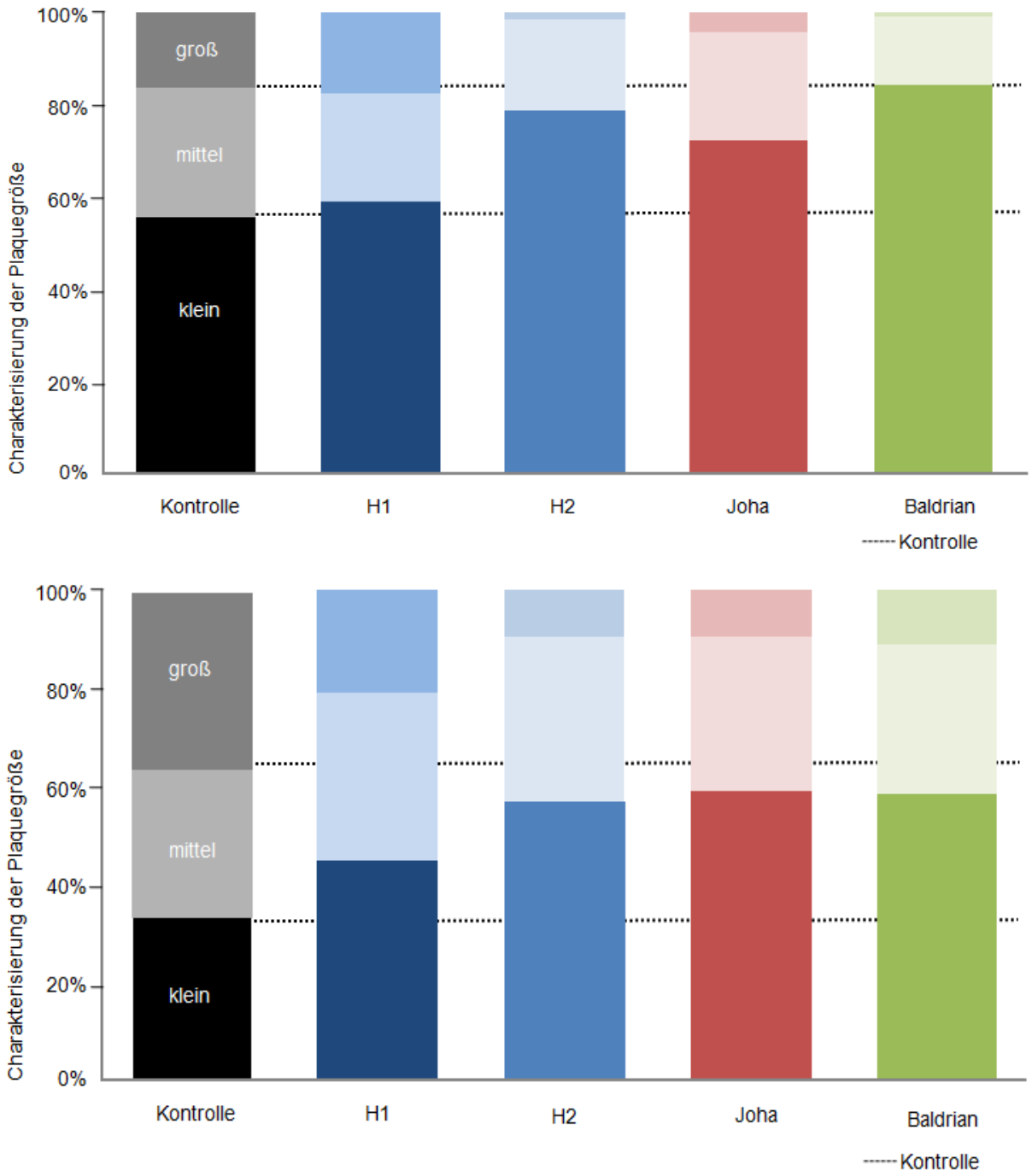

Abb. 18: Plaquegrößen bei mit Extrakten behandelten AD-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Signifikanzen ($p \leq 0{,}05$) wurden nicht eingezeichnet. „Groß“ entspricht Plaques mit einer Fläche $A > 700\ \mu m^2$, „mittel“ bedeutet $400\ \mu m^2 < A \leq 700\ \mu m^2$ und „kleine“ Plaques haben eine Fläche von $A \leq 400\ \mu m^2$.

a) Im oberen Teil der Abbildung ist der Zeitpunkt 75 d dargestellt (H1 (Hopfen 1) n=5, H2 (Hopfen 2) n=4, Joha (Johanniskraut) n=4, Baldrian n=4, Kontrollgruppe n=24). Die großen Plaques nehmen im Vergleich zu den Plaques der Kontrollgruppe in der Johanniskraut- und Baldriangruppe signifikant ab.

b) Im unteren Bildteil sieht man die Plaquegrößenverteilung nach 100 d (H1 (Hopfen 1) n=5, H2 (Hopfen 2) n=5, Joha (Johanniskraut) n=6, Baldrian n=4, Kontrollgruppe n=21). Signifikante Anstiege der kleinen Plaques ergeben sich in der Hopfen 2-, Johanniskraut- und Baldriangruppe.

4.2.7 Bestimmung der prozentualen Plaquebedeckung

Bei den relativen Werten der durchschnittlichen Plaquebedeckung/10 mm² Kortexfläche zeichnet sich zum Zeitpunkt 75 d ein zu den Kontrolltieren reduziertes Vorkommen ab. Während das Vorkommen von Plaques bei Hopfen 1 therapierten Tieren nur minimal sinkt, treten bei der Hopfen 2-Gruppe signifikant weniger Plaques (60%) als bei der Kontrolle auf. Bei der Johanniskrautgruppe sinkt die Plaquebedeckung signifikant auf 50%. Die mit Baldrian therapierten Mäuse profitieren am meisten; die Plaquebedeckung sinkt signifikant um 58 Prozentpunkte auf 42% im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Zum Zeitpunkt 100 unterscheiden sich mit Hopfen 1 behandelte Mäuse nicht von der Kontrollgruppe. In der Hopfen 2- und Baldriangruppe steigt zwischen dem 75. und 100. Tag die prozentuale Plaquedeckung an, bei den mit Johanniskraut behandelten Tieren zeigt sich ein weiterer, aber nicht signifikanter Rückgang des Plaqueanteils (**Abb. 19**).

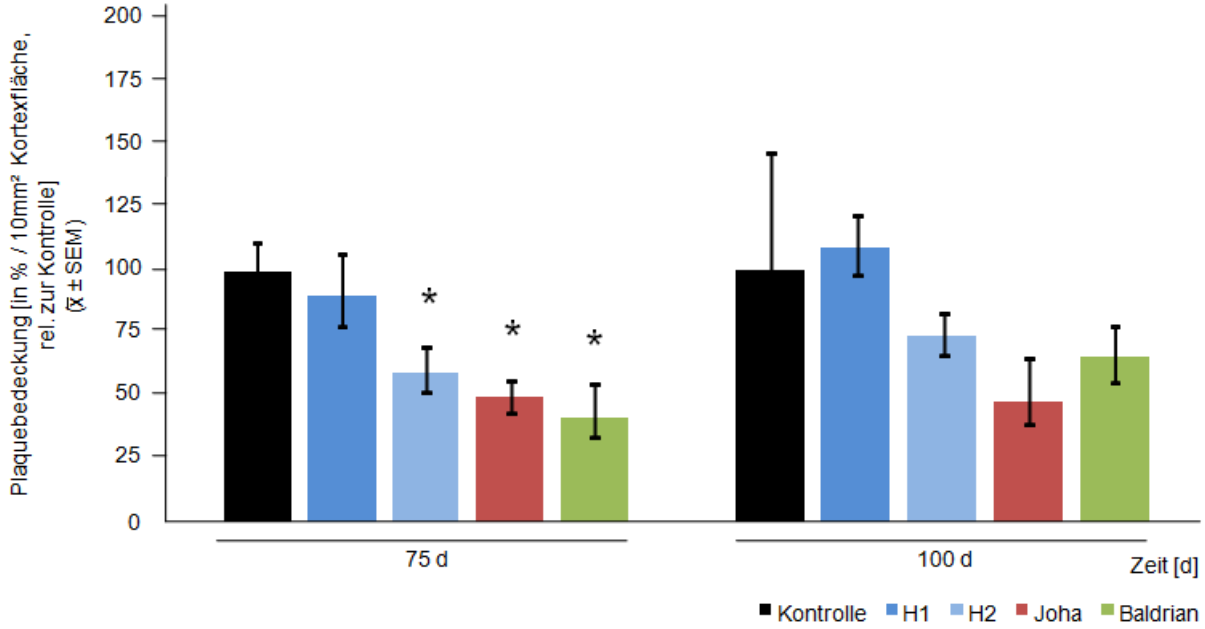

Abb. 19: Prozentuale Plaquebedeckung/10 mm² Kortex der mit Extrakten behandelten AD-Mäuse (Zeitpunkt 75 d: H1 (Hopfen 1) n=5, H2 (Hopfen 2) n=4, Joha (Johanniskraut) n=4, Baldrian n=4; Zeitpunkt 100 d: H1 (Hopfen 1) n=5, H2 (Hopfen 2) n=5, Joha (Johanniskraut) n=6, Baldrian n=4) im Vergleich zur Kontrollgruppe (75 d n=13, 100 d n=4). * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.2.8 Analysen der Mikroglia-Morphologie

Neben den Plaques kann auch die mikrogliale Antwort der hirnspezifischen Makrophagen durch das Antigen IBA1 (braun) in der Immunhistochemie dargestellt werden. IBA1 bindet an ein Ca^{2+}-bindendes Protein der Mikrogliaoberfläche und macht diese so sichtbar. **Abbildung 20** zeigt einen Vergleich zwischen einer Kontrollmaus und einem Versuchstier am Tag 100. In allen vier Gruppen zeigt sich, dass die Plaques von einer größeren Menge an Mikroglia kolonisiert sind als die Kontrollmaus.

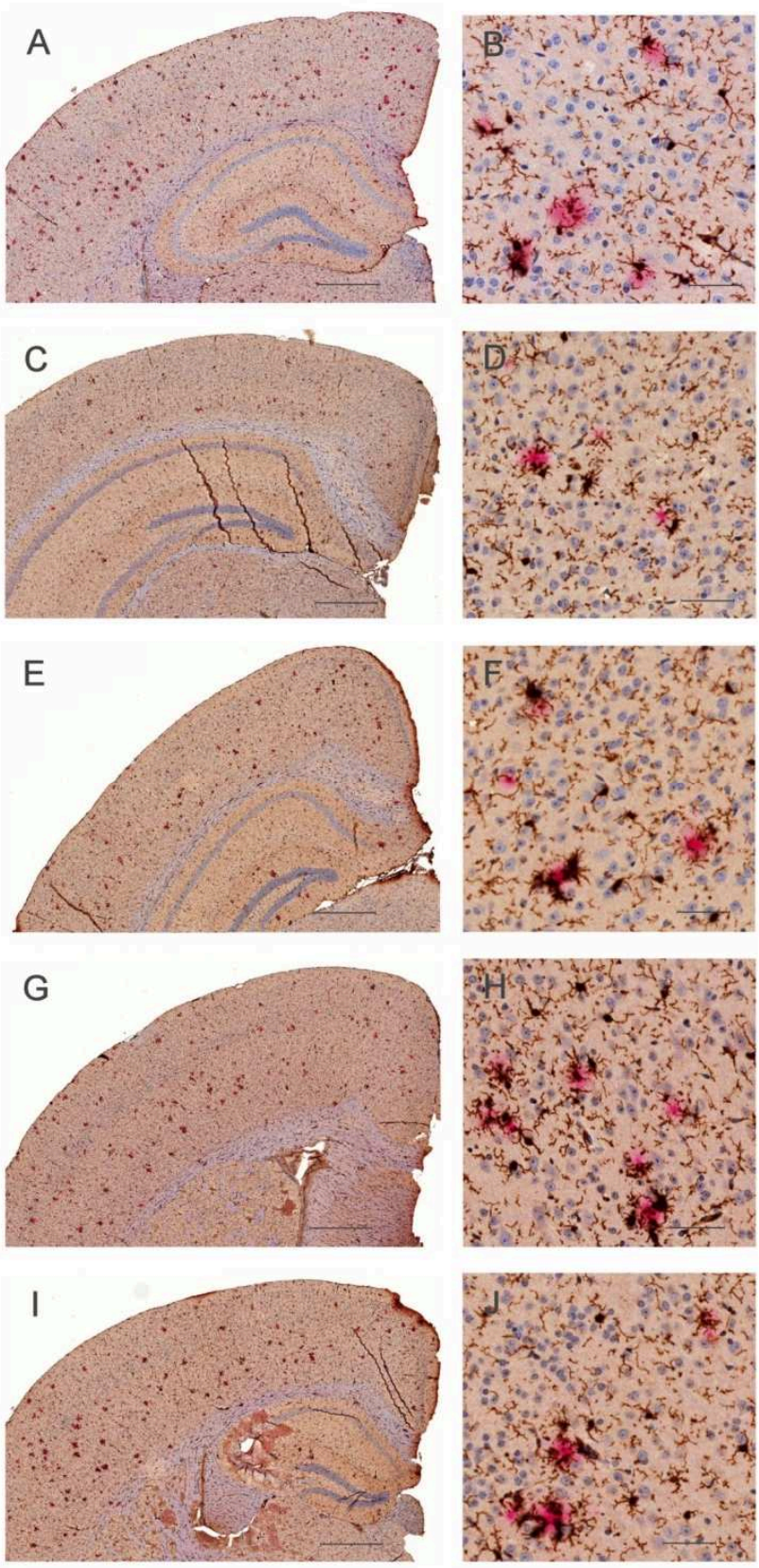

Abb. 20: Färbung gehirnspezifischer Mikroglia durch Bindung des IBA1 an ein Ca^{2+}-bindendes Protein der Mikrogliaoberfläche. APPPS1-Kontrollmaus (A und B) zum Zeitpunkt 100 d verglichen mit Hopfen 1- (C und D), Hopfen 2- (E und F), Johanniskraut- (G und H) und Baldrianextrakt (I und J) therapiertem Tier zum gleichen Zeitpunkt. Der Maßstab in der linken Spalte beträgt 500 µm, der der rechts 50 µm.

4.2.9 Bestimmung der durch Mikroglia bedeckten Kortexfläche

Die Aktivierung der Mikroglia ist ein charakteristisches Zeichen im Verlauf der AD, da es sich hierbei um die gehirnspezifischen Makrophagen handelt. Um sie darzustellen, wurde von jeweils drei Mäusen pro Gruppe ein immunhistologisches Gewebeschnittpräparat mit vier Sagittalhirnschnitten angefertigt und eingescannt. Mit dem Programm Axio Vision wurden zwei Areale des Kortex randomisiert ausgewählt und analysiert.

Anhand der Mikrogliafläche pro Kortexareal lässt sich ermitteln, wie stark die Mikroglia vertreten ist. Betrachtet man Tag 75, so zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit ~0,0235 mm² Mikrogliafläche pro 10 mm² Kortexfläche die Tiere der Hopfen 1-Gruppe signifikant weniger Mikrogliavorkommen pro Kortexareal (~0,017 mm²/10 mm² Kortexfläche). Dies gilt in geringerem Ausmaß auch für die Hopfen 2- und Johanniskrautgruppe, während die Baldriangruppe einen mit der Kontrollgruppe vergleichbaren Mikrogliaflächenanteil aufweist. Nach 100 Tagen zeigt sich ein anderes Bild: Hopfen 1- und Baldrian behandelte Maushirne weisen nun einen signifikant höheren Mikrogliaflächenanteil auf (Hopfen 1: ca. 0,063 mm² bzw. Baldrian: ca. 0,1 mm²/10 mm² Kortexfläche). Bei den Hopfen 2-Tieren steigt die Mikrogliafläche nicht signifikant an, während sie bei den mit Johanniskraut behandelten Mäusen weiterhin unterhalb derjenigen der Kontrollgruppe bleibt (**Abb. 21**).

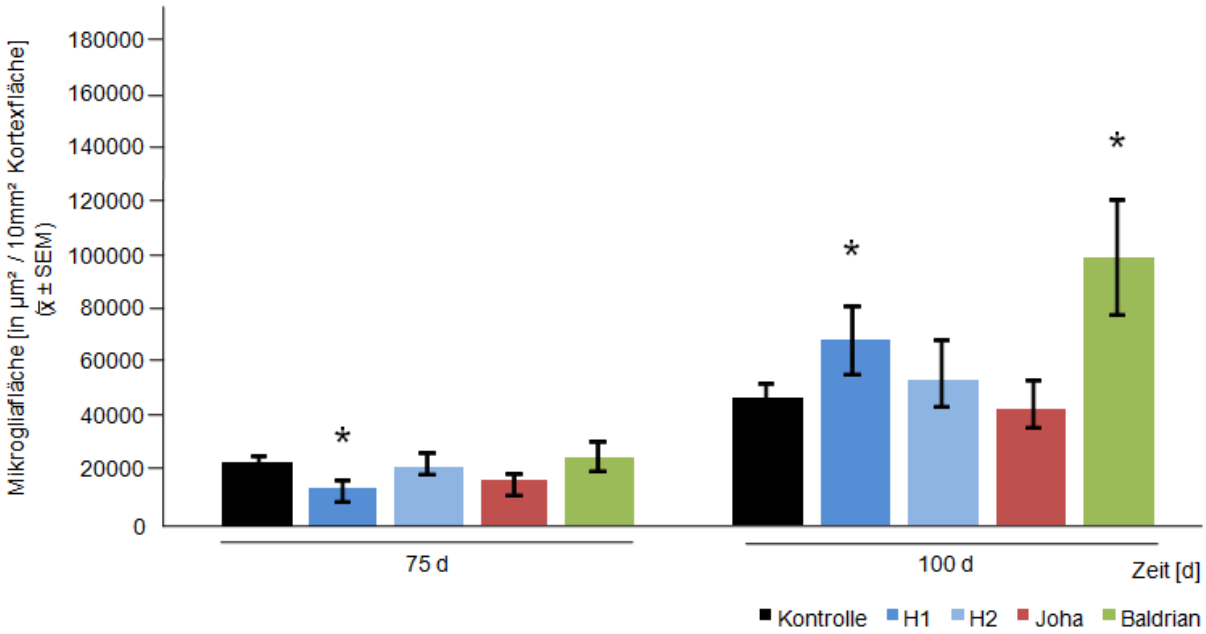

Abb. 21: Mikrogliafläche/10 mm² Kortexfläche bei mit Extrakten behandelten Mäusen (n=3) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tag 75 n=10, Tag 100 n=6). * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

Um die aktivierte Mikroglia zu quantifizieren, kann der Anteil an Plaques berechnet werden, der mit mehr als 50% Mikroglia bedeckt ist. Dies ist in **Abbildung 22** dargestellt. Bei den therapierten Tieren zeigen sich im Vergleich zu den Kontrollgruppen der Zeitpunkte 75 d und

100 d signifikante Anstiege, wobei zum frühen Zeitpunkt die mit Hopfen 1 und Baldrian behandelten Mäuse einen höheren prozentualen Anteil mit > 50% Mikrogliaaktivierung aufweisen, während zum Zeitpunkt 100 d die Werte bei den mit Hopfen 2 und Johanniskraut therapierten Tieren höher sind und besonders die Mikrogliabedeckung der Baldriangruppe im Vergleich zum Zeitpunkt 75 d signifikant abnimmt.

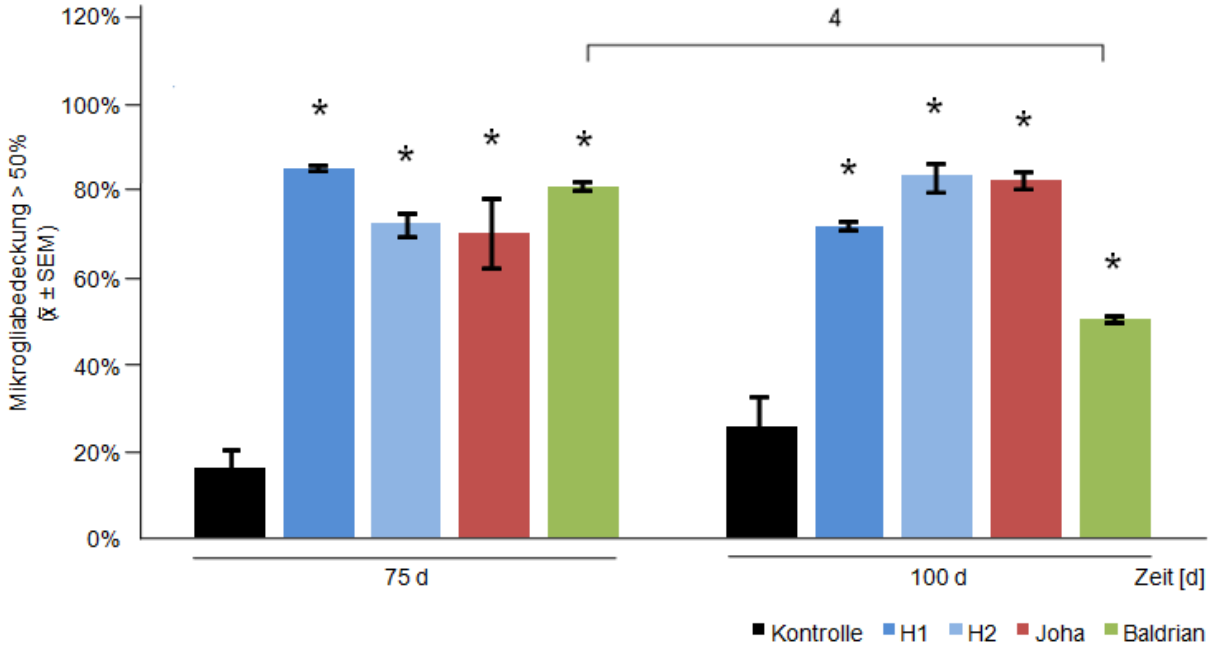

Abb. 22: Anteil an Plaques mit mehr als 50% Mikrogliabedeckung bei mit Extrakten therapierten AD-Mäusen (n=3) im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe (Tag 75 n=10, Tag 100 n=7). * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrolle; „4“ im Vergleich zwischen der Baldriangruppe.

4.2.10 Analysen der Sekretasen-Expression

Zur Darstellung des Proteinexpressionsniveaus wurden mit dem Homogenat von jeweils drei therapierten Tieren sowie drei Kontrollmäusen ein Western Blot angefertigt. Bestimmt wurden die α- und β-Sekretase sowie das Muskelprotein β-Aktin (46 kDa), das als Bestandteil des Zytoskeletts universal vorkommt und als Ladungskontrolle dient. Die **Abbildung 23** zeigt, dass die 60 kDa-Banden von ADAM10, das zur α-Sekretasenfamilie gehört, zum hier dargestellten Zeitpunkt 100 d in beiden Hopfengruppen eine stärkere Intensität aufweist als die Kontrollgruppe. Die Signalintensität der β-Sekretase, die durch BACE-1 als 56 kDa-Bande repräsentiert wird, nimmt hingegen in den behandelten Gruppen ab, wobei bei einem ein Tier der Hopfen 1-Gruppe eine ähnlich starke Intensität wie die Vergleichsgruppe vorhanden ist.

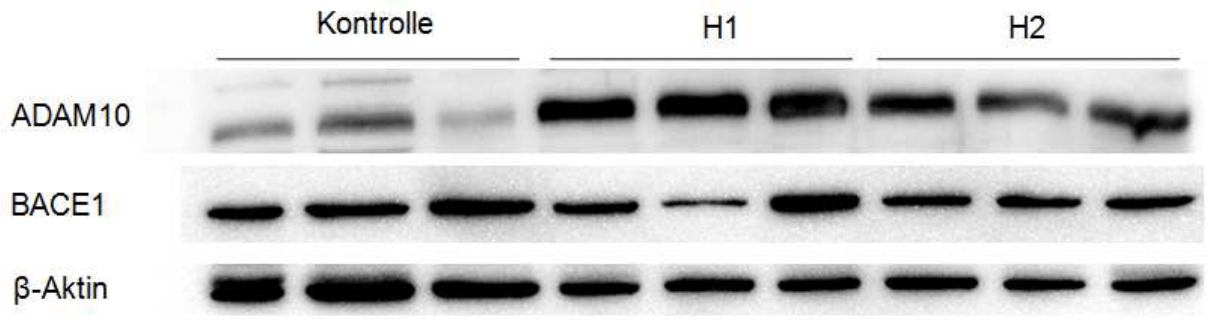

Abb. 23: Western Blot der ADAM10- und BACE-1-Sekretasen, sowie des β-Aktins zum Zeitpunkt 100 d in den Gruppen Hopfen 1 und Hopfen 2. Es zeigen sich, verglichen mit der Kontrollgruppe, in beiden Gruppen stärkere Banden des ADAM10. Die Bande des BACE-1 zeigt in zwei Mäusen eine schwächere Signalstärke als die der behandelten Gruppe, während eine Maus gleich starke Signale aufweist.

Bei der Baldrian- und Johanniskrautgruppe zeigt sich ein ähnliches Bild (**Abb. 24**). Auch hier ist die Intensität der ADAM10-Bande signalreicher als in den Kontrolltieren, während die BACE-1-Banden schwächer sind. Lediglich eine Maus aus der Johanniskrautgruppe weist verglichen mit den beiden restlichen der Gruppe ein stärkeres Signal auf.

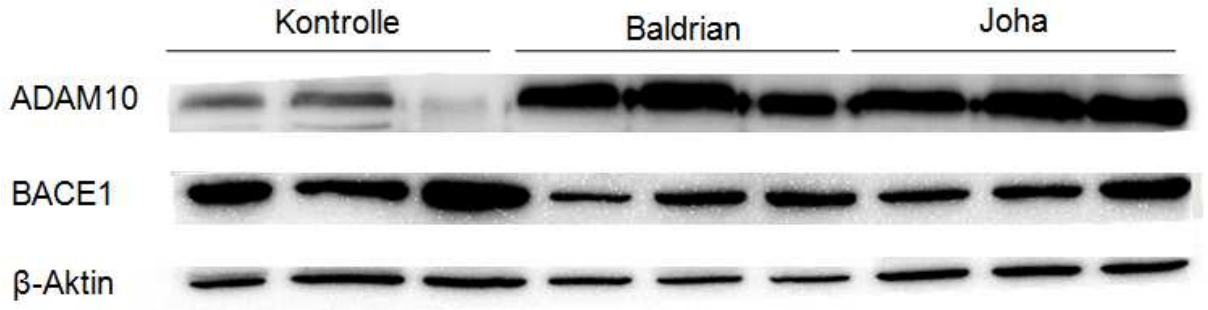

Abb. 24: Western Blot der ADAM10- und BACE-1-Sekretasen, sowie des β-Aktins zum Zeitpunkt 100 d in den Gruppen Baldrian und Johanniskraut. Dargestellt sind die unterschiedlichen Intensitäten der Banden im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.2.11 Prozentuale Bestimmung der Expressionshöhe der Sekretasen

Die beiden Enzyme α- und β-Sekretase, die über das Spaltungsverhalten des APP im Gehirn entscheiden, werden mittels Western Blot semiquantitativ ermittelt, mittels grünem Licht wird dann eine Chemilumineszenzreaktion ausgelöst, die mit dem Decon DC Science Tec detektiert wird. Durch Messung der Intensität der unterschiedlichen Banden kann man die Werte berechnen und miteinander vergleichen.

Die α-Sekretase ADAM10, die das Protein an der physiologischen Schnittstelle schneidet, zeigt zum Zeitpunkt 75 d bei Mäusen der Hopfengruppe 1 eine Abnahme um knapp 25% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Beim Hopfen 2-Extrakt sinkt der Anteil dieser Sekretase signifikant auf weniger als 20% des Ausgangswerts. Im Gegensatz dazu sieht man sowohl

bei den Johanniskraut- als auch bei den Baldriantieren einen Anstieg der Sekretaseanteils auf 132% bzw. nahezu 150%.

Zum Zeitpunkt 100 Tage steigt die Sekretaseexpression in den Hopfengruppen massiv auf fast 400% an. In der Baldriangruppe sogar auf 600%, in der Johanniskrautgruppe ist der Anstieg geringer, aber dennoch signifikant (**Abb. 25**).

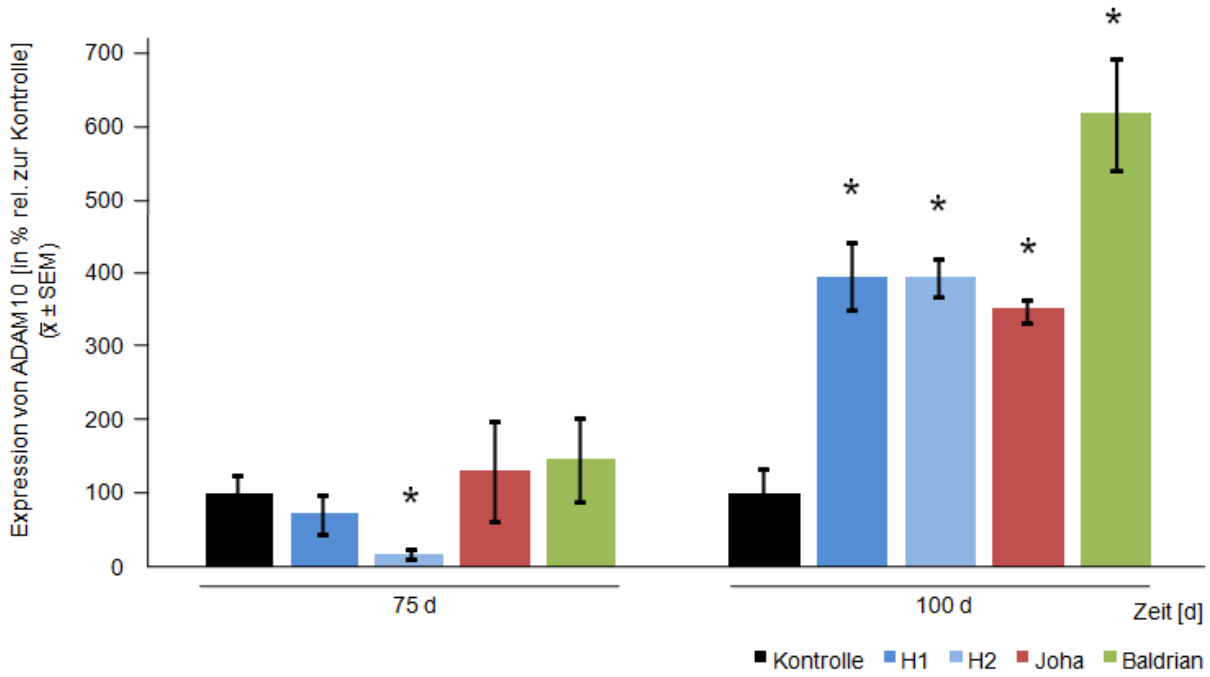

Abb. 25: Darstellung der Expressionsniveaus der α-Sekretase der mit Extrakten behandelten AD-Mäuse (n=3) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=3). * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

Betrachtet man hingegen die Expression der β-Sekretase BACE-1, deren Aktivität zur pathologischen Spaltung des APP führt, so zeigt das Diagramm (**Abb. 26**) am Tag 75 bei der Hopfen 1- und Johanniskrautgruppe einen Anstieg der Sekretaseexpression. Bei der Hopfen 2-Gruppe tritt im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Änderung ein. Die Baldriangruppe zeigt einen deutlichen, aber nicht signifikanten Abfall. Im weiteren Verlauf fällt die Sekretaseexpression in allen Gruppen ab mit Ausnahme der Baldriangruppe, in der sie im Vergleich zu Tag 75 gering ansteigt.

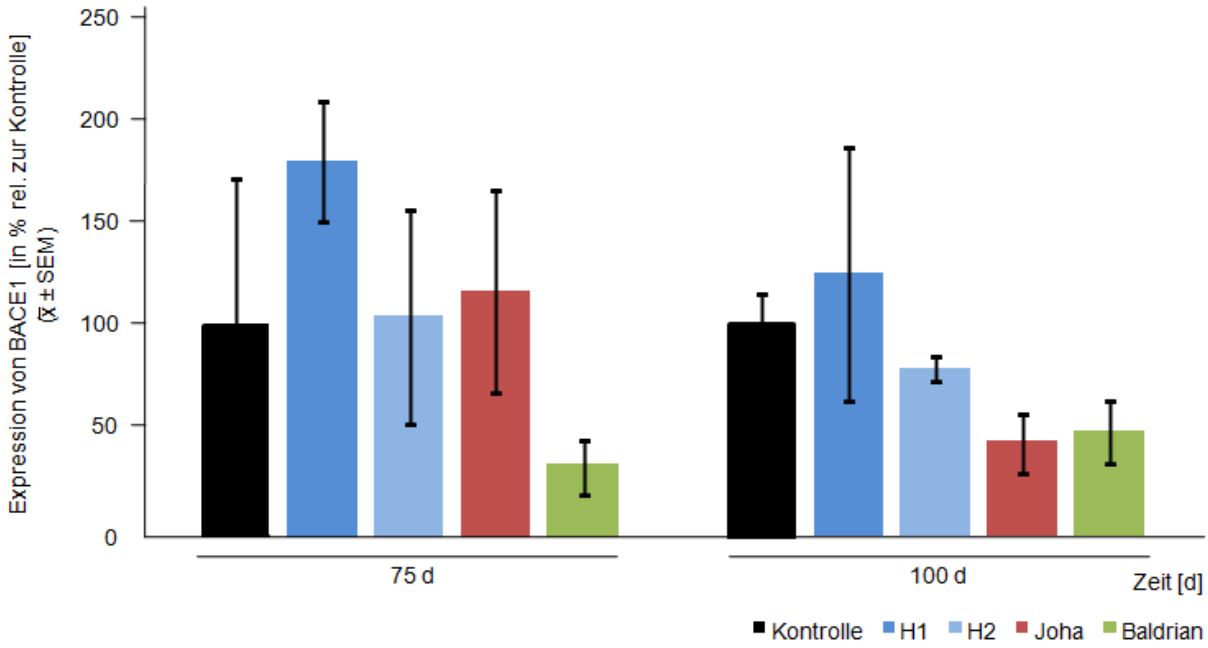

Abb. 26: Darstellung der Expressionsniveaus der β-Sekretase der mit Extrakten behandelte AD-Mäuse (n=3) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=3) (100%).

4.2.12 Morphologische- und Toxizitätsanalyse

Die HE-Färbung ist eine Routinefärbung, die eine Aussage über das jeweilige Gewebe ermöglicht. Betrachtet wurden mit dieser Färbetechnik neben der Gehirnhemisphäre (**Abb. 27**, A) und der Leber (B) auch die Lunge (C), die Niere (D), die Herzmuskulatur (E), die Milz (F), der Magen (G) und das Jejunum (H). Mit Ausnahme der Hopfen 2- und Johanniskrautgruppe (n=4) wurden hier jeweils fünf Tiere pro Gruppe analysiert. Alle Gewebeschnitte zum Zeitpunkt 100 d ergaben keinen Hinweis auf pathologische Erscheinungen oder toxische Nebenwirkungen die auf die therapeutisch verabreichte Dosis der pflanzlichen Extrakte zurückzuführen waren. In **Abbildung 27** sind als Beispiel Gewebeschnitte der Johanniskrautgruppe zum Zeitpunkt 100 Tage dargestellt. Auch in den Schnitten der mit Baldrian oder Hopfen therapierten Gruppen konnten keine pathologischen Veränderungen festgestellt werden.

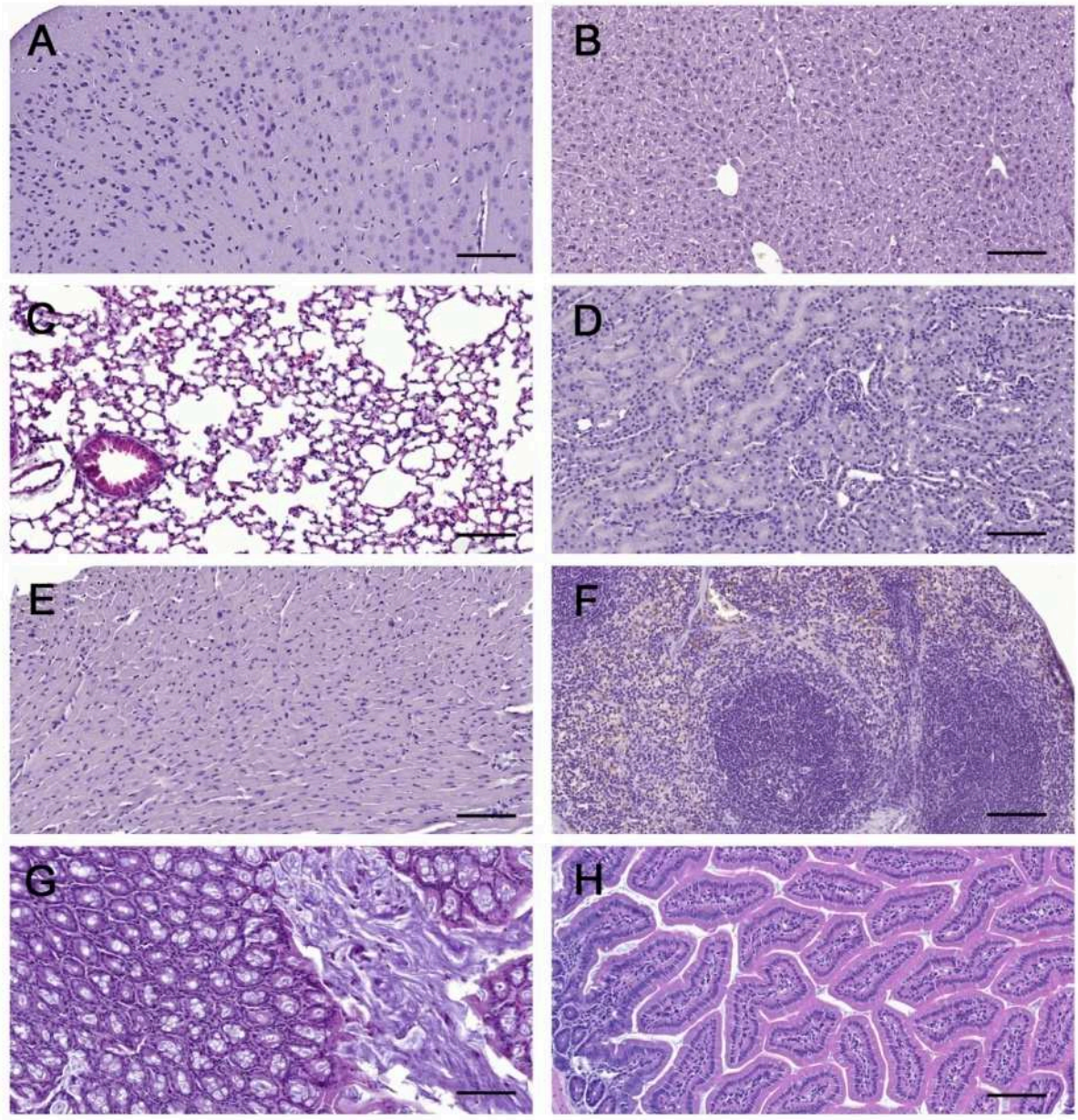

Abb. 27: Histologische Untersuchung (HE-Färbung) von Gehirn (A), Leber (B), Lunge (C), Niere (D), Herz (E), Milz (F), Magen (G) und Jejunum (H) der mit Johanniskrautextrakt behandelten AD-Mäusen zum Zeitpunkt 100 d.

4.3 Zusammenfassung

Während die Plaques der mit dem Hopfen 1-Extrakt therapierten Mäusen bis Tag 100 lediglich eine sinkende Dichte sowie Größe aufweisen, ist bei Tieren, die mit dem Wasserextrakt Hopfen 2 therapiert wurden, zusätzlich zu kleineren und dichteverminderten Plaques zum Zeitpunkt 75 Tage auch eine geringere Anzahl an Plaques zu verzeichnen. Bei beiden Gruppen gibt es signifikant mehr Plaques als bei der Kontrollgruppe mit einer Mikrogliabedeckung > 50%, sowie einen signifikanten Anstieg der Expression der α-

Sekretase, während die β-Sekretasekonzentration nur in der Hopfen 2-Gruppe gleich bzw. geringer ist als die der jeweiligen Kontrollgruppe.

Bei mit Johanniskrautextrakt therapierten Tieren steigt die α-Sekretasekonzentration und sinkt die β-Sekretase, dennoch fällt nur die Carbonat-lösliche Fraktion der Aβ42-Konzentration ab, während die Konzentration der GuanidinHCl-Fraktion im Vergleich zur Kontrollgruppe höher ist. Insgesamt sind weniger und kleinere Plaques in der Johanniskrautgruppe zu verzeichnen, die Anzahl der großen Plaques (A > 700 µm²) ist am 75. Tag stark reduziert und die mikrogliale Antwort ist ähnlich stark wie die der Hopfen 2-Gruppe.

Mit der Kurzzeit-Behandlung konnte insbesondere in der Baldriangruppe eine signifikante Reduktion der Plaquegröße und -dichte im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe erreicht werden. So ist die Anzahl großer Plaques (A > 700 µm²) im Alter von 75 Tagen auf ein Minimum reduziert, und auch nach 100 Tagen gibt es im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger große Plaques. Der Anteil an kleinen Plaques (A ≤ 400 μm^2) ist hingegen signifikant höher als derjenige der Kontrollgruppe. Die Ursache könnte in einer starken mikroglialen Antwort liegen, die sich durch eine signifikant erhöhte Mikrogliafläche und einer signifikant gesteigerten Plaquebedeckung durch Mikroglia in der Baldriangruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigt. Zusätzlich kommt es in der Baldriangruppe zu einer Expressionssteigerung der α-Sekretase, die keine Aβ-Pepide generiert, sowie zu einer verringerten Expression der β-Sekretase, die toxische Aβ-Peptide entstehen lässt.

4.4 Phytotherapie mit Baldrian über ausgewählte Zeitpunkte zwischen 35 und 160 Tagen (Langzeit-Experiment)

Aufgrund der Ergebnisse im Kurzzeit-Experiment wurde ein Langzeit-Experiment mit Baldrianextrakt angeschlossen. Hierbei wurden Tiere im Intervall von jeweils 25 Tagen bis 200 Tagen untersucht. Pro Gruppe wurden fünf Tiere therapiert: Sie erhielten täglich ab dem 40. Lebenstag gewichtsadaptiert eine Dosis von 30 mg/20g Maus.

4.4.1 Bestimmung der Aβ42-Konzentration mittels ELISA

Zum Zeitpunkt 75 d ist die Höhe der Guanidin-löslichen Fraktion des Aβ42-Gehalts vergleichbar zur Kontrollgruppe, am Tag 100 signifikant höher und nach 125 Tagen signifikant niedriger. Im weiteren Verlauf steigt die Guanidin-Fraktion bei der Baldriangruppe kontinuierlich und langsam parallel zur Kontrollgruppe an. Zum letzten Zeitpunkt am Tag 200 findet sich in der Baldriangruppe jedoch ein signifikanter Anstieg der Aβ42-Konzentration auf Werte über 3000 ng/mg Gesamtprotein, das ca. 3-fache der Kontrollgruppe (**Abb. 28**).

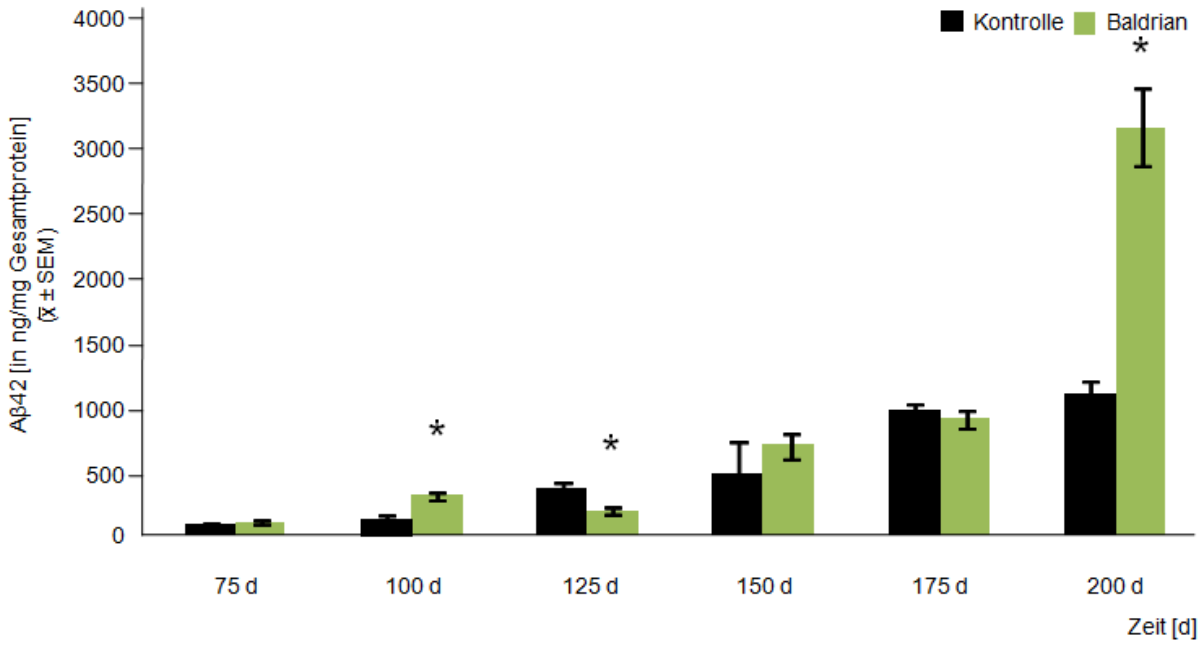

Abb. 28: Höhe der Guanidin-löslichen Fraktion von Aβ42 bei mit Baldrian behandelten AD-Mäusen (Zeitpunkte 75 d, 100 d und 175 d n=4, Zeitpunkte 125 d, 150 d und 200 d n=5) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Tag 75 n=10, Tag 100 n=11, Tag 125 n=8, Tag 150 n=3, Tag 175 n=4, Tag 200 n=5). * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

Betrachtet man die Carbonat-lösliche Fraktion, so zeigt sich im gesamten Beobachtungszeitraum in der Baldriangruppe ein zur Kontrollgruppe ähnliches Bild mit kontinuierlich ansteigendem Kurvenverlauf. Zum Zeitpunkt 75 Tage ist ein signifikant geringerer Anteil an Carbonat-löslichen Fraktion bei den mit Baldrian behandelten Tieren zu verzeichnen. Im weiteren Verlauf steigen die Werte beider Gruppen. Erst zu den späten Zeitpunkten (175 und 200 Tage) zeigt sich wieder ein geringer Abfall der Carbonat-löslichen Fraktion der mit Baldrian therapierten Mäusen (**Abb. 29**).

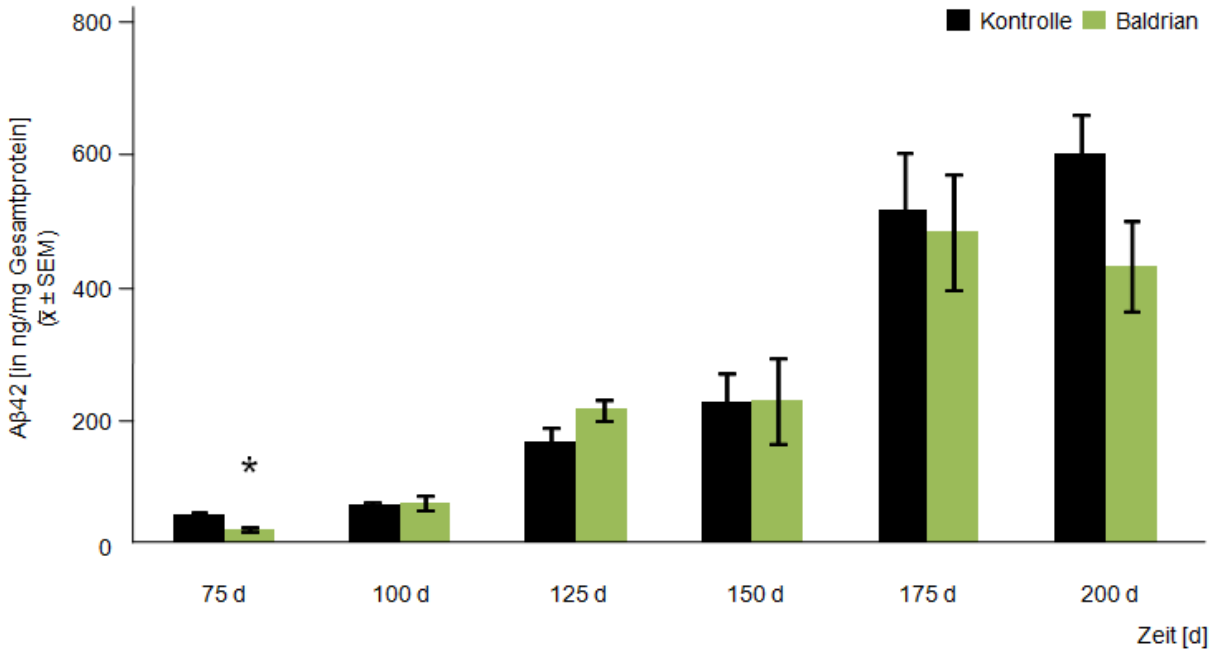

Abb. 29: Carbonat-lösliche Fraktion von Aß42 bei mit Baldrianextrakt behandelten AD-Mäusen (Zeitpunkte 75 d, 100 d und 175 d n=4, Zeitpunkte 125 d, 150 d und 200 d n=5) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Zeitpunkte 75 d und 100 d n=10, 125 d n=8, 150 d n=3, 175 d n=4, 200 d n=5). * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.4.2 Bestimmung der Plaqueanzahl

Die Plaqueanzahl steigt bei der Baldriangruppe zwischen den Tagen 75 und 100 von 76 Plaques auf 169 an, sinkt bis Tag 125 im Vergleich zur Kontrollgruppe um 50% signifikant ab, nimmt dann auf durchschnittlich 346 Plaques pro 10 mm² am Tag 175 zu und stabilisiert sich bis Tag 200 bei 341 Plaques. Sie bleibt so mit 42% weniger Plaques signifikant unterhalb der Vergleichsgruppe mit 580 Plaques pro 10 mm² Kortexfläche. Damit sind zu allen Zeitpunkten die Plaquezahlen bei den mit Baldrian therapierten Mäusen niedriger als in der jeweiligen Kontrollgruppe (**Abb. 30**).

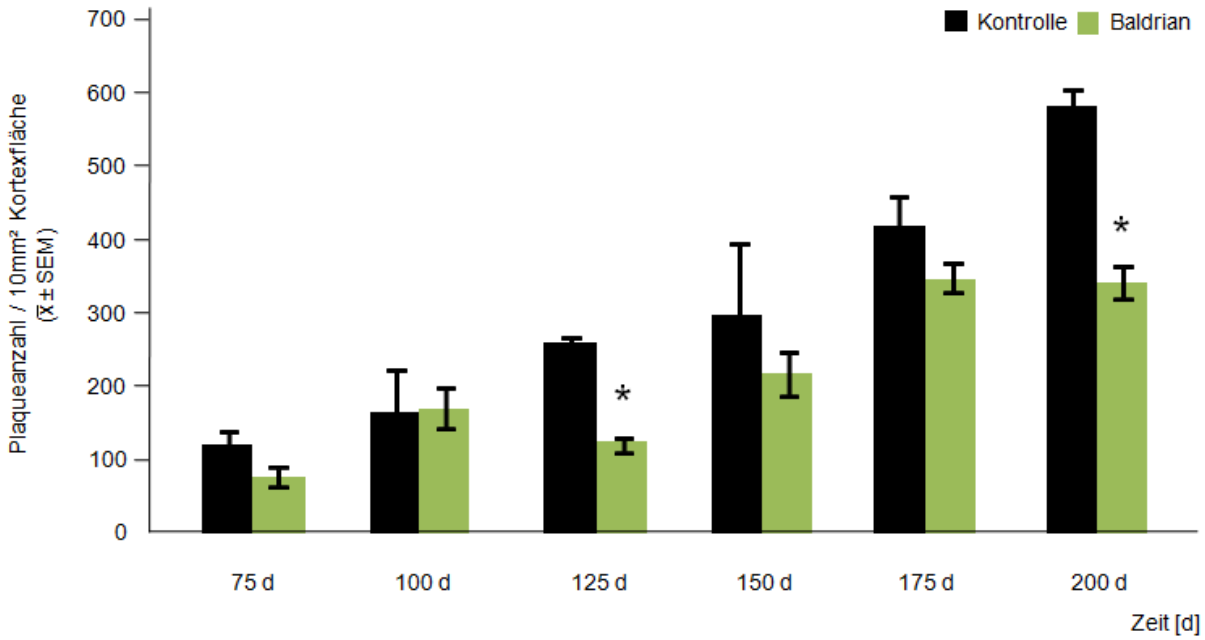

Abb. 30: Plaqueanzahl der mit Baldrian behandelten AD-Mäuse (Zeitpunkte 75 d, 100 d und 175 d n=4, Zeitpunkte 125 d, 150 d und 200 d n=5) im Vergleich zur Kontrollgruppe (75 d n=13, 100 d n=4, 125 d n=3,150 d n=8, 175 d n=4, 200 d n=5). * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

4.4.3 Bestimmung der Plaquedichte

Während die Plaquedichte bei den mit Baldrian therapierten Tieren zu den Zeitpunkten 75 und 100 Tage noch signifikant geringer als die der Kontrolltiere ist, ist sie zum Zeitpunkt 125 d nahezu gleich. Bis Tag 150 sinkt die Plaquedichte der Baldriangruppe verglichen zur Kontrollgruppe signifikant ab, gleicht sich der Kontrollgruppe zu den späten Zeitpunkten (175 und 200 d) aber wieder an (**Abb. 31**).

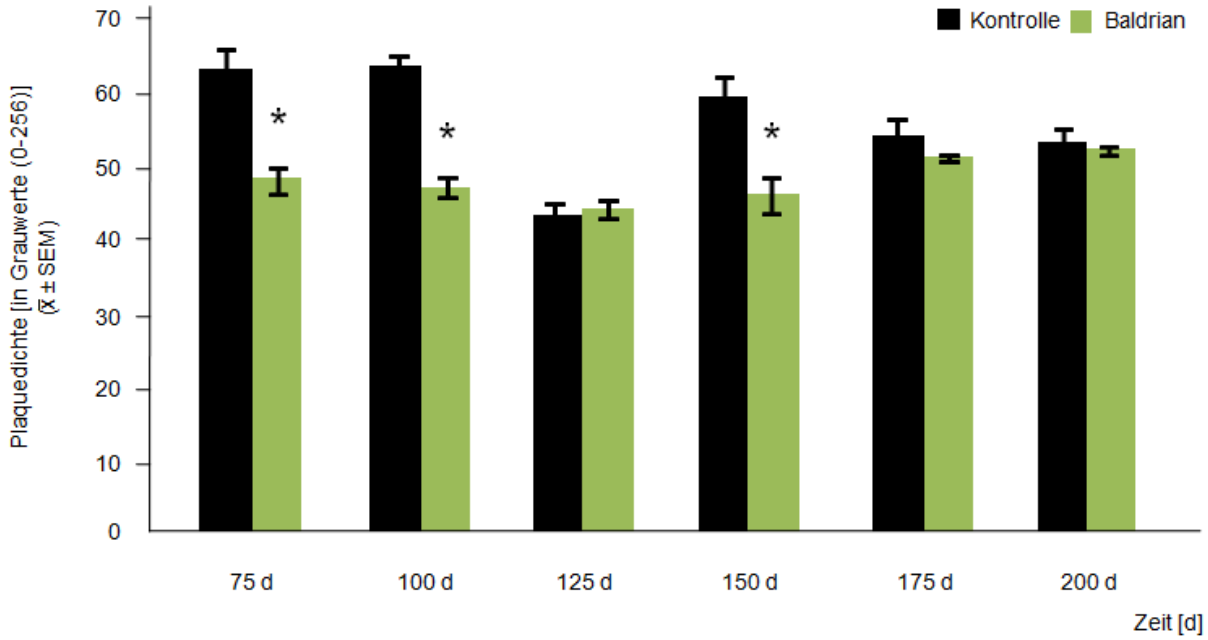

Abb. 31: Plaquedichte der Baldrian behandelten AD-Mäuse (Zeitpunkte 75 d, 100 d und 175 d n=4, Zeitpunkte 125 d, 150 d und 200 d n=5) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tag 75 n=13, Tag 100 n=4, Tag 125 n=3, Tag 150 n=8, Tag 175 n=4, Tag 200 n=5). * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.4.4 Bestimmung der Plaquegröße

Die Plaquegröße steigen über die gesamte Zeitspanne in der Baldriangruppe kontinuierlich auf insgesamt 524 µm² am Tag 200 an, die Größe bleibt jedoch stets signifikant unter derjenigen der Kontrollgruppe (**Abb. 32**).

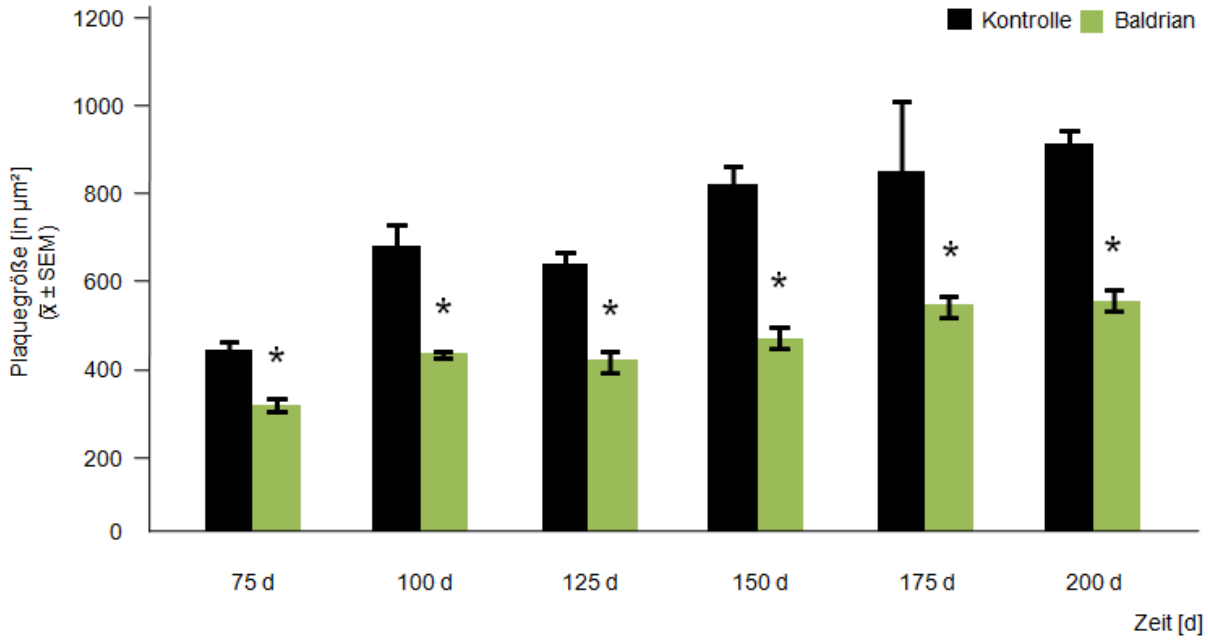

Abb. 32: Plaquegröße der mit Baldrian behandelten AD-Mäuse (Zeitpunkte 75 d, 100 d und 175 d n=4, Zeitpunkte 125 d, 150 d und 200 d n=5) im Vergleich zur Kontrollgruppe (75 d n=13, 100 d n=4, 125 d n=3, 150 d n=8, 175 d n=4, 200 d n=5). * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.4.5 Charakterisierung der Plaquegröße

Zum Zeitpunkt 75 d ist die Zahl der mittelgroßen (400 µm² < A ≤ 700 µm²) als auch die der großen (A > 700 µm²) Plaques in der mit Baldrian behandelten Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant geringer. Große Plaques existieren nahezu nicht. Zum Zeitpunkt 200 d hingegen sind verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant mehr kleine (A ≤ 400 µm²) und weniger große Plaques vorhanden. Vergleicht man die behandelten Tiere zu beiden Zeitpunkten miteinander, so ergibt sich bei allen drei Plaquegrößen ein signifikanter Unterschied (p≤0,05) (**Abb. 33**).

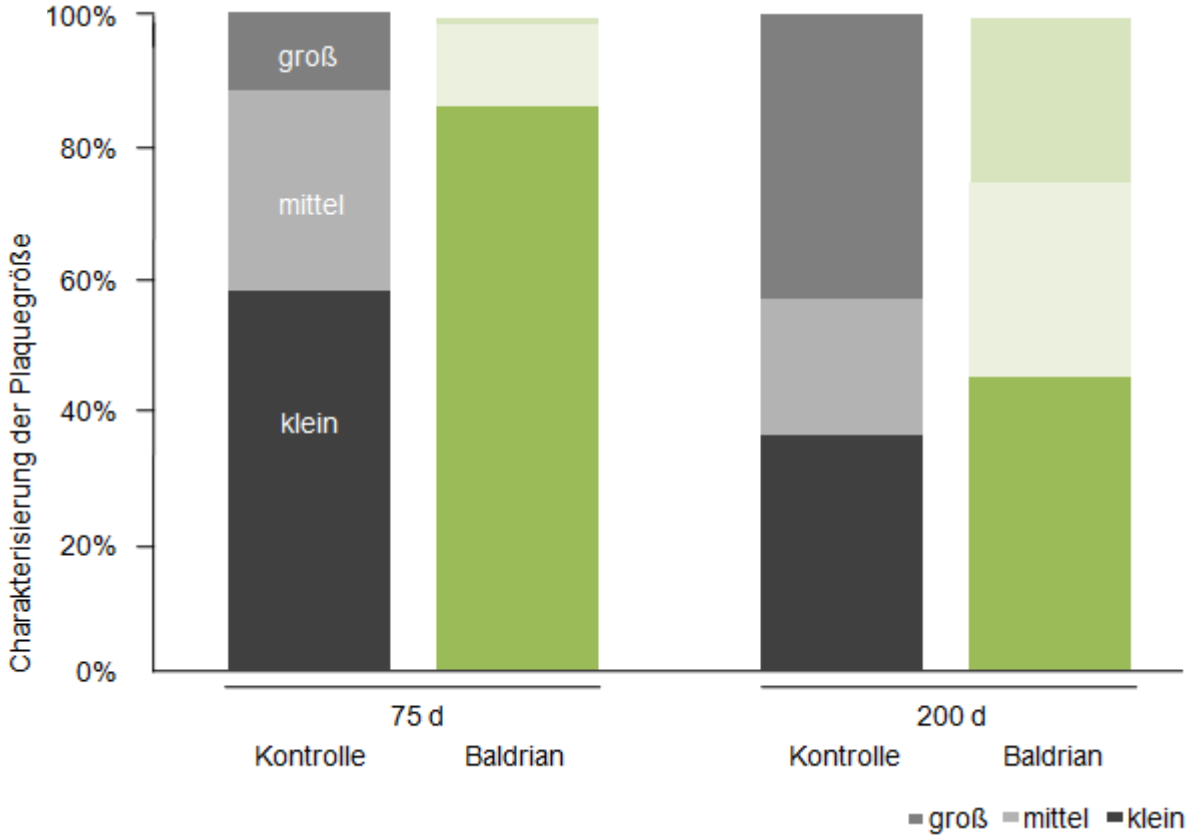

Abb. 33: Plaquegröße der mit Baldrian behandelten AD-Mäuse (Tag 75 n=4, Tag 200 n=5) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tag 75 n=24, Tag 200 n=19).

Im gesamten Zeitverlauf weist die Baldriangruppe eine höhere Anzahl an kleinen Plaques (A ≤ 400 µm²) und weniger große Plaques (A > 700 µm²) auf (**Abb. 34**).

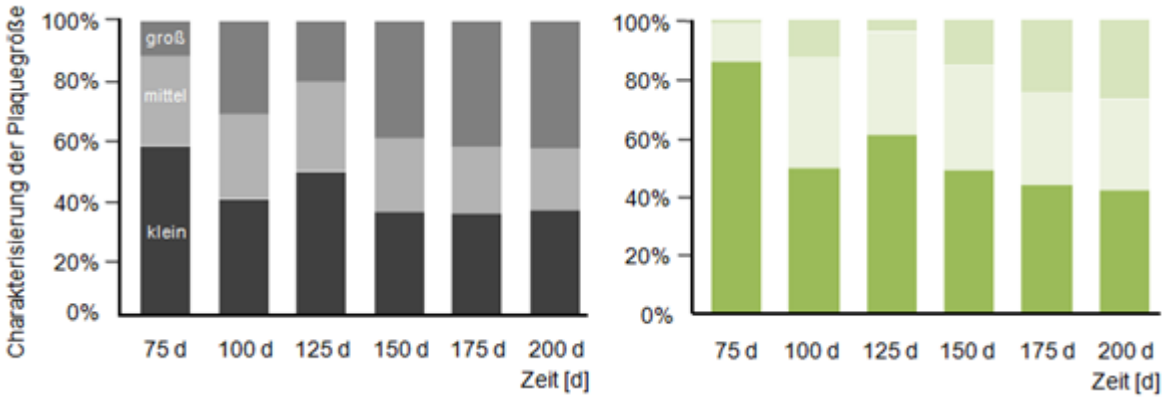

Abb. 34: Plaquegröße der mit Baldrian therapierten Tiere (rechter Teil des Schaubildes; 75 d n=4, 100 d n=4, 125 d n=5, 150 d n=5, 175 d n=4, 200 d n=5) im Vergleich zur Kontrolle (links dargestellt; 75 d n=24, 100 d n=21, 125 d n=20, 150 d n=19, 175 d n=16, 200 d n=19).

4.4.6 Bestimmung der prozentualen Plaquebedeckung

Die Plaquebedeckung der Baldriangruppe ist im Vergleich zur auf 100% gesetzten Kontrollgruppe während der gesamten Zeitspanne geringer. Insgesamt schwankt der Anteil der Bedeckung jedoch stark. Sind zum Zeitpunkt 75 d fast 60% der Kortexfläche der therapierten Tiere weniger mit Plaques bedeckt, so sinkt dieser Anteil bis zum Tag 100 ab. Bis zum Zeitpunkt 125 d erhöht sich der Plaque-freie Anteil um ca. 70% und steigt danach wieder auf durchschnittlich ca. 50% im Vergleich zur Kontrolle an (**Abb. 35**).

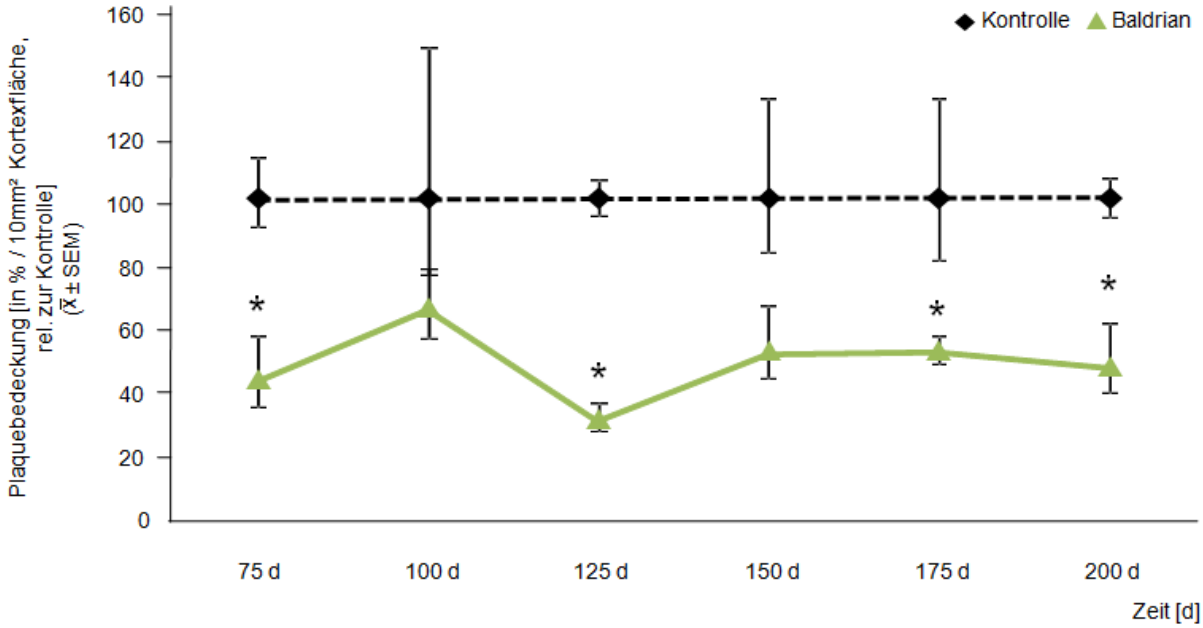

Abb. 35: Prozentuale Plaquebedeckung der Kortexfläche der mit Baldrian behandelten AD-Mäusen (Zeitpunkte 75 d, 100 d und 175 d n=4, Zeitpunkte 125 d, 150 d und 200 d n=5) im Vergleich zur Kontrolle (75 d n=13, 100 d n=4, 125 d n=3, 150 d n=8, 175 d n=4, 200 d n=5). * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.4.7 Bestimmung der durch Mikroglia bedeckten Kortexfläche

Bei Betrachtung der Mikrogliafläche pro Kortexareal in den mit Baldrian therapierten Mäusen, zeigt sich ein kontinuierlicher, starker Anstieg ab Tag 75. Die Flächen liegen stets über der der Kontrollgruppe. Die mikrogliale Antwort auf die Plaqueentwicklung ist bei den therapierten Tieren damit während der gesamten Zeit stärker ausgeprägt als bei den nicht behandelten Mäusen (**Abb. 36**).

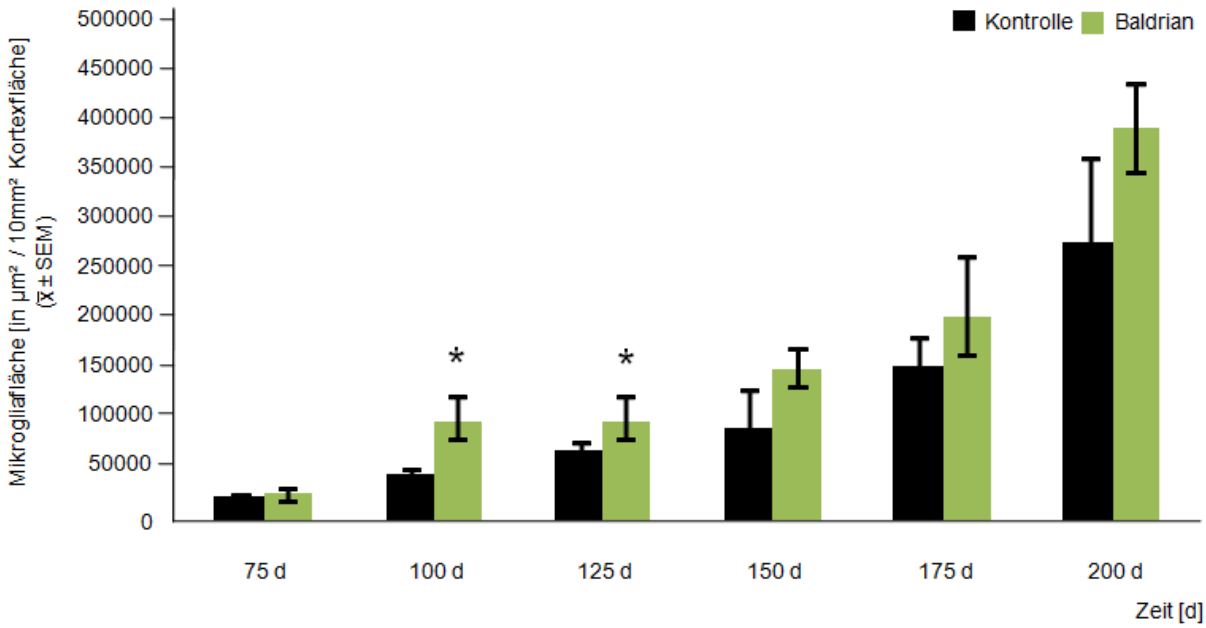

Abb. 36: Mikrogliafläche/10 mm² Kortexfläche der mit Baldrian therapierten Tiere (in jeder Gruppe n=3) im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe (75 d n=10, 100 d n=6, 125 d n=8, 150 d n=5, 175 d n=9, 200 d n=5). * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

Die Bestimmung der Plaqueanzahl mit wenigstens 50% Mikrogliabedeckung ergibt bei dem Baldrian-Langzeit-Experiment bereits zum Zeitpunkt 75 d einen signifikanten höheren Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bis zum Tag 100 nimmt der Anteil ab, steigt dann wieder an und erreicht ab Tag 150 ein Plateau (**Abb. 37**).

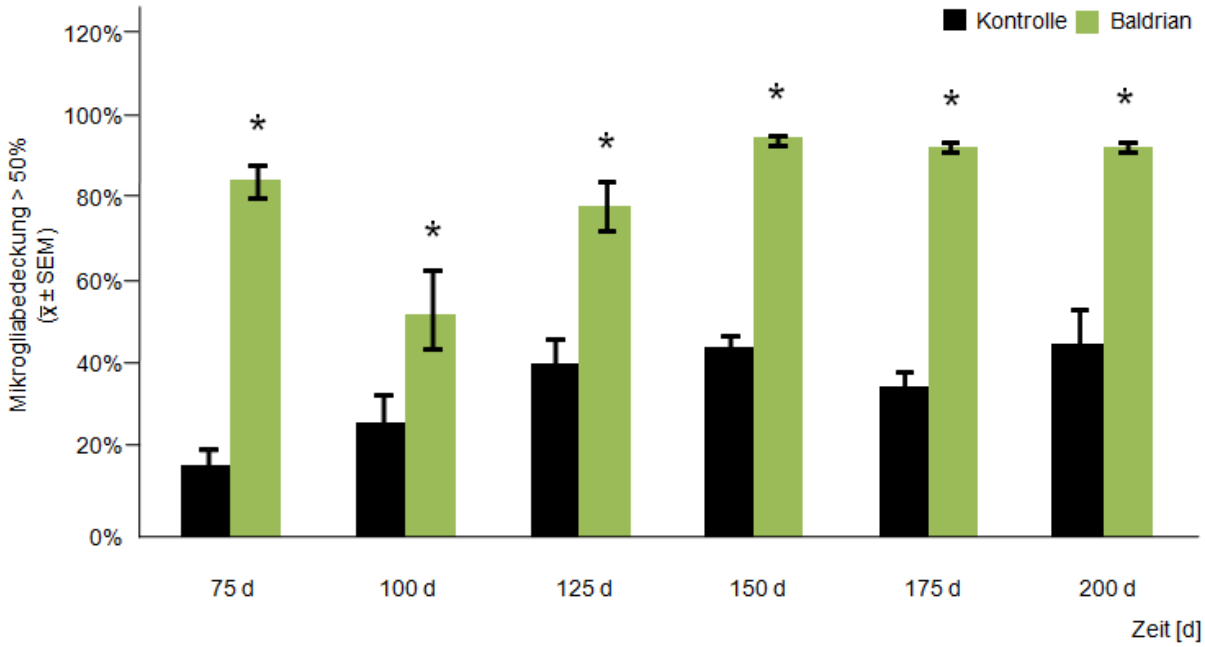

Abb. 37: Plaqueanzahl mit wenigstens 50% Mikrogliabedeckung bei mit Baldrianextrakt behandelten AD-Mäusen (in jeder Gruppen n=3) im Vergleich zur Kontrollgruppe (75 d n=10, 100 d n=7, 125 d n=8, 150 d n=5, 175 d n=9, 200 d n=6). * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

4.4.8 Prozentuale Bestimmung der Sekretasen mittels Western Blot

Im Langzeit-Experiment variiert die α-Sekretaseexpression in der Baldriangruppe über den Zeitraum von 75 Tagen bis 200 Tagen erheblich (**Abb. 38**). Bereits zum Zeitpunkt 75 d liegt sie oberhalb der Kontrollgruppe (die Kontrollgruppe wurde jeweils pro Zeitpunkt auf 100% gesetzt) und steigt im folgenden Zeitraum signifikant auf 372% am Tag 100. Am Tag 125 ist sie stark auf 43% abgefallen und liegt signifikant unter derjenigen der Kontrolltiere. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem erneuten Anstieg und nach 175 d wird ein Maximalwert von 850% erreicht. Zum Zeitpunkt 200 d ist die α-Sekretaseexpression wieder stark gefallen.

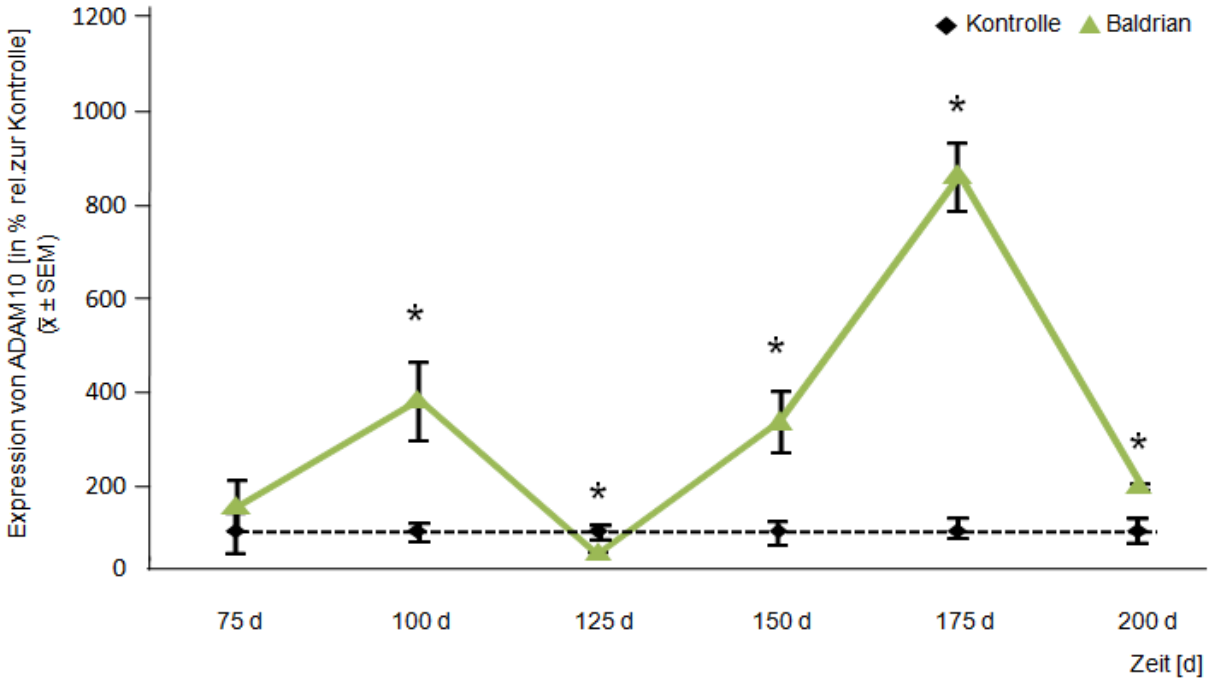

Abb. 38: Expression der α-Sekretase bei mit Baldrianextrakt behandelten AD-Mäusen (in jeder Gruppe n=3) im Vergleich zur Kontrolle (n=3). Die Kontrolle (gestrichelte Linie) wurde pro Zeitraum auf 100% gesetzt. * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

Die β-Sekretaseexpression ist bei den behandelten Mäusen im Vergleich zur nicht therapierten Kontrollgruppe an den Tagen 75 und 100 niedriger (**Abb. 39**). Sie steigt dann an und erreicht nach 175 d einen Maximalwert (406% des Kontrollwertes). Zum Zeitpunkt 200 d wird wieder das Niveau der Kontrollgruppe erreicht.

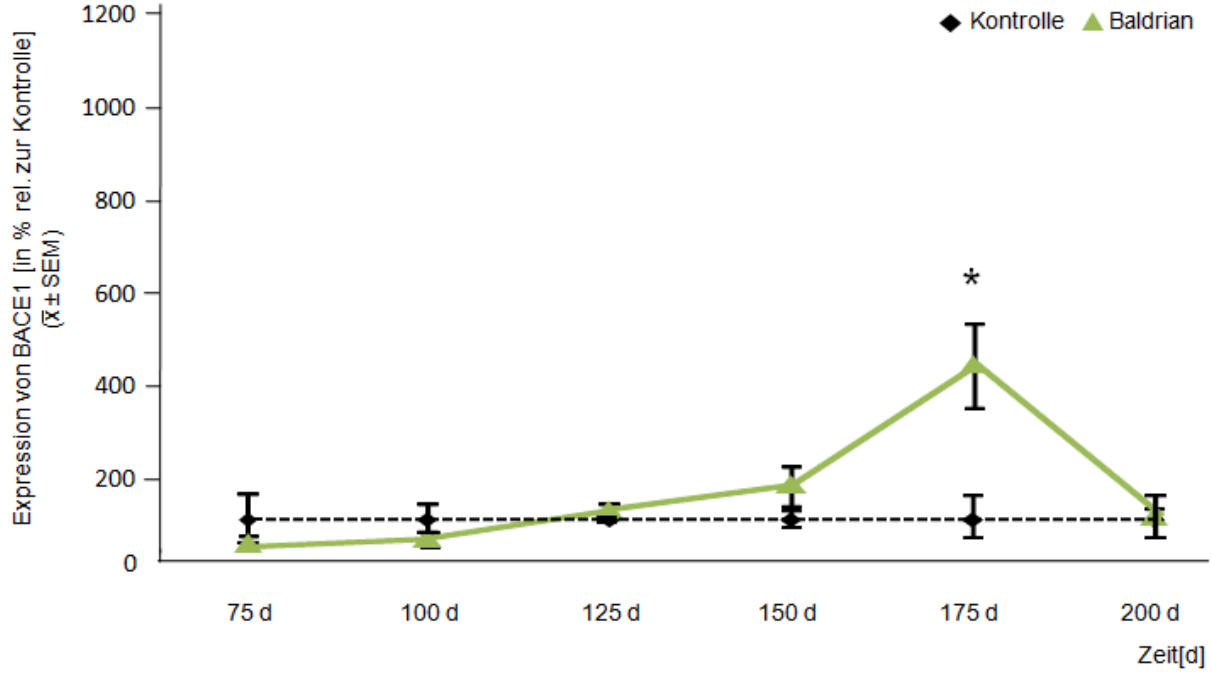

Abb. 39: Expression der ß-Sekretase der mit Baldrianextrakt behandelten AD-Mäuse (in jeder Gruppe n=3) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=3). Die Kontrollgruppe (gestrichelte Linie) wurde pro Zeitpunkt auf 100% gesetzt. * p≤0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

4.5 Morphologische- und Toxizitätsanalyse

In bisher unveröffentlichten Untersuchungen unseres Labors mit der o.g. Dosierung sind bis zum 200. Lebenstag keine Nebenwirkungen aufgetreten, so dass in dieser Arbeit auf weitere Untersuchungen verzichtet wurde.

4.6 Zusammenfassung

Die Proteinexpression der α-Sekretase in der Baldriangruppe ist signifikant stärker (Ausnahme Zeitpunkt 125 d) als die der Kontrollgruppe, was auf eine verstärkte Prozessierung nicht-toxischer Aβ-Peptide deutet. Die Expression der β-Sekretase und Plaqueanzahl hingegen steigen lediglich langsam an. Auch Plaquedichte und -größe sind im Vergleich zu den nicht therapierten Kontrolltieren signifikant verringert. Große Plaques mit einer Fläche von 700 μm^2 und mehr entwickeln sich im Gegensatz zu denen der Kontrollgruppe erst langsam ab einem Alter von 100 Tagen. Die mikrogliale Antwort ist im gesamten Zeitraum verstärkt, wobei ein großer Teil der Plaques mit mehr als 50% Mikroglia bedeckt ist. Demnach profitieren die mit dem Baldrianextrakt behandelten Tiere von dieser Therapie.

5. Diskussion

Ein steigender Aβ42/Aβ40-Quotient im Plasma [141] oder aber das Vorkommen von Aβ42 und Tau-Protein im Liquor [142] werden beim Menschen als mögliche Biomarker für eine Frühdiagnose der AD diskutiert. Da der *in vivo* Nachweis von zerebralen Amyloid-Ablagerungen am lebenden Menschen nicht möglich ist, sind Tiermodelle zur Erforschung der molekularen Mechanismen unerlässlich. Hierbei sind speziell das APP und seine Spaltprodukte, welche beim Menschen an der Pathogenese beteiligt sind, wichtig.

Ziel der vorliegenden *in vivo* Untersuchung war die Evaluation des Einflusses einer mehrwöchigen Behandlung mit Extrakten aus Hopfenzapfen, Johanniskraut oder Baldrianwurzel auf die Entwicklung der Amyloid-Ablagerungen im APPPS1-Mausmodell der AD im Vergleich zum Spontanverlauf. Vorrangige Untersuchungsziele waren die Einflüsse einer täglichen Applikation der Extrakte über einen Zeitraum von 35 bis 160 Tagen auf die Amyloidkonzentration, die Plaqueanzahl und -größe und die Sekretasenkonzentration. Hierzu wurden Mäuse der Altersstufen 75, 100, 125, 150, 175 und 200 Tage untersucht. Zudem wurde die Verträglichkeit der Therapie mit Baldrianwurzelextrakt geprüft.

5.1 Erforschung von Morbus Alzheimer in Tiermodellen

Die *in vivo* Untersuchungen wurden an einen Mausmodell für AD mit Mutationen im APP-Gen (KM670/671NL, sog. schwedische Doppelmutation) und im PS1-Gen (L166P) durchgeführt [137]. Der Vorteil dieses Mausmodells liegt darin, dass pathologische Veränderungen bereits ab dem 50. Lebenstag auftreten. Im Vergleich dazu exprimiert das von Sturchler-Pierrat 1997 erstmalig beschriebene Mausmodell APP23 humanes APP751 mit der o.g. schwedischen Doppelmutation sowie einer V717I Mutation. Dadurch beginnt die als diffus beschriebene Amyloid-Ablagerung jedoch erst im Alter von 18 Monaten. Auch in einem weiteren Modell, welches lediglich die schwedische Doppelmutation aufweist, treten amyloide Plaques auf. Hier zeigen sich außerdem ein mit dem Aβ-Anstieg korrelierender Neuronenverlust im Hippocampus und eine Angiopathie, wie sie auch bei der AD auftritt. Nachteilig ist allerdings, dass bei den transgenen Mäusen erst im Alter von sechs Monaten Ablagerungen auftreten [143], [144].

5.2 Phytopharmaka für neue Ansätze in der Alzheimer-Therapie

Eine erfolgreiche Behandlung der Ursache der AD ist bisher nicht bekannt. Zugelassene medikamentöse Therapien mit chemisch definierten Substanzen wie

Acetylcholinesteraseinhibitoren und Memantin zielen auf eine symptomatische Beeinflussung der Neurotransmission [145]. Damit werden zwar die klinischen Symptome, die Folgen der Plaque- und Tangle-Bildung sind, reduziert, eine kausale Therapie stellen diese Substanzen jedoch nicht dar. Immunologische Studien mit passiver als auch aktiver Impfung gegen Aß zeigten bisher keine überzeugenden klinischen Effekte, die AN1792-Studie musste wegen unerwünschter Arzneimittelwirkungen abgebrochen werden [146]. Therapieansätze mit dem Ziel der Prävention einer Plaquebildung existieren noch nicht. Die Suche danach ist gegenwärtig Gegenstand intensiver Forschung.

Pflanzliche Extrakte haben hier offenbar ein vielversprechendes Potential. Für den Ginkgo Biloba-Spezialextrakt EGb 761 konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass die Progression von Demenzen, auch von AD, verzögert [95] und die geistige Leistungsfähigkeit verbessert wird [92]. Aufgrund der langen Zeitspanne zwischen ersten Veränderungen im Gehirn und klinischer Manifestation der Krankheit sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich, um die genauen Effekte des Ginkgo-Extraktes zu entschlüsseln. Kurkuma und Grüntee haben eine positive Wirkung auf die α-Sekretase [97] und führen zu einer Reduktion der Aβ-Konzentration im Hirngewebe [147]. Pflanzliche Extrakte könnten somit Potential bei der Prävention und Therapie von Demenzen haben.

Im Hinblick auf Aktivierungseigenschaften und Präventionspotential für die AD wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit vier pflanzliche Extrakte untersucht. Die transgenen AD-Mäuse wurden ab dem 40. Lebenstag einmal täglich mit Extrakten aus *Humulus lupulus* (Hopfen) oder *Valeriana officinalis* (Baldrian), die für Schlafstörungen und Unruhezuständen zugelassen sind [148], [149] bzw. einem Extrakt aus *Hypericum perforatum* (Johanniskraut), das für die Behandlung von leichtgradigen bis mittelschweren depressiven Episoden zugelassen ist, behandelt [150], [151] Anschließend wurde die Plaquebildung im Gehirn zu verschiedenen Zeitpunkten mit molekularbiologischen und immunhistochemischen Methoden analysiert.

5.2.1 Auswirkungen auf die Aβ42-Konzentration

Die Pathogenese der AD beruht auf der Störung der Homeostase von Aß im Gehirn. Aß wird normalerweise in großen Mengen im Gehirn produziert und mit der gleichen Geschwindigkeit wieder abgebaut. Eine Abnahme bei der Clearance führt deshalb zur Akkumulation von löslichem Aß und in der Folge zur Bildung der Amyloidplaques (fibrilläre unlösliche Form).
In der jetzigen Arbeit wurden die Anteile der Carbonat- und der GuanidinHCl-löslichen Aβ42-Fraktion mittels ELISA bestimmt. Der Carbonat-lösliche Anteil besteht aus Mono- und Oligomeren des Aβ42. Die Oligomere sind neurotoxisch, repräsentieren nach

gegenwärtigem Kenntnisstand das Initialstadium der AD und sind für kognitive Defizite verantwortlich. Die GuanidinHCl-lösliche Fraktion besteht aus den unlöslichen Plaques, die aus der Aggregation der Mono- und Oligomere entstehen [65], [70], [72].

Teotico et al. fanden bei Untersuchungen an primären humanen Leberzellen, dass ein ethanolischer Hopfenextrakt unbekannter Zusammensetzung, aber auch darin enthaltene β-Bittersäure Colupulon, den humanen PXR konzentrationsabhängig aktiviert. Dadurch wird die Transkription der mRNA der Cytochrome CYP3A4, CYP2B6 und des Transporters Multi Drug Resistance 1 (MDR1) oder P-GP erhöht [152]. Im Vergleich zu Johanniskrautextrakt, dessen Inhaltsstoff Hyperforin für diesen Effekt, der im nanomolaren Bereich liegt, hauptsächlich verantwortlich sein dürfte, ist die Wirkung von Hopfenextrakt im mikromolaren Bereich angesiedelt. Vermutlich trägt die im Hopfenextrakt enthaltene ß-Bittersäure Colupulon wesentlich zu diesem Effekt bei [152], [153], [154]. Colupulon induziert auch die hepatische CYP3A-Genexpression bei Mäusen *in vivo*. Allerdings waren am Gesamteffekt auch andere Bestandteile des Futters beteiligt, und es ist zudem nichts über den Langzeiteffekt bekannt [155]. Der Hopfeninhaltsstoff Xanthohumol wurde Mäusen mit einer Tagesdosis von ca. 1000 mg/kg KG für drei Wochen verabreicht. Die CYP3A11 mRNA hatte um ca. 30% abgenommen, histologische Veränderungen oder Verhaltensauffälligkeiten ergaben sich nicht [156].

Zusätzlich wurde an humanen Zellkulturen gezeigt, dass nicht näher charakterisierter ethanolischer Hopfen- bzw. Johanniskrautextrakt die Genexpression von P-GP steigert [153]. P-GP kommt u.a. auch in Zellen der Kapillaren der Blut-Hirn-Schranke vor und agiert dort als Aβ-Efflux-Pumpe [157].

Damit war im jetzigen Versuch eine Reduktion der intrazerebralen Aβ42-Konzentration bei den mit den beiden Hopfenextrakten behandelten Tieren zu erwarten. Dieser postulierte Mechanismus wird durch die vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht bestätigt. Im Alter von 75 Tagen ist bei den mit Hopfen 1-Extrakt behandelten Tieren in beiden Fraktion kein Unterschied zu den Kontrollen nachweisbar. Zum Zeitpunkt 100 Tage ist die Carbonat-lösliche Fraktion signifikant höher im Vergleich zu den Kontrolltieren und auf >100 ng Aβ42/mg Gesamtprotein angestiegen. Bei mit Hopfen 2-Extrakt behandelten Mäusen ist im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl die Carbonat- als auch die GuanidinHCl-lösliche Aβ42-Fraktion im Vergleich zur Kontrolle deutlich bis signifikant angestiegen (**Abb. 12, 13**).

Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse ist die Abnahme der Konzentration der lipidlöslichen Hopfenbittersäuren in den beiden Extrakten infolge Autoxidation während des 11-monatigen Untersuchungszeitraumes, denn bei einer Lagerung über 6 Monate werden 30% des Gesamtgehaltes an Bittersäuren oxidiert [116]. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Inhaltstoffe des Hopfenextraktes nur über einen sehr kurzen Zeitraum während des Versuchs die Genexpression von P-GP fördern. Auch könnte die gewählte Dosis von 150

mg/kg KG Hopfenextrakt eventuell zu niedrig sein, um zu gewährleisten, dass nach Resorption und hepatischer Metabolisierung eine ausreichende Konzentration an der Blut-Hirn-Schranke erreicht wird, um einen sichtbaren Effekt auszulösen. Desweiteren ist Hopfenextrakt möglicherweise kein Aktivator des murinen, sondern nur des humanen PXR. Zumindest für Johanniskraut wurde diese Diskrepanz beschrieben [158], [159]. Die Unterschiede zwischen Hopfenextrakt 1 und 2 weisen zudem darauf hin, dass sich der wässrige Extrakt weit ungünstiger auf die Entwicklung der Carbonat- und GuanidinHCl-Fraktion auswirkt als der Auszug mit 80% Ethanol und die anderen beiden getesteten Extrakte. Dies ist als Hinweis zu werten, dass wasserlösliche Inhaltsstoffe des Hopfens besonders ungünstige Effekte auf den PXR haben könnten, was z. B. im Zusammenhang mit dem weit verbreiteten Bierkonsum (Hopfenanteil im Bier) weiter untersucht werden könnte.

Die orale Gabe von 1000 bzw. 1250 mg/kg KG Johanniskrautextrakt über 5 Tage beeinflusste bei gesunden Mäusen die zerebrale CYP3A4- und P-GP-Expression nicht [160], weil Johanniskraut bzw. der Inhaltsstoff Hyperforin zwar den humanen PXR, nicht aber den murinen aktivieren [158]. Bauer et al. zeigten jedoch an einem transgenen hPXR-Mausmodell, das einen humanen PXR exprimierte, dass die Expression von P-GP sowie dessen Aktivität bei Kontakt der Gehirnkapillaren mit Hyperforin (1 µM) *in vitro* signifikant anstieg [158]. Da aber in der jetzigen Untersuchung ein hyperforinarmer Extrakt verwendet wurde, wurden mit der aktuellen Studie nur andere mögliche Einflussfaktoren auf den PXR untersucht. Dazu ist eine Studie mit kultivierten Endothelzellen der Kapillaren des Schweinehirns und frisch isolierten Hirnkapillaren des Schweins von Interesse. Johanniskrautextrakt und die Inhaltsstoffe Hyperforin, Hypericin und Quercetin senkten die P-GP-Transporteraktivität dosis- und zeitabhängig, wobei der Extrakt und Hyperforin direkt inhibierend wirkten, während Hypericin und Quercetin die Transporterfunktion über einen Proteinkinase C-abhängigen Mechanismus modulierten [161]. In 12 Wochen alten, noch asymptomatischen, transgenen hAPP-Mäusen (humane APP-Überexpression), deren Gehirnkapillare nur eine reduzierte Menge an P-GP aufweisen, weshalb der zerebrale Aβ-Gehalt rasch ansteigt, konnte über eine Aktivierung des PXR durch eine 7-tägigen Therapie mit Pregnenolon-16α-Carbonitril (25 mg/kg i.p.), einem Aktivator des murinen PXR [158], ein Wiederanstieg der Expression der Aktivität des P-GP erzielt werden, wodurch die Elimination des Aβ erheblich zunahm [162]. In Analogie könnte die Aktivierung des humanen PXR durch Hyperforin den Efflux von Aβ-Peptiden positiv beeinflussen. Um diese Vermutung zu verifizieren, müssten Versuche mit Hypericum bzw. Hyperforin an einem transgenen Mausmodell mit humanem PXR unternommen werden.

Die Behandlung mit Johanniskrautextrakt (400 mg/kg KG) hat zum Zeitpunkt 75 Tage nur einen relativ geringen Einfluss auf die Carbonat-lösliche Fraktion und ist bei 100 Lebenstagen nicht mehr nachweisbar. Der GuanidinHCl-Anteil ist zu beiden Zeitpunkten

tendenziell höher als der bei der jeweiligen Kontrollgruppe. Offenbar befinden sich im Johanniskrautextrakt, wenn überhaupt, nur geringe Konzentrationen an Substanzen, die den murinen PXR modifizieren können.

Der Einfluss von Baldrianextrakt auf das CYP-System ist beim Menschen *in vivo* nur gering [163], für Mäuse liegen keine entsprechenden Untersuchungen vor. Mit einem Baldrianextrakt (1000 mg/kg KG oral) zeigte sich in einer Untersuchung bei gesunden Mäusen nach ca. 70 min ein leichter sedierender Effekt, nach 150 min wurde eine gesteigerte körperliche Aktivität festgestellt. Auch die Inhaltsstoffe Linarin und Apigenin wirkten aktivierend [164].

Damit können zumindest pharmakologische Effekte bei der im aktuellen Versuch gewählten Baldriandosieung (900 mg/kg KG) belegt werden. Bei der Baldriangruppe im aktuellen Versuch steigt die Guanidin-lösliche Fraktion bis Tag 100 an, sinkt bis zum 125. Tag signifikant ab, um im weiteren Verlauf dann wieder anzusteigen. Am Tag 200 erreicht sie das 2,5-fache der Aβ-Konzentration der Kontrollgruppe. Die Carbonat-lösliche Fraktion steigt bis zum 175. Tag kontinuierlich an und fällt anschließend bis Tag 200 ab (**Abb. 28, 29**). Wegen des vermutlich geringen Einflusses von Baldrianextrakt dürften für den beobachteten Effekt vordringlich andere Mechanismen verantwortlich sein.

5.2.2 Extrakteffekte auf Plaqueanzahl, -größe, -dichte und -bedeckung

Die Plaques bestehen aus dem unlöslichen Aggregat der Oligomere des Aß42. Die immunhistologischen Untersuchungen der Plaques zeigen, dass die mit den beiden Hopfenextrakten behandelten Mäuse zum Zeitpunkt 75 Tage von der Therapie profitieren. Dies gilt insbesondere für die mit dem wässrigen Extrakt Hopfen 2 behandelten Tiere, bei denen Plaquedichte und -größe geringer sind als bei den Kontrollen. Nach 100 Tagen hat zwar die Plaqueanzahl in beiden Gruppen signifikant zugenommen, Plaquedichte und -größe sind jedoch weiterhin geringer als in der APPPS1-Kontrollgruppe. In beiden Hopfengruppen existieren mehr Plaques mit einer Fläche < 400 µm². Während in der Hopfen 1-Gruppe nach 75 Tagen kein Unterschied zur Kontrolle nachweisbar ist, profitieren die Tiere, die mit dem Hopfen 2-Extrakt therapiert wurden bereits zu diesem Zeitpunkt von weniger Plaques, die größer als 700 µm² sind. Nach 100 d sind auch in der Hopfen 1-Gruppe weniger große Plaques (A > 700µm²) als in der Kontrollgruppe vorhanden (**Abb. 15, 16, 17, 18**). Diese Entwicklung könnte auf eine initiale Verlangsamung des irreversiblen Aggregationsprozesses von Aß42 hinweisen. Tatsächlich ist die neurotoxische lösliche Fraktion des Aß42 im Vergleich zur Kontrolle unter der Behandlung mit beiden Extrakten bei Tag 100 stark angestiegen. Dieser Effekt ist damit eher negativ zu bewerten. Vergleichbare Untersuchungen finden sich in der Literatur nicht.

Hypericum perforatum (Johanniskraut) ist eine Therapieoption bei milden bis moderaten Depressionen [150], [151]. Da Patienten mit einer milden AD auch gefährdet sind, Depressionen zu entwickeln, könnte man mit Johanniskraut womöglich beides therapieren [165]. Die vorliegenden immunhistologischen Ergebnisse zeigen, dass in der Hypericum-Gruppe die Anzahl der Plaques bereits zum Zeitpunkt 75 Tage signifikant niedriger ist als in der Kontrollgruppe und dass dies auch im weiteren Verlauf der Untersuchung so bleibt (**Abb. 15**). Die auftretenden Plaques haben eine vergleichsweise geringere Dichte und sind auch kleiner (**Abb. 16, 17**). Durchschnittlich gibt es 15% mehr kleine Plaques, mit einer Größe A ≤ 400 µm² und dementsprechend weniger mittelgroße und große Plaques als in der Kontrollgruppe (**Abb. 18**). Da der unlösliche Anteil der Aß42-Fraktion zu beiden Untersuchungszeitpunkten jedoch etwas höher ist als bei den Kontrolltieren und der Anteil der löslichen Fraktion nicht beeinflusst wurde, sind die Befunde kaum zu interpretieren. Eine partielle Hemmung der Aggregation ist möglich, aber vermutlich überlagern sich mehrere Phänomene wie z. B. auch ein gewisser Abbau von Plaques. In weiteren Untersuchungen könnten einzelne Bestandteile des Hypericumextrakts appliziert werden, um den Hintergrund der prinzipiell günstigen Wirkung weiter zu untersuchen. Vergleichbare Untersuchungen liegen in der Literatur nicht vor.

Bei den mit dem Baldrianextrakt behandelten Mäusen ergeben sich sehr günstige Veränderungen der gemessenen Parameter. Die Plaqueanzahl steigt zunächst zu den Zeitpunkten 75 und 100 Tage kontinuierlich an. Sie sinkt bis Tag 125 signifikant auf 50% verglichen zur Kontrollgruppe ab, um dann im weiteren Verlauf wieder anzusteigen. Sie erreicht ein Plateau (346 Plaques/10 mm² Kortexfläche) und ist am 175. Tag um 18%, am Tag 200 um 42% geringer als die der Kontrollgruppe (**Abb. 15, 30**). Die Plaquedichte steigt stetig, bleibt jedoch signifikant geringer als die der Kontrollgruppe (**Abb. 16, 31**). Im gesamten Zeitrahmen sind die Plaques signifikant kleiner als die der jeweiligen Kontrollgruppe (**Abb. 17, 32**); Plaques, die größer als 700 µm² sind, sind erst nach 100 Tagen vorhanden, was auf eine Verzögerung der Plaqueentwicklung im Sinne einer reduzierten Aggregation hindeutet, aber auch auf einen möglichen Plaqueabbau (**Abb. 18, 33, 34**). Diese Befunde stehen im Einklang zum Verhalten der Konzentrationen der beiden Aß42-Fraktionen. Vergleichbare Untersuchungen liegen in der Literatur nicht vor.

5.2.3 Auswirkungen der Phytotherapie auf die zerebrale Immunantwort

Wenn die Mikrogliazellen z. B. durch Entzündungsprozesse oder über bestimmte Vorgänge an der Blut-Hirn-Schranke aktiviert werden, generieren sie Entzündungsmediatoren wie Cytokine, Chemokine, Prostaglandine, Stickstoffmonoxid-Synthase in Makrophagen und

Mikrogliazellen (iNOS), Cyclooxygenase-2 (COX-2) und freie Radikale und stimulieren die Immunantwort [166], [167]. Infolgedessen können Komplikationen auftreten, die ihrerseits zu einer Exazerbation der Schädigung führen. Systemische Entzündungsprozesse wie z. B. Infektionen beeinflussen die Aktivierung der Mikroglia und regulieren so die Fähigkeit, Aß aufzunehmen und abzubauen [168]. Im Alterungsprozess verändern Mikrogliazellen den Phänotyp, produzieren vermehrt proinflammatorische Cytokine und reagieren auch verstärkt auf Entzündungsreize [169]. Im Gehirn findet somit ein dynamischer Mikroglia-Turnover statt, und der Phänotyp der Mikroglia ändert sich in Abhängigkeit von Alter, Krankheitsstadium und/oder der Präsenz von peripherer Entzündung [166].

Die AD ist durch eine inflammatorische Reaktion auf APP und Aß charakterisiert, die die Aktivierung der Mikroglia induziert und zudem Astrozyten an den Stellen rekrutiert, wo Aß-Ablagerungen lokalisiert sind [170]. Die Mikroglia lagert sich um die Plaques und spielt eine große Rolle bei Internalisierung und Degradation von Aß. Weil sie die löslichen Aß-Formen durch Makropinozytose aufnimmt und abbaut, hat sie zunächst eine protektive Wirkung [171]. Extrazelluläre unlösliche Aß-Formen interagieren mit dem angeborenen Immunrezeptorkomplex der Mikroglia, wodurch intrazelluläre Signalkaskaden initiiert werden, die die Phagozytose stimulieren. Die Mikroglia produziert und sezerniert dann vermehrt permanent Cytokine und Chemokine in direkter Abhängigkeit vom Amyloidgehalt der Plaques [166]. Deshalb verliert die Mikroglia in späteren AD-Stadien ihren protektiven Effekt und wirkt selbst als Noxe [172].

Bei allen drei in der aktuellen Untersuchung verwendeten pflanzlichen Drogen wurden antiinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen, wobei infolge des breiten Inhaltsstoffspektrums sehr unterschiedliche Mechanismen eine Rolle spielen. Sie sollten nach den obigen Ausführungen vor allem im Frühstadium der AD wirksam sein.

In Fibroblastenkulturen wirkten α- und ß-Hopfenbittersäuren äquipotent inhibitorisch auf die Induktion der Produktion von IL-6 durch TNF-α und die Aktivierung der pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren NF-κB, AP-1 und CREB [173]. *In vivo* hemmten α-Hopfenbittersäuren (250 µg intraperitoneal) bei Mäusen die akute Entzündung der Pfote durch Zymosan, 500 µg wirkten jedoch letal [174].

Johanniskrautextrakt wird traditionell u. a. zur Behandlung von Entzündungen verwendet. In den letzten Jahren wurden Untersuchungen durchgeführt, die die diesbezügliche Wirksamkeit belegen. Ratten, die s.c. 50-300 mg/kg KG Hypericumextrakt erhielten, zeigten eine dosisabhängige und signifikante Hemmung des durch Carrageenan induzierten Pfotenödems [175]. Bei Mäusen mit experimenteller spinaler Läsion, die mit einem methanolischen Johanniskrautextrakt (30 mg/kg KG, der 0,34% Hypericin, 4,1% Hyperforin und 5% Flavonoide enthielt) behandelt wurden, waren der histologische Grad der

Entzündung und Gewebsverletzung sowie verschiedene Entzündungsparameter im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren deutlich reduziert. Zudem besserte sich die Funktion der betroffenen Gliedmaßen in der mit Johanniskraut behandelten Gruppe signifikant schneller [176]. Pseudohypericin und Hyperforin liegen im Johanniskrautextrakt in Konzentrationen vor, die die Produktion von Prostaglandin E(2) (PGE(2)) durch Mausmakrophagen *in vitro* hemmen, allerdings werden mit dem Gesamtextrakt noch ausgeprägtere Wirkungen erreicht, weshalb additive Interaktionen mit den enthaltenen Flavonoiden und anderen Inhaltsstoffen diskutiert werden [177]. Die in der aktuellen Untersuchung verwendete Johanniskrautkonzentration (400 mg/kg KG) war weitaus höher, so dass eigentlich von einem noch höheren antientzündlichen Potential ausgegangen werden müsste. Allerdings handelte es sich um einen Extrakt, mit einer geringen Hyperforin-Konzentration. Insofern ist hier der antiinflammatorische Effekt der übrigen Inhaltsstoffe geprüft worden. Dies ist insofern bedeutsam, weil hyperforinarme Extrakte (<1%) beim Menschen CYP3A4 nicht klinisch relevant aktivieren [178] und so auch bei multipler Pharmakotherapie im Alter eher einsetzbar sind.

Dinamarca et al. beschreiben, dass die intrazerebrale Injektion von 6 µM Hyperforin bei Ratten zur Reduktion von Amyloid-Ablagerungen führt [179]. Hyperforin werden außerdem Astroglia- und Mikroglia-aktivierende Eigenschaften zugesprochen [180].

Durch Modulation von MCP-1 können Cytokin-vermittelte Entzündungsreaktionen gehemmt werden. Das Protein p27SJ aus Johanniskraut regelt bereits in niedriger Konzentration *in vitro* den MCP-1 Promoter über den Transkriptionsfaktor CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPß) herauf, wodurch MCP-1 vermehrt exprimiert wird. Zudem fand sich in Mikrogliazellen eine physikalische Interaktion zwischen p27SJ und C/EBPß [181].

Valeriana amurensis Smir. ex Kom. gehört zu den Baldriangewächsen und kommt im nordöstlichen China vor. In einem Ratten-AD-Modell reduzierten Extrakte der Wurzeln und Rhizome dosisabhängig die Expression von iNOS, COX-2 und dem nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (IκB-α) in Neuronen des Kortex und im Hippocampus. Die Fähigkeit zur räumlichen Exploration und das aktive und passive Vermeidungsverhalten besserten sich. Am stärksten wirkte der 50%ige ethanolische Extrakt [182]. Im gleichen Modell wurde die Expression von ß-APP, Aß(1-40) und Caspase-3 in kortikalen und Hippocampusneuronen dosisabhängig gesenkt, wodurch die Bildung von Aß-Plaques und neurofibrillären Tangles gehemmt werden sollte [183]. Hier ist anzumerken, dass sich das Inhaltsstoffspektrum von Valeriana amurensis von dem von Valeriana officinalis unterscheidet und dass bisher unklar ist, welche Inhaltsstoffe für die antiinflammatorische Wirkung verantwortlich sind. Auch wurde im aktuellen Experiment ein 35%iger ethanolischer Extrakt verwendet, wodurch sich weitere Unterschiede in der Zusammensetzung ergeben. Schließlich sind Ratten- und Maus-AD-Modelle unterschiedlich.

Die hier verwendeten Extrakte könnten aufgrund ihrer antiinflammatorisch wirksamen Inhaltsstoffe die Mikroglia-induzierte proinflammatorische Immunantwort hemmen und/oder die Aufnahme von löslichem Aß in die Mikroglia stimulieren.

In der vorliegenden Untersuchung findet sich am 75. Lebenstag, d.h. am 35. Behandlungstag, in allen Gruppen einschließlich der Kontrolle eine ähnlich hohe Mikrogliafläche in den untersuchten Kortexarealen. Lediglich die Mikrogliafläche der Hopfen 1-Gruppe liegt um 28% unter derjenigen der Kontrollgruppe ($p \leq 0{,}05$). Nach 100 Tagen übersteigt die Mikrogliafläche der Hopfen 1- und der Baldriangruppe die der APPPS1-Kontrollen, die Baldriangruppe weist einen mehr als doppelt so hohen (238%) Mikrogliaflächenanteil auf wie die Kontrolltiere (**Abb. 21**). Auch im weiteren Verlauf der Behandlung mit Baldrian zeigt sich ein kontinuierlich ansteigender Mikrogliaanteil, der sich allerdings ab Tag 150 nicht mehr signifikant von der Kontrollgruppe unterscheidet (**Abb. 36**).

Dieses Ergebnis bestätigt das Auftreten von Mikroglia als Reaktion auf einen pathologischen Prozess. Es wird durch den lipophilen Hopfenextrakt zunächst verlangsamt, was darauf hinweisen könnte, dass die entzündliche Reaktion zunächst gedämpft wird. Dann scheint die Mikroglia aber bis Tag 100 verstärkt zu reagieren. Beim Baldrianextrakt ist sie ab Tag 100 zunächst massiv verstärkt, im weiteren Verlauf lässt sie im Vergleich zur Kontrolle jedoch etwas nach. Für Hopfen 2- und Johanniskrautextrakt ergeben sich keine Änderungen.

Zur Quantifizierung der aktivierten Mikroglia wurde dann der Anteil an Plaques berechnet, die mit mindestens 50% mit Mikroglia bedeckt sind. Zum Zeitpunkt 75 Tage war in allen Therapiegruppen der prozentuale Anteil 4-5-fach höher als bei den nicht therapierten Kontrollen. Besonders hoch war die Aktivierung beim Hopfen 1- und beim Baldrianextrakt. Diese Niveaus bleiben bis Tag 100 erhalten mit Ausnahme der Baldriangruppe, bei der die Plaquebedeckung signifikant um ca. 50% abfällt (**Abb. 22**). Der relative Anstieg der Plaques mit 50% Mikrogliabedeckung ist jedoch am Tag 100 bei Hopfen 2- und Johanniskrautextrakt besonders hoch, was als Hinweis auf eine besonders starke Aktivierung gewertet werden kann.

Bei der Baldriangruppe steigt der Wert wieder an und erreicht ein Plateau am Tag 150. Während der gesamten Beobachtungszeit sind bei der Baldriangruppe somit im Mittel doppelt so viele Plaques mit mindestens 50% Mikroglia bedeckt als bei den Kontroll-Mäusen (**Abb. 37**). Die Plaques der mit Baldrian therapierten Tiere sind jedoch, wie bereits erwähnt, insgesamt kleiner als bei den Kontrolltieren, was für einen Abbau der Aβ-Ablagerungen durch die aktivierte Mikroglia sprechen könnte [171].

5.2.4 Effekte der Phytotherapie auf die Sekretasen

Die α-, β- und γ-Sekretase, die das APP an verschiedenen Lokalisationen schneiden, leisten einen wichtigen Beitrag bei der AD-Entwicklung. Die α-Sekretase (ADAM10) schneidet das APP so, dass pathologische Plaques nicht entstehen und sich ansammeln können.
In den Hopfengruppen kommt es in den ersten 75 Tagen zunächst zu einem Abfall auf 75% bei den Hopfen 1 bzw. auf < 20% bei den Hopfen 2 behandelten Mäusen, in der Johanniskraut- und Baldriangruppe steigt zum Zeitpunkt 75 Tage die α-Sekretase auf Werte bis 130% (Johanniskrautgrupe) bzw. 152% (Baldriangruppe) im Vergleich zu den Kontrolltieren an. Nach 100 Tagen steigt die Konzentration der α-Sekretase in allen Gruppen jedoch auf 4-fach höhere Werte als bei den Kontrollen. (**Abb. 25**) Im Baldrian-Langzeit-Experiment zeigt sich dann anschließend zunächst ein signifikanter Abfall auf nur noch 43%, dem sich ein Anstieg auf einen Maximalwert um 850% des Kontrollwertes am 175. Tag anschließt (**Abb. 38**). Dieses Verhalten lässt auf modulatorische Vorgänge schließen, die im Einzelnen noch unklar sind.

Die β-Sekretase (BACE-1) schneidet das APP so, dass Aβ entstehen kann. In allen Therapiegruppen, mit Ausnahme der Baldriangruppe, fällt vom 75. zum 100. Tag die β-Sekretasekonzentration relativ zum Kontrollwert ab. (**Abb. 26**). Im weiteren Verlauf des Baldrian-Experiments zeigt sich bei den therapierten Mäusen die BACE-1-Sekretion langsam aber stetig an. Sie erreicht am Tag 175 einen Maximalwert von 406% relativ zur Kontrolle und fällt dann wieder stark ab (**Abb. 39**). Auch hier scheinen sich bisher noch ungeklärte modulatorische Vorgänge zu ereignen.
Da Proteinnachweise mittels Western Blot keine eindeutige Aussage über die Aktivität der Sekretasen zulassen, müsste bei weiteren Untersuchungen ein Aktivitätstest angeschlossen werden, auch um belastbare Aussagen über den Einfluss des Extraktes auf die Aβ-Generierung treffen zu können.

5.2.5 Interpretation der erhobenen Ergebnisse

Hopfen 1-Gruppe: In dieser Gruppe gleicht die Aβ42-Konzentration zum Zeitpunkt 75 Tage derjenigen der Kontrollgruppe. Nach 100 Tagen sind die Fraktion der Aß42-Mono- und Oligomere und die Plaqueanzahl angestiegen, die Plaquedichte ist jedoch am Tag 75 und 100 geringer, die Plaquegröße am Tag 100. Auch existieren im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger Plaques mit einer Größe von > 700µm². Dies kann als Hinweis auf eine Verstärkung des Abbauprozesses der Plaques durch den Extrakt gewertet werden. Gleichzeitig hat zu beiden Zeitpunkten der Anteil der mit Mikroglia zu über 50% bedeckten Plaques als Hinweis auf eine durch den Extrakt getriggerte Aktivierung im Vergleich zur Kontrolle stark

zugenommen, wobei die Mikrogliafläche erst am Tag 100 stärker als die Kontrolle angestiegen ist. Während die Expression der ADAM10 am Tag 100 das Vierfache der Kontrolle beträgt, fällt die Expression der β-Sekretase zwischen dem 75. und dem 100. Tag deutlich ab, als Resultat dieses Abfalls dürfte auch die Aβ42-Konzentration wieder abnehmen. Dies kann allerdings nur im Langzeit-Experiment geklärt werden. Der Mechanismus der Modulation der Sekretaseexpression ist unklar. Der lipophile Hopfenextrakt hat sich aber insgesamt offenbar günstig im Sinne einer Verzögerung der Progredienz der AD ausgewirkt, auch wenn sich die unlösliche Aß42-Fraktion im Vergleich zur Kontrolle im Zeitverlauf nicht verändert hat.

Hopfen 2-Gruppe: Die behandelten Mäuse weisen, verglichen mit der Kontrollgruppe, bei beiden Fraktionen einen Anstieg der Aβ42-Konzentration bezogen auf Gesamtprotein auf. Die Plaqueanzahl steigt ebenfalls an. Plaquedichte und -größe (sowie der prozenutale Anteil an großen Plaques (A > 700 µm²)) nehmen stärker ab als bei der Hopfen 1-Gruppe, während der Anteil der Plaques, die kleiner als 400 µm² sind bzw. die zu über 50% mit Mikroglia bedeckt sind, ansteigt. Offenbar scheinen die antiinflammatorischen Inhaltsstoffe des hydrophilen Hopfenextraktes sogar etwas stärker unterstützend auf die Mikroglia zu wirken als die des lipophilen. Die α-Sekretaseexpression ist am Tag 75 im Vergleich zur Kontrolle stark supprimiert, was vermutlich auf einen wasserlöslichen Hopfeninhaltsstoff zurückzuführen ist, sie steigt dann aber zum Tag 100 in den Bereich der Hopfen 1-Gruppe an, während sich die ß-Sekretaseexpression im Vergleich zur Kontrolle kaum verändert. Auch der Hopfen 2-Extrakt hat sich somit günstig auf die Entwicklung der AD bis zum untersuchten Zeitpunkt ausgewirkt, wobei er hinsichtlich seiner Wirkung dem lipophilen Hopfen 1-Extrakt insgesamt unterlegen sein dürfte.

Johanniskrautgruppe: Die Behandlung hat nur zum Zeitpunkt 100 Tage und auch nur auf die Mono- und Oligomerfraktion der Aß42-Konzentration einen leicht steigernden Einfluss. Plaqueanzahl, -dichte und -größe sind jeweils niedriger als bei den Kontrolltieren. Die mit Mikroglia bedeckte Kortexfläche unterscheidet sich nicht von derjenigen der Kontrolle, der Anteil der Plaques, die mit Mikroglia zu über 50% bedeckt sind, ist jedoch ähnlich hoch wie bei den anderen Extraktgruppen. Zwischen Tag 75 und Tag 100 steigt die α-Sekretaseexpression stark an, während die β-Sekretaseexpression um über 50% abfällt. Das könnte bedeuten, dass im weiteren Zeitverlauf weniger Aβ42-Bruchstücke entstehen. Der hier verwendete hyperforinarme Johanniskrautextrakt wirkt somit auf die untersuchten morphologischen und biochemischen Veränderungen im Rahmen der AD noch günstiger als die beiden Hopfenextrakte. Die Befunde sind auch ein Hinweis darauf, dass Hyperforin allein nur zu einem Teil zu den positiven Effekten beiträgt. Dies wurde in einer Untersuchung an Hippokampuszellen der Ratte und an Schweinehirnkapillaren bestätigt [184], [161].

Baldriangruppe: Die Entscheidung, das Langzeit-Experiment mit Baldrianextrakt durchzuführen, wurde anhand der Ergebnisse bei den Aß42-Fraktionen getroffen. Die Mono- und Oligomerfraktion steigt in etwa gleicher Weise wie in der Kontrollgruppe an, die Amyloidfraktion entwickelt sich bis Tag 125 langsamer und bis Tag 175 dann gleich schnell wie die Kontrollgruppe. Am Tag 200 ist sie plötzlich drei Mal so hoch wie bei der Kontrolle. Die Plaqueanzahl bleibt ab Tag 125 stets unterhalb der der Kontrolltiere, insbesondere auch zum Zeitpunkt Tag 200. Die Plaquedichte ist bis Tag 150 signifikant niedriger als die Kontrollgruppe und gleicht sich dann an die Kontrollgruppe an, während die Plaquegröße stets signifikant niedriger ist als bei der Kontrolle. Gleichzeitig ist die prozentuale Plaque-Bedeckung des Kortex signifikant niedriger. Die von Mikroglia bedeckte Fläche nimmt etwas rascher als bei der Kontrolle zu, der Anteil der Plaques, die mit Mikroglia zu über 50% bedeckt sind, ist dagegen schon zum Zeitpunkt 75 Tage auf das Vierfache der Kontrolle erhöht und verändert sich im Zeitverlauf nur unwesentlich, während sie bei den Kontrollen allmählich ansteigt. Die Expression der α-Sekretase zeigt einen biphasischen Verlauf mit hohen Maxima am Tag 100 und 175, während die Expression der ß-Sekretase nur am Tag 175 ein Maximum aufweist und sich nur zu diesem Zeitpunkt von der Kontrolle unterscheidet. Die Plaquezahlreduktion könnte die Auswirkung der hohen Expression der α-Sekretase sein, ist aber möglicherweise auch Ausdruck einer neuroprotektiven Eigenschaft des Baldrianwurzelextrakts. Diese konnten Malva et al. 2004 an kultivierten Ratten-Hippocampus Neuronen nachweisen. Die Neurone wurden gegenüber dem neurotoxischen Aβ25-Aβ35 exponiert. Die zu erwartenden Zelldegenerationen konnten durch einen alkoholischen Baldrianextrakt verhindert werden [185]. Einen weiteren Erklärungsansatz lieferten Sudati et al. 2009. *In vitro* verhindert Baldrian die Chinolinsäure-induzierte ROS-Produktion im Kortex [186], wodurch die durch ROS stimulierte pathologische Tauphosphorylierung bei AD nicht stattfindet. Die Baldrianflavonoide wirken antioxidativ und als Sauerstoffradikalfänger [108].
Der enorme Anstieg der Amyloidfraktion am Tag 200 könnte Folge des starken Abfalls der α-Sekretaseexpression zum gleichen Zeitpunkt sein. Dazu passt auch, dass die BACE-1-Expression am Tag 175 ein hohes Maximum zeigt. Gleichzeitig stagnieren die Plaqueanzahl, -dichte und -größe sowie die Plaqueanzahl mit mindestens 50% Mikrogliabedeckung. Eine Hypothese zu der reduzierten Proteinexpression der α- und β-Sekretase wäre, dass die bereits vorhandenen Plaques im Maushirn eine negative Rückkopplung auf die Proteinsynthese bewirken. Es wäre auch eine Beeinflussung der Sekretasen durch den Baldrianextrakt zu unterschiedlichen Zeitpunkten in unterschiedlicher Weise möglich. Zum Zeitpunkt 200 scheint sich die Stoffwechselsituation bei der Baldriangruppe jedenfalls plötzlich massiv verändert zu haben. Möglicherweise gelangen die protektiven Faktoren des Baldrianextraktes nicht mehr an ihren Zielort.

Insgesamt hat der Baldrianextrakt im aktuellen Experiment somit offenbar für einen relativ langen Zeitraum einen günstigen Einfluss auf die Entwicklung der AD und scheint gegenüber den anderen Extrakten überlegen zu sein. Ein weiterer Vorteil im Hinblick auf eine langfristige Produktentwicklung ist, dass für Baldrianextrakte in Humandosierungen keine klinisch relevanten Beeinflussungen von CYP, Uridindiphosphatglucuronosyltransferasen (Phase II-Enzyme) und P-GP beschrieben worden sind [187], d.h. dass eine Begleitmedikation mit Arzneimittel von geringer therapeutischer Breite unproblematisch zu sein scheint.

5.2.6 Verträglichkeit

Toxische Wirkungen der im Vergleich zu den humanen Dosisbereichen sehr hohen Dosierungen der pflanzlichen Extrakte fanden sich weder in den Kurzzeitexperimenten noch in der Langzeituntersuchung. Dies war aufgrund von Daten aus der Literatur auch nicht zu erwarten. Die LD_{50} betrug bei einem ethanolischen Hopfenextrakt bei der Maus 3,5 g/kg KG p.o. [188], [116]. Daten zur chronischen Toxizität von Hopfenextrakten liegen nicht vor. Bei Ratten supprimierte der Inhaltsstoff 8-Prenylnaringeninin einer Tagesdosierung von 68,4 mg/kg KG oral über 3 Monate die Serumkonzentrationen der Gonadotropine LH and FSH und stimulierte Serumprolactinspiegel, Uterusgewicht und Progesteronrezeptoren [189].
Mit einem ethanolischen Baldrianwurzelextrakt ergab sich bei Mäusen bei intraperitonealer Injektion eine LD_{50} von 3,3 g/kg [190]. Ein ethanolischer Baldrianextrakt in einer Tagesdosis von 300 oder 600 mg/kg KG oral über 30 Tage beeinflusste bei Ratten weder Blutdruck noch Organgewichte oder hämatologische oder biochemische Parameter. Die Tiere, die die höhere Dosis erhielten, hatten ein leicht erhöhtes Körpergewicht im Vergleich zur Kontrolle [191].
In einer Studie zur chronischen Toxizität von Johanniskraut erhielten Ratten 900 mg/kg KG eines methanolischen Extraktes (80%, Droge-Extrakt-Verhältnis (DEV) 3-6:1) oral über 26 Wochen. Es fanden sich nur kleinere unspezifische Symptome wie Gewichtsverlust und geringe pathologische Veränderungen in Leber und Nieren. Alle Veränderungen normalisierten sich nach Absetzen [192]. Zu Mäusen liegen keine Daten vor.

5.2.7 Limitationen der Untersuchung

In dieser Untersuchung wurden unphysiologisch hohe Dosierungen der pflanzlichen Extrakte verabreicht, die weit über den humanen Dosierungen liegen. Damit könnten enthaltene Substanzen mit geringer therapeutischer Breite toxisch wirken, oder es kann sich das Wirkungsspektrum verändern. Derartig hohe Dosierungen sind aber bei Tierexperimenten mit Kleintieren bei pflanzlichen Extrakten durchaus gebräuchlich [193].

Aussagen zu möglichen bei AD wirksamen Inhaltsstoffen dieser Extrakte sind nicht möglich, hier müssen Untersuchungen mit Unterfraktionen und einzelnen Inhaltsstoffen folgen.
Wegen der langen Lagerung können Stabilitätsprobleme von Einzelsubstanzen auftreten, die u. a. eine Veränderung im Wirksamkeitsspektrum bewirken können. Dies ist insbesondere für den Langzeitversuch mit Baldrianextrakt nicht auszuschließen, bei dem ab Tag 175 auffällige Veränderungen in der Expression der Sekretasen aufgetreten sind. Hier sollten bei weiteren Untersuchungen Analysen der Inhaltsstoffe zu den späten Applikationszeiten durchgeführt werden.
Rückschlüsse auf andere Untersuchungen sind wegen der unterschiedlichen Extraktzusammensetzungen und der in der Regel unbekannten Bioverfügbarkeit der Inhaltsstoffe erschwert. Die gesehenen Wirkungen können extraktspezifisch sein.
Für alle verwendeten Extrakte gilt, dass bisher weder die für diese Wirkungen verantwortlichen Inhaltsstoffe noch die genauen Mechanismen und zeitlichen Abläufe bekannt sind.
Da sich Mäuse hinsichtlich Stoffwechsel und Transportmechanismen von Menschen in vielerlei Hinsicht unterscheiden, sind die vorliegenden Ergebnisse nicht auf den Menschen übertragbar [193]. Hier sind nur kontrollierte klinische Studien bei Patienten mit AD aussagekräftig.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen belegen das Potenzial pflanzlicher Extrakte aus in Europa traditionell verwendeten Heilpflanzen zur Therapie der AD. Es fanden sich Multitarget-Effekte, die durch das breite Inhaltsstoffspektrum in den Extrakten bedingt sind. Hopfenextrakte bzw. deren wirksamen Bestandteile sind in Bezug auf ihre Wirkung im Bereich neurodegenerativer Erkrankungen und AD im Speziellen weitestgehend unerforscht. Unsere Untersuchungen deuten infolge einer späten signifikanten Plaquegrößen-Reduktion sowie einer Verringerung der Kortexbedeckung durch Plaques auf einen Einfluss auf inflammatorische Prozesse und folglich auf eine gesteigerte Aktivierung der Mikroglia hin, wobei Wirkungsunterschiede zwischen den beiden verwendeten Extrakte gezeigt werden konnten. Die mit Johanniskrautextrakt behandelte Gruppe weist durch die signifikante Abnahme der Plaqueanzahl und dessen ausgeprägte Wirkung auf die Sekretasen-Expression auf modulatorische Mechanismen hin. Der Extrakt hat aber auch antiinflammatorische Effekte. Neben der Plaque-Reduktion konnte mit dem Baldrianextrakt eine frühe signifikante Abnahme des neurotoxischen intrazerebralen Aβ-Gehalts erreicht werden, was auf zusätzliche neuroprotektive Eigenschaften des Extraktes hindeutet.

5.3 Aussicht und weitere Untersuchungen

Nach dem gegenwärtigen Erkenntnisstand sind weiterführende Untersuchungen mit allen Extrakten sinnvoll, insbesondere aber wegen der offenbar fehlenden Interaktionen mit arzneimittelabbauenden Mechanismen und der hervorragenden Langzeitverträglichkeit mit Baldrianextrakt. In erster Linie ist die Relevanz der Reduktion der neurotoxischen Aβ-Peptide, insbesondere durch den Baldrianextrakt, aber auch durch die anderen Extrakte, für das Fortschreiten der kognitiven Degeneration zu untersuchen. Zeigen sich auch hier verbessernde Effekte, können in nachfolgenden Schritten höhere Dosierungen oder Kombinationen verschiedener Extrakte in Hinblick auf mögliche additive Effekte getestet werden. Desweiteren ist es von großer Wichtigkeit, den zugrunde liegenden Wirkmechanismus zu identifizieren wie z. B. einen möglichen Einfluss auf den Abtransport des APP-Spaltproduktes Aβ. Außerdem sollten die Wirkmechanismen der Resorption an der Blut-Hirn-Schranke analysiert werden. Da unsere Ergebnisse keinen eindeutigen Hinweis auf die Sekretaseaktivität hinsichtlich der APP-Prozessierung geben, wäre die Durchführung eines Sekretaseaktivitätstests notwendig.

Im Sinne weiterführender Untersuchungen könnten mittels chromatographischer Verfahren die wirksamen Bestandteile der Pflanzen fraktioniert werden. Diese Fraktionen würden somit separat appliziert und gezielt hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Aspekte der Alzheimer-Pathogenese sowie ihrer Nebenwirkungen getestet werden. Verhaltensbiologische Untersuchungen unseres Mausmodells hinsichtlich kognitiver Eigenschaften könnten Hinweise geben, in wie weit sich die Extrakte auf die neurotoxischen Aβ-Level und auf die Lernfähigkeit auswirken.

6. Zusammenfassung

Die Alzheimer Demenz (AD) betrifft bereits heute viele Millionen Menschen. Durch verschiedene Mutationen im Amyloid-Precursor-Protein (APP) und bei den Präsenilinen (PS) wird die auch in gesunden Gehirnen vorkommende Aβ-Konzentration pathologisch erhöht. Histomorphologisch ist die AD durch Amyloid-Plaques, neurofibrilläre Tangles und aktivierte Mikrogliazellen charakterisiert. Die bisherigen Therapieoptionen mit chemisch definierten Substanzen sind nicht sonderlich wirksam. Der Extrakt aus Ginkgo Biloba-Blättern wird neuerdings vermehrt bei der Therapie der AD eingesetzt, aber es gibt Hinweise darauf, dass andere pflanzliche Extrakte und pflanzliche Inhaltstoffe ebenfalls ein therapeutischen Potential haben könnten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einem APPPS1-transgenen Mausmodell, das bereits ab dem 50. Lebenstag erste Amyloid-Plaques zeigt, den Einfluss der oralen Applikation von Extrakten aus *Humuli flos* (80% ethanolischer Extrakt: Hopfen 1; Wasserextrakt: Hopfen 2), *Hyperici herba* (80% ethanolischer Extrakt: Johanniskraut) und *Valerianae radix (*35% ethanolischer Extrakt: Baldrian) auf ihre zeitliche Entwicklung der für die AD charakteristischen Amyloid-Plaques, der Aβ42-Konzentration und der Mikrogliakonzentration und -plaquebedeckung sowie der Expression der α- und β-Sekretasen zu untersuchen.

Jeweils fünf Tiere pro Gruppe wurden ab dem 40. Lebenstag täglich mittels Schlundsonde mit einem der Extrakte behandelt, die Wirkungen der Extrakte wurden am 75. und 100. Lebenstag untersucht. Zudem wurde ein Langzeit-Experiment bis zum 200. Lebenstag mit dem Baldrianextrakt durchgeführt, wobei die genannten Parameter im Abstand von 25 Tagen bestimmt wurden. Anzahl, Größe, Dichte und Verbreitung von Plaques und Mikroglia wurden immunhistochemisch analysiert. Mittels ELISA wurden die Aβ42-Konzentrationen quantitativ ermittelt und mit Hilfe des Western Blots die Proteinkonzentrationen der α- und β-Sekretasen semiquantitativ analysiert.

Bei den mit Hopfen 2 und Johanniskraut therapierten Tieren war die Fraktion von Aβ42, die die aggregierten, unlöslichen Plaques repräsentiert, im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren vermehrt. Bei der Plaqueentwicklung profitierten insbesondere diejenigen Tiere, die mit dem Hopfen 2-, Johanniskraut- oder Baldrianextrakt therapiert wurden.

Eine günstige Entwicklung bei der Mikrogliafläche pro 10 mm² Kortexfläche zeichnet sich bei den therapierten Tieren bereits am Tag 100 im Vergleich zur Kontrollgruppe ab. Auch der Prozentsatz der Plaques, die zumindest zu 50% mit Mikroglia bedeckt waren, war signifikant höher als bei den Kontrolltieren. Die Expression der α-Sekretase stieg bis Tag 100 in allen

Gruppen an, während die β-Sekretasekonzentration in allen Gruppen außer bei den mit Hopfen 1 behandelten Mäusen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe sank.

Im Langzeit-Experiment zeigten sich vor allem am Tag 100 und 200 signifikant höhere Fraktionen des aggregierten Aβ42 als bei der Kontrollgruppe. Die Konzentrationen der neurotoxischen Aβ42-Mono- und Oligomerfraktion variierten im Zeitverlauf ähnlich stark wie bei der Kontrollgruppe. Im gesamten Verlauf waren Plaqueanzahl und -größe stets niedriger als bei den Kontrolltieren. Die Analyse der Plaques, die zu über 50% mit Mikroglia bedeckt waren, ergab jeweils höhere Werte als die Kontrolltiere. Die α- und β-Sekretasekonzentrationen stiegen bis zum 175. Tag an, wobei die α-Sekretase gegenüber der β-Sekretase stets dominierte: Im weiteren Zeitverlauf näherten sie sich synchron den Werten der Kontrollgruppe.

Die Verträglichkeit der Extrakte zum Zeitpunkt 100 Tage waren sehr gut, in der histologischen Untersuchung ergaben sich keine Hinweise auf pathologische Veränderungen.

Alle pflanzlichen Extrakte, insbesondere der Baldrianextrakt, führten bei den gemessenen Parametern zu günstigen Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Insbesondere kann die größere Anzahl von Plaques, die zu mehr als 50% mit Mikroglia bedeckt waren, als starke Aktivierung der Immunantwort der Tiere auf die pathologischen Veränderungen durch die pflanzlichen Extrakte interpretiert werden. Mögliche Wirkmechanismen sind die antiinflammatorischen und neuroprotektiven Eigenschaften der verwendeten Extrakte im Sinne eines Multitargeteffektes. Weitere gezielte Untersuchungen sollten deshalb folgen.

7. Thesen

1. Die Neuropathologie der Alzheimer Demenz (AD) ist gekennzeichnet durch extrazelluläre Plaques, die durch akkumulierende Aβ-Proteine entstehen, und intrazelluläre hyperphosphorylierte Tau-Proteine, die die sog. Tangles bilden.
2. Pflanzliche Arzneimittel, wie der Ginkgo Biloba-Extrakt EGb 761, sind weltweit beliebt und werden bereits zur Behandlung bei einer Demenz eingesetzt.
3. Für Extrakte von *Humulus lupulus, Hypericum perforatum* und *Valeriana officinalis* sind günstige zerebrale Wirkungen bekannt. Daher sind Analysen auf ihre Wirkung auf Aβ-Ablagerungen und die Mikroglia-Aktivität bei der AD sinnvoll.
4. Das in der Arbeit verwendete transgene, doppelmutierte APPPS1-Mausmodell weist bereits am 50. Lebenstag die AD-typischen pathologischen Plaques auf. Dieser Vorteil wird in Forschungsarbeiten ausgenutzt.
5. Es wurden jeweils 5 Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt mit einem der vier Extrakte *Humulus lupulus* (ethanolischer (Hopfen 1) und wässriger Extrakt (Hopfen 2)), *Hypericum perforatum* (Johanniskraut) oder *Valeriana officinalis* (Baldrian) therapiert und mit Kontrolltieren verglichen.
6. Die mit Johanniskrautextrakt therapierte Gruppe weist weniger, kleinere und dichteverminderte Plaques auf. Die Kortexfläche ist prozentual weniger mit Plaques bedeckt als die der Kontrollgruppe. Eine über den Untersuchungszeitrahmen ansteigende α-Sekretase- und abfallende β-Sekretasekonzentration korreliert mit dem Plaque-Ergebnis, so dass von einem protektiven Einfluss gesprochen werden kann.
7. Der Mikrogliaanteil pro Kortexfläche steigt in beiden Hopfengruppen im Vergleich zu den Kontrolltieren erheblich an und wird als eine immunologische Reaktion auf pathologische Prozesse bei der AD gewertet.
8. Der 35%ige ethanolische Baldrianextrakt zeigt eine günstige Wirkung im Zeitverlauf: in der Baldriangruppe gibt es im Vergleich mit der Kontrolle insgesamt weniger und kleinere Plaques. Die α-Sekretase, die die nicht-toxischen Aβ-Plaques entstehen lässt, ist signifikant höher und die mikrogliale Antwort stärker als die der jeweiligen Kontrollgruppe. Somit könnte der Extrakt eine mögliche Therapieoption der frühen AD sein.
9. Die Extrakte *Humulus lupulus, Hypericum perforatum* und *Valeriana officinalis* erweisen sich als gut verträglich. Pathologische Veränderungen ergaben sich in der histologischen Untersuchung nicht.

8. Literaturverzeichnis

1. Przedborski, S., Vila M. and Jackson-Lewis V., *Neurodegeneration: what is it and where are we?* J Clin Invest, 2003. 111(1): p. 3-10.
2. Karl, F., Masuhr, M. N., *Neurologie*. Stuttgart: MLP - Duale Reihe, 2007. p. 1-597.
3. Barnes, D. E. and Yaffe K., *The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence.* Lancet Neurol, 2011. 10(9): p. 819-28.
4. Ferri, C., et al., *Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study.* Lancet, 2005. 366(9503): p. 2112-7.
5. Bickel, H., *Dementia in advanced age: estimating incidence and health care costs.* Z Gerontol Geriatr, 2001. 34(2): p. 108-15.
6. Hallauer, J., *Home nursing of demented patients as an economic factor in public health.* Krankenpfl J, 2004. 42(3-4): p. 109-10.
7. Wallesch, C.-W., Förstl, H., *Demenzen*. Referenzreihe Neurologie. Stuttgart: Thieme, 2005. p. 1-329.
8. Bischoff, R., Simm, M. und Zell, R. A., Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), *Der Kampf gegen das Vergessen, Demenzforschung im Fokus*, 2004. p. 1-82.
9. Findeis, M., *The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer's disease.* Pharmacol Ther, 2007. 116(2): p. 266-86.
10. Gleixner, C., Müller, M. and Wirth S. B., *Neurologie und Psychiatrie für Studium und Praxis*. Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste, 2004/05. p. 1-418.
11. *Demenz-Definition der ICD-10*.
12. Qiu, C., Winblad, B. and Fratiglioni, L., *The age-dependent relation of blood pressure to cognitive function and dementia.* Lancet Neurol, 2005. 4(8): p. 487-99.
13. Gustafson, D., *Adiposity indices and dementia.* Lancet Neurol, 2006. 5(8): p. 713-20.
14. Xu, W., et al., *The effect of borderline diabetes on the risk of dementia and Alzheimer's disease.* Diabetes, 2007. 56(1): p. 211-6.
15. Xu, W., et al., *Diabetes mellitus and risk of dementia in the Kungsholmen project: a 6-year follow-up study.* Neurology, 2004. 63(7): p. 1181-6.
16. Newman, A., et al., *Dementia and Alzheimer's disease incidence in relationship to cardiovascular disease in the Cardiovascular Health Study cohort.* J Am Geriatr Soc, 2005. 53(7): p. 1101-7.
17. Harwood, D., et al., *The effect of alcohol and tobacco consumption, and apolipoprotein E genotype, on the age of onset in Alzheimer's disease.* Int J Geriatr Psychiatry, 2009. 25(5): p. 511-8.
18. Fratiglioni, L., Paillard-Borg, S. and Winblad, B., *An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia.* Lancet Neurol, 2004. 3(6): p. 343-53.
19. Karp, A., et al., *Relation of education and occupation-based socioeconomic status to incident Alzheimer's disease.* Am J Epidemiol, 2004. 159(2): p. 175-83.
20. Qiu, C., De Ronchi, D. and Fratiglioni, L., *The epidemiology of the dementias: an update.* Curr Opin Psychiatry, 2007. 20(4): p. 380-5.
21. *http://www.alzheimerinfo.de/alzheimer/formen/*. 2010.
22. Cummings, J., *Frontal-subcortical circuits and human behavior.* J Psychosom Res, 1998. 44(6): p. 627-8.

23. *http://www.psychiatriegespraech.de/psychische_krankheiten/demenz/demenz_definition.php*.2010.
24. *http://www.alzheimercheck.de/diagnose/*2011.
25. Kester, M. and Scheltens, P., *Dementia: the bare essentials.* Pract Neurol, 2009. 9(4): p. 241-51.
26. Dahm, R., *Alzheimer's Discovery.* Current Biology, 2006. 16(21): p. R906-10.
27. *http://www.deutsche-alzheimer.de/index.php?id=187*. 2010.
28. Maurer, K. und Maurer, U., *Alzheimer. Das Leben eines Arztes & die Karriere einer Krankheit.* München: Piper-Verlag, 1998. p. 1-325.
29. Alzheimer's Association, *Braintour, Image 9a*. Illustrations by Stacy Janis, http://alz.org/brain_german/09.asp. © 2012.
30. Alzheimer's Association, *Braintour, Image 10.* Illustrations by Stacy Janis. http://alz.org/brain_german/10.asp. © 2012.
31. Braak, H. and Braak, E., *Development of Alzheimer-related neurofibrillary changes in the neocortex inversely recapitulates cortical myelogenesis.* Acta Neuropathol, 1996. 92(2): p. 197-201.
32. Selkoe, D., *Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease.* J Biol Chem, 1996. 271(31): p. 18295-8.
33. Goedert, M. and Spillantini, M. G., *Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease.* Biochim Biophys Acta, 2000. 1502(1): p. 110-21.
34. Friedhoff, P., et al., *Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments.* Biochim Biophys Acta, 2000. 1502(1): p. 122-32.
35. *www.neuro24.de.* 2010.
36. Berger, M., *Psychische Erkrankungen, Klinik und Therapie*. München: Elsevier. 2009. p. 1-1264.
37. Anderton, B. H., *Changes in the ageing brain in health and disease.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1997. 352(1363): p. 1781-92.
38. Wallesch, C.-W., Förstl, H., *Demenzen*. Referenzreihe Neurologie. Stuttgart: Thieme, 2005. p. 1-329.
39. Bugiani, O., et al., *Alzheimer patients: preamyloid deposits are more widely distributed than senile plaques throughout the central nervous system.* Neurosci Lett, 1989. 103(3): p. 263-8.
40. Harman, D., *Alzheimer's disease pathogenesis: role of aging.* Ann N Y Acad Sci, 2006. 1067: p. 454-60.
41. Jellinger, K. A., *Neuropathologie der Demenzen.* Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie, 2001. 2(1): p. 7-31.
42. Hebert, L., et al., *Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census.* Arch Neurol, 2003. 60(8): p. 1119-22.
43. Alzheimer's Association, *2010 Alzheimer's disease facts and figures.* Alzheimers Dement, 2010. 6(2): p. 158-94.
44. Janssen, J. C., et al., *Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families.* Neurology, 2003. 60(2): p. 235-9.
45. Kim, H., et al., *Presenilin 1 gene mutation (M139I) in a patient with an early-onset Alzheimer's disease: clinical characteristics and genetic identification.* Neurol Sci, 2010. 31(6): p. 781-3
46. Hoenicka, J., *Genes in Alzheimer's disease.* Rev Neurol, 2006. 42(5): p. 302-5.

47. Selkoe, D., *Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy.* Physiol Rev, 2001. 81(2): p. 741-66.
48. Antonell, A., et al., *A novel PSEN1 gene mutation (L235R) associated with familial early-onset Alzheimer's disease.* Neurosci Lett, 2011. 496(1): p. 40-2.
49. De Jonghe, C., et al., *Pathogenic APP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect Abeta secretion and APP C-terminal fragment stability.* Hum Mol Genet, 2001. 10(16): p. 1665-71.
50. Mann, D., *Cerebral amyloidosis, ageing and Alzheimer's disease; a contribution from studies on Down's syndrome.* Neurobiol Aging, 1989. 10(5): p. 397-9; discussion p. 412-4.
51. Teller, J., et al., *Presence of soluble amyloid beta-peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome.* Nat Med, 1996. 2(1): p. 93-5.
52. Donahue, J. and Johanson, C., *Apolipoprotein E, amyloid-beta, and blood-brain barrier permeability in Alzheimer disease.* J Neuropathol Exp Neurol, 2008. 67(4): p. 261-70.
53. Saunders, A., et al., *Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease.* Neurology, 1993. 43(8): p. 1467-72.
54. Krsteska, R., *Risk factors for dementia of the Alzheimer and vascular type.* Med Pregl, 2009. 62(5-6): p. 201-6.
55. Chen, J., Lin, K. and Chen, Y., *Risk factors for dementia.* J Formos Med Assoc, 2009. 108(10): p. 754-64.
56. Rockenstein, E., et al., *Levels and alternative splicing of amyloid beta protein precursor (APP) transcripts in brains of APP transgenic mice and humans with Alzheimer's disease.* J Biol Chem, 1995. 270(47): p. 28257-67.
57. Priller, C., et al., *Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein.* J Neurosci, 2006. 26(27): p. 7212-21.
58. Qiu, W.Q., et al., *Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner.* J Neurosci, 1995. 15(3 Pt 2): p. 2157-67.
59. Luo, J. J., et al., *Characterization of the neurotrophic interaction between nerve growth factor and secreted alpha-amyloid precursor protein.* J. Neurosci Res. 2001. 63(5): p. 410-20.
60. Haass, C., et al., *Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments.* Nature, 1992. 357(6378): p. 500-3.
61. Haass, C. and Steiner, H., *Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases.* Trends Cell Biol, 2002. 12(12): p. 556-62.
62. Haass, C., *Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation.* EMBO J, 2004. 23(3): p. 483-8.
63. Jellinger, K. A., *Neuropathologie der Demenzen.* Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie, 2001. 2 (1): p. 7-31.
64. Glenner, G. G. and Wong, C. W., *Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein.* Biochem Biophys Res Commun, 1984. 120(3): p. 885-90.
65. Haass, C. and Selkoe, D., *Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. 8(2): p. 101-12.

66. Brouwers, N., Sleegers, K. and Van Broeckhoven, C., *Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update.* Ann Med, 2008. 40(8): p. 562-83.
67. Bayer, T., et al., *Key factors in Alzheimer's disease: beta-amyloid precursor protein processing, metabolism and intraneuronal transport.* Brain Pathol, 2001. 11(1): p. 1-11.
68. Block, F., *Zerebrale Amyloidangiopathie: Cerebral amyloid angiopathy.* Nervenarzt, 2011. 82(2): p. 202-6.
69. Jankowsky, J., et al., *Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase.* Hum Mol Genet, 2004. 13(2): p. 159-70.
70. Näslund, J., et al., *Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline.* JAMA, 2000. 283(12): p. 1571-7.
71. Weyerer, S., *Altersdemenz*, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 28, Berlin, Robert Koch Institut. 2005, p. 1-38.
72. McLean, C., et al., *Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease.* Ann Neurol, 1999. 46(6): p. 860-6.
73. Gong, Y., et al., *Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(18): p. 10417-22.
74. Selkoe, D., *Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(20): p. 11039-41.
75. Bentahir, M., et al., *Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms.* J Neurochem, 2006. 96(3): p. 732-42.
76. Czech, C., Tremp, G. and Pradier, L., *Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms.* Prog Neurobiol, 2000. 60(4): p. 363-84.
77. Zhang, C., et al., *Familial Alzheimer's disease mutations in presenilin 1 do not alter levels of the secreted amyloid-beta protein precursor generated by beta-secretase cleavage.* Curr Alzheimer Res, 2010. 7(1): p. 21-6.
78. Lao, J., et al., *A novel mutation in the predicted TM2 domain of the presenilin 2 gene in a Spanish patient with late-onset Alzheimer's disease.* Neurogenetics, 1998. 1(4): p. 293-6.
79. Förstl, H. and Kurz, A., *Clinical features of Alzheimer's disease.* Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 1999. 249(6): p. 288-90.
80. *http://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/FactSheet03.pdf*, 2010.
81. *http://www.alzheimer.de/alzheimer/alzheimer/Symptome/Typische-Symptome.html*. 2010.
82. Ahluwalia, N. and Vellas, B., *Immunologic and inflammatory mediators and cognitive decline in Alzheimer's disease.* Immunol Allergy Clin North Am, 2003. 23(1): p. 103-15.
83. Kovács, T., *Therapy of Alzheimer disease.* Neuropsychopharmacol Hung, 2009. 11(1): p. 27-33.
84. Birks, J., et al., *Rivastigmine for Alzheimer's disease.* Cochrane Database Syst Rev, 2009(2):CD001191.
85. *http://www.memantine.com/en/studies/preclinical_data/signal-to-noise_hypothesis/*. 2010.
86. *http://www.medizinfo.de/kopfundseele/alzheimer/memantine.shtml.* 2011.

87. Rountree, S., et al., *Persistent treatment with cholinesterase inhibitors and/or memantine slows clinical progression of Alzheimer disease.* Alzheimers Res Ther, 2009. 1(2): p. 7.
88. Bullock, R., *Efficacy and safety of memantine in moderate-to-severe Alzheimer disease: the evidence to date.* Alzheimer Dis Assoc Disord, 2006. 20(1): p. 23-9.
89. Prins, N. D., Visser, P. J. and Scheltens, P., *Can novel therapeutics halt the amyloid cascade?* Alzheimers Res Ther, 2010. 2(2): p. 5.
90. Flintrop, J., *Allensbach-Studie „Naturheilmittel 2002“ - Die Selbstmedikation boomt.* Deutsches Ärzteblatt, Jg. 99, 2002. Heft 17.
91. Anekonda, T. and Reddy, P., *Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease?* Brain Res Brain Res Rev, 2005. 50(2): p. 361-76.
92. Weinmann, S., et al., *Effects of Ginkgo biloba in dementia: systematic review and meta-analysis.* BMC Geriatr, 2010. 10: p. 14.
93. Busse, R., *Ginkgohaltige Präparate bei Alzheimer Demenz*. Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG), Köln, 2008. p. 1-175.
94. Stackman, R., et al., *Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by chronic Ginkgo biloba treatment.* Exp Neurol, 2003. 184(1): p. 510-20.
95. Kasper, S. and Schubert, H., *Ginkgo biloba extract EGb 761 in the treatment of dementia: evidence of efficacy and tolerability.* Fortschr Neurol Psychiatr, 2009. 77(9): p. 494-506.
96. Wu, Z., et al., *Ginkgo biloba extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of Caenorhabditis elegans.* Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2002. 48(6): p. 725-31.
97. Park, S. and Kim, D., *Discovery of natural products from Curcuma longa that protect cells from beta-amyloid insult: a drug discovery effort against Alzheimer's disease.* J Nat Prod, 2002. 65(9): p. 1227-31.
98. Peng, Q., Buz'Zard, A. and Lau, B., *Neuroprotective effect of garlic compounds in amyloid-beta peptide-induced apoptosis in vitro.* Med Sci Monit, 2002. 8(8): p. BR328-37.
99. Mandel, S. A., et al., *The importance of the multiple target action of green tea polyphenols for neuroprotection.* Front Biosci (Schol. Ed), 2012. 4: p. 581-98.
100. Jia, H., et al., *Tenuigenin treatment decreases secretion of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein in cultured cells.* Neurosci Lett, 2004. 367(1): p. 123-8.
101. *http://www.gewuerzlexikon.de/baldrian.html*. 2010.
102. Reichling, J., et al., *HagerRom, Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*, in *Valeriana officinalis, Valerianae radix (Baldrianwurzel).* Heidelberg: Springer Verlag. 2010.
103. European Medicines Agency (EMA), Committee for Herbal Medicinal Products (HMPC). *Valeriana officinalis L., Radix Baldrianwurzel*. 2007.
104. Willey, L., et al., *Valerian overdose: a case report.* Vet Hum Toxicol, 1995. 37(4): p. 364-5.
105. Carrasco, M., et al., *Interactions of Valeriana officinalis L. and Passiflora incarnata L. in a patient treated with lorazepam.* Phytother Res, 2009. 23(12): p. 1795-6.
106. Brattström, A., *Scientific evidence for a fixed extract combination (Ze 91019) from valerian and hops traditionally used as a sleep-inducing aid.* Wien Med Wochenschr, 2007. 157(13-14): p. 367-70.
107. *http://www.phytodoc.de/heilpflanze/baldrian-echter/wirkung/*. 2010.

108. Ramharter, J. and Mulzer, J., *Total synthesis of valerenic acid, a potent GABA(A) receptor modulator.* Org Lett, 2009. 11(5): p. 1151-3
109. Murphy, K., et al., *Valeriana officinalis root extracts have potent anxiolytic effects in laboratory rats.* Phytomedicine, 2010. 17(8-9): p. 674-8.
110. Granger, R. E., Campbell, E. L. and Johnston, G. A., *(+)- and (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant alpha1beta2gamma2L GABA(A) receptors.* Biochem Pharmacol, 2005. 69(7): p. 1101-11.
111. Ortiz, J. G., Nieves-Natal, J. and Chavez, P., *Effects of Valeriana officinalis extracts on [3H]flunitrazepam binding, synaptosomal [3H]GABA uptake, and hippocampal [3H]GABA release.* Neurochem Res, 1999. 24(11): p. 1373-8.
112. Jacobo-Herrera, N., et al., *NF-kappaB modulators from Valeriana officinalis.* Phytother Res, 2006. 20(10): p. 917-9.
113. *http://www.braukultur-franken.de/kompendium/h/hopfen/hopfen.html*. 2011.
114. European Medicines Agency (EMA), Committee for Herbal Medicinal Products (HMPC). *Community herbal monograph on Humulus lupulus L. Flos*. 2008.
115. Unger, M., *Botanical sedatives.* Pharm Unserer Zeit, 2007. 36(3): p. 206-12.
116. Reichling, J., et al., *HagerRom, Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*, in *Humulus, Humulus lupuli, Lupuli flos (Hopfenzapfen).* Heidelberg: Springer Verlag. 2010,
117. Van Cleemput, M., et al., *Hop bitter acids efficiently block inflammation independent of GRalpha, PPARalpha, or PPARgamma.* Mol Nutr Food Res, 2009. 53(9): p. 1143-55.
118. Gao, X., et al., *Immunomodulatory activity of xanthohumol: inhibition of T cell proliferation, cell-mediated cytotoxicity and Th1 cytokine production through suppression of NF-kappaB.* Immunopharmacol Immunotoxicol, 2009. 31(3): p. 477-84.
119. Lupinacci, E., et al., *Xanthohumol from hop (Humulus lupulus L.) is an efficient inhibitor of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha release in LPS-stimulated RAW 264.7 mouse macrophages and U937 human monocytes.* J Agric Food Chem, 2009. 57(16): p. 7274-81.
120. Monteiro, R., et al., *Effect of hop (Humulus lupulus L.) flavonoids on aromatase (estrogen synthase) activity.* J Agric Food Chem, 2006. 54(8): p. 2938-43.
121. Delmulle, L., et al., *Treatment of PC-3 and DU145 prostate cancer cells by prenylflavonoids from hop (Humulus lupulus L.) induces a caspase-independent form of cell death.* Phytother Res, 2008. 22(2): p. 197-203.
122. *www.teleboom.de/html/heilkrauter.html*. 2011.
123. European Medicines Agency (EMA), Committee for Herbal Medicinal Products (HMPC). *Community herbal monograph on Hypericum perforatum L., Herba*. 2008.
124. Schempp, C., et al., *St. John's wort (Hypericum perforatum L.). A plant with relevance for dermatology.* Hautarzt, 2002. 53(5): p. 316-21.
125. Henderson, L., et al., *St John's wort (Hypericum perforatum): drug interactions and clinical outcomes.* Br J Clin Pharmacol, 2002. 54(4): p. 349-56.
126. Cheng, B., Hung, C. and Chiu, W., *Herbal medicine and anaesthesia.* Hong Kong Med J, 2002. 8(2): p. 123-30.
127. Kleinschmidt, S., Rump, G. and Kotter, J., *Herbal medications. Possible importance for anaesthesia and intensive care medicine.* Anaesthesist, 2007. 56(12): p. 1257-66.
128. Karow, T,. Lang-Roth, R., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Köln: Thomas Karow. 2010. p. 1-1332.

129 Reichling, J., et al., *HagerRom, Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*, in *Hypericum, Hypericum perforatum, Hyperici herba, Inhaltsstoffe.* Heidelberg: Springer Verlag. 2010.

130. Kubin, A., et al., *Hypericin--the facts about a controversial agent.* Curr Pharm Des, 2005. 11(2): p. 233-53.

131. Karioti, A. and Bilia, A. R., *Hypericins as potential leads for new therapeutics.* Int J Mol Sci, 2010. 11(2): p. 562-94.

132. Madabushi, R., et al., *Hyperforin in St. John's wort drug interactions.* Eur J Clin Pharmacol, 2006. 62(3): p. 225-33.

133. Muller, W. E., et al., *Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of hypericum extract.* Pharmacopsychiatry, 1998. 31 Suppl 1: p. 16-21.

134. Muller, W. E., et al., *Effects of hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity.* Pharmacopsychiatry, 1997. 30 Suppl 2: p. 102-7.

135. Fiebich, B., Höllig, A. and Lieb, K., *Inhibition of substance P-induced cytokine synthesis by St. John's wort extracts.* Pharmacopsychiatry, 2001. 34 Suppl 1: p. S26-8.

136. Janssen, K., et al., *Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study.* Am J Clin Nutr, 1998. 67(2): p. 255-62.

137. Radde, R., et al., *Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology.* EMBO Rep, 2006. 7(9): p. 940-6.

138. McGowan, E., Eriksen, J. and Hutton, M., *A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice.* Trends Genet, 2006. 22(5): p. 281-9.

139. Graphic reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, I. *www.cellsignal.com*.

140. Lesné, S., et al., A specific Amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. Nature 2006; 440(7082): p. 352-357.

141. Schupf, N., et al., *Peripheral Abeta subspecies as risk biomarkers of Alzheimer's disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(37): p. 14052-7.

142. Andreasen, N., et al., *Evaluation of CSF-tau and CSF-Abeta42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice.*Arch Neurol, 2001. 58(3): p. 373-9.

143. Sturchler-Pierrat, C., et al., *Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(24): p. 13287-92.

144. Bornemann, K. D. and Staufenbiel, M., *Transgenic mouse models of Alzheimer's disease.* Ann N Y Acad Sci, 2000. 908: p. 260-6.

145. Riepe, M. W., *Evidenzbasierte medikamentöse Therapie der Alzheimer-Erkrankung,.* Deutsches Ärzteblatt, Jg. 102, 2005. Heft 51–52.

146. Fu, H. J., et al., *Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease.* CNS Neurol Disord Drug Targets, 2010. 9(2): p. 197-206.

147. Obregon, D. F., et al., *ADAM10 activation is required for green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein.* J Biol Chem, 2006. 281(24): p. 16419-27.

148. Morin, C., et al., *Valerian-hops combination and diphenhydramine for treating insomnia: a randomized placebo-controlled clinical trial.* Sleep, 2005. 28(11): p. 1465-71.

149. Larzelere, M., Campbell, J. and Robertson, M., *Complementary and alternative medicine usage for behavioral health indications.* Prim Care, 2010. 37(2): p. 213-36.

150. Geldmacher D.S., *Treatment guidelines for Alzheimer's disease: redefining perceptions in primary care*, Prim Care Companion J Clin Psychiatry. 2007. 9(2): p. 113-21.
151. Linde, K., *St. John's wort - an overview*. Forsch Komplementmed. 2009.16(3): p. 146-55
152. Teotico, D., et al., *Structural basis of human Pregnane-X-Receptor activation by the hops constituent colupulone.* Mol Pharmacol, 2008. 74(6): p. 1512-20.
153. Chang, T. K., *Activation of Pregnane-X-Receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR) by herbal medicines.* AAPS J, 2009. 11(3): p. 590-601.
154. Wentworth J. M., et al., *St John's wort, a herbal antidepressant, activates the steroid X receptor*. J Endocrinol. 2000. 166(3): p. R11-6.
155. Mannering, G. J., Shoeman, J. A. and Deloria, L. B., *Identification of the antibiotic hops component, colupulone, as an inducer of hepatic cytochrome P-4503A in the mouse.* Drug Metab Dispos. 1992. 20(2): p. 142-7.
156. Dorn, C., et al., *Xanthohumol feeding does not impair organ function and homoeostasis in mice*. Food Chem Toxicol. 2010. 38(7): p. 1890-7.
157. Lam, F., et al., *beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein.* J Neurochem, 2001. 76(4): p. 1121-8.
158. Bauer, B., et al., *In vivo activation of human Pregnane-X-Receptor tightens the blood-brain barrier to methadone through P-glycoprotein up-regulation.* Mol Pharmacol, 2006. 70(4): p. 1212-9.
159. Cheng, J., Ma, X. and Gonzalez, F. J., *Pregnane X receptor - and CYP3A4-humanized mouse models and their applications.* Br J Phrmacol. 2011. 163(3): p. 461-8. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01129.x.
160. Matheny, C.J., et al., *Effect of prototypical inducing agents on P-glycoprotein and CYP3A expression in mouse tissues.* Drug Metab Dispos, 2004. 32(9): p. 1008-14.
161. Ott, M., et al., *St. John's Wort constituents modulate P-glycoprotein transport activity at the blood-brain barrier*. Pharm Res. 2010;27(5): p. 811-22.
162. Hartz, A. M., Miller, D. S. and Bauer, B., *Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid-beta in a mouse model of Alzheimer's disease.* Mol Pharmacol, 2010. 77(5): p. 715-23.
163. Gurley, B. J., et al. *In vivo effects of goldenseal, kava kava, black cohosh, and valerian on human cytochrome P450 1A2, 2D6, 2E1,and 3A4/5 phenotypes.* Clin Pharmacol Ther. 2005. 77(5): p. 415-26.
164. Chow, N. K., et al., *Telemetry as a tool to measure sedative effects of a valerian root extract and its single constituents in mice.* Planta Med. 2011. 77(8): p. 795-803.
165. Wint, D., *Depression: a shared risk factor for cardiovascular and Alzheimer disease.* Cleve Clin J Med. 2011. 78 Suppl 1: p. 44-6.
166. Solito, E. and Sastre, M., *Microglia function in Alzheimer's disease*. Front Pharmacol. 2012. 3: p. 14-24.
167. Malm, T., et al., *The role and therapeutic potential of monocytic cells in Alzheimer's disease.* Glia, 2010. 58(8): p. 889-900.
168. Lee, C. Y. and Landreth G. E., *The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain*. J Neural Transm. 2010. 117(8): p. 949-60.
169. Njie, E. G., et al., *Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function*. Neurobiol. Aging 2012. 33: p.195.e1–12.

170. Sastre, M., Klockgether,T. and Heneka, M. T., *Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms*. Int. J. Dev. Neurosci. 2006. 24: p.167–176.
171. Lee, C. Y. and Landreth, G. E., *The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain.* J. Neural Transm, 2010. 117(8): p. 949-60.
172. Hickman, S. E., Allison, E. K., and El Khoury, J., *Microglial dysfunction and defective beta-Amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice*. J. Neurosci. 2008. 28: p. 8354–8360.
173. Van Cleemput M., et al., *Hop bitter acids efficiently block inflammation independent of GRalpha, PPARalpha, or PPARgamma*. Mol Nutr Food Res. 2009. 53(9): p. 1143-55.
174. Hougee, S., et al., *Selective inhibition of COX-2 by a standardized CO2 extract of Humulus lupulus in vitro and its activity in a mouse model of zymosan induced arthritis.* Planta Med. 2006. 72(3): p. 228-33.
175. Abdel-Salam, O. M., *Anti-inflammatory, antinociceptive, and gastric effects of Hypericum perforatum in rats.* Scientific World Journal. 2005. 5: p. 586-95.
176. Genovese, T., et al., Neuroprotection and enhanced recovery with Hypericum perforatum extract after experimental spinal cord injury in mice. Shock. 2006. 25(6): p. 608-17.
177. Hammer, K. D., et al., *Inhibition of prostaglandin E(2) production by anti-inflammatory hypericum perforatum extracts and constituents in RAW264.7 Mouse Macrophage Cells*. J Agric Food Chem. 2007. 55(18): p. 7323-31.
178. Madabushi, R., et al., *Hyperforin in St. John's wort drug interactions*. Eur J. Clin Pharmacol. 2006. 62(3): p. 225-33.
179. Dinamarca, M., et al., *Hyperforin prevents beta-amyloid neurotoxicity and spatial memory impairments by disaggregation of Alzheimer's amyloid-beta-deposits.* Mol Psychiatry, 2006. 11(11): p. 1032-48.
180. Griffith, T., et al., *Neurobiological effects of Hyperforin and its potential in Alzheimer's disease therapy.* Curr Med Chem, 2010. 17(5): p. 391-406.
181. Mukerjee, R., et al., *St. John's Wort protein, p27SJ, regulates the MCP-1 promoter*. Mol Immunol. 2008. 45(15): p. 4028-35.
182. Zhang, Z. L., et al., *Effects of Valeriana amurensis on the expressions of iNOS, COX-2 and IkappaCB-alpha in Alzheimer's disease model rat's brain*. Zhong Yao Cai. 2010. 33(4): p. 581-3.
183. Zuo, Y. M., et al., *Effects of Valeriana amurensis on the expressions of beta-APP, Abeta(1-40) and caspase-3 in Alzheimer's disease model rat's brain.* Zhong Yao Cai. 2010. 33(2): p. 233-6.
184. Silva, B. A., et al., *Neuroprotective effect of Hypericum perforatum extracts on beta-amyloid-induced neurotoxicity*. Neurotox Res. 2004. 6(2): p. 119-30.
185. Malva, J. O., Santos, S. and Macedo, T., *Neuroprotective properties of Valeriana officinalis extracts.* Neurotox Res, 2004. 6(2): p. 131-40.
186. Sudati, J. H., et al., *In vitro antioxidant activity of Valeriana officinalis against different neurotoxic agents.* Neurochem Res, 2009. 34(8): p. 1372-9.
187. Na, D. H., et al., *Evaluation of metabolism-mediated herb-drug interactions*. Arch Pharm Res 2011. 34(11): p. 1829-42.
188. Hänsel, R. and Wagener, H. H., *Attempts to identify sedative-hypnotic active substances in hops*. Arzneimittelforschung. 1967. 17(1): p. 79-81.

189. Christoffel, J., Rimoldi, G. and Wuttke, W., *Effects of 8-prenylnaringenin on the hypothalamo-pituitary-uterine axis in rats after 3-month treatment*. J Endocrinol. 2006. 188(3): p. 397-405.
190. Rosecrans, J. A., Defeo, J. J., and Youngken, H.W. Jr*., Pharmacological investigation of certain Valeriana officinalis L. extracts*. J. Pharm Sci. 1961. 50: p. 240-4190
191. Fehri, B., et al., *Valeriana officinalis and Crataegus oxyacantha: toxicity from repeated administration and pharmacologic investigations*. J. Pharm Belg. 1991. 46(3): p. 165-76.
192. Greeson, J. M., Sanford, B., and Monti, D. A., *St. John's wort (Hypericum perforatum): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature*. Psychopharmacology (Berl). 2001. 153(4): p. 402-14.
193. Venkataramanan, R., Komoroski, B. and Strom, S., In *vitro and in vivo assessment of herb drug interactions.* Life Sci. 2006. 78(18): p. 2105-15.

9. Anhang

9.1 Chemikalien

Applied Biosystems, D-Darmstadt
RNAlater®

Biozym Diagnostik GmbH, D- Hessisch Oldendorf
Agarose

Carl Roth GmbH, D-Karlsruhe
2-Mercaptoethanol; Ameisensäure ; Ammoniumperoxidase; Ampicillin; Bovines Albumin Fraktion V (BSA); Bromphenolblau; Calciumchlorid; Dinatriumhydrogenphosphat; Glycerol; Glycin; Guanidinhydrochlorid; Isopentan (2-Methyl-Butan); Kaliumchlorid; Kaliumhydrogenphosphat; Milchpulver; Natriumazid; Natriumchlorid; Natriumdodecylsulfat (SDS); Natriumhydroxid; Paraformaldehyd; Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) ; Ponceau S; Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membran; Saccharose; Salzsäure; TEMED; Tris; Tris-HCl; Triton X-100; Xylencyanol; Xylol

Ferak Laborat GmbH, D-Berlin
Trichloessigsäure

Leica/Menarini, D-Wetzlar
Paraffin (Histowax)

Medite, D-Burgdorf
Hämatoxilin; Pertex

MERCK KgaA, D-Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Ethidiumbromid; Kaliumacetat; Tween 20

Qiagen, D-Hilden
Proteinase K

Roche, CH-Basel
Proteasehemmer

Zentralapotheke, D-Rostock
Aqua dest; Essigsäure; Ethanol; IGEPAL CA-630; Isopropanol; Methanol

9.2 Geräte

Elekrophoresekammern	Selbstbau
Geldokumentationssystem	Decon Science Tec GmbH, D-Hohengandern
Mikroplatten Schüttler TITRAMAX100	Heidolph, D-Schwabach
Mikrotiterplattenleser Tecan	Tecan Group Ltd, CH-Männedorf,
Mirax Dok Slide Scanner	Zeiss MicroImaging GmbH, D-Jena
Orbital Shaker OS-20	Lab4you GmbH, D-Berlin
PerfectBlue Wet-Blot	Peqlab, D-Erlangen
Precelleys 24 Homogenisator	Peqlab, D-Erlangen
Spektrophotometer ND-1000	Peqlab, D-Erlangen
TaqMan®	Applied Biosystems, D-Darmstadt
T-Gradient - PCR Cycler	Biometra, D-Göttingen
Thermoschüttler TS-100	Lab4you GmbH, D-Berlin
Western Blot Imager - Division dBoxDecon	Science Tec GmbH, D-Hohengandern
Zentrifuge Z100M / Z323K	Hermle, D-Gosheim

9.3 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper

	Antikörper	Name	Firma
Immunhistochemie (IHC)	primär	anti-Kaninchen IBA1	Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland
		anti-human Aβ (clone 6F3D)	DAKO GmbH
Western Blot (WB)	primär	anti-ADAM10	
		anti-BACE-1	
		Aktin	Sigma-Aldrich Co., Steinfurt , Deutschland
	sekundär	anti-Kaninchen HRP gekoppelt	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland
		anti-Maus HRP gekoppelt	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland

9.4 Puffer

Carbonatpuffer (pH 11,5)

100 mM Na_2CO_3 und 50 mM NaCl; mit ddH_2O auf 100 ml auffüllen; Proteasehemmer vor Gebrauch zugeben; Lagerung bei 4°C

Guanidinpuffer 1 (pH 8,0)

5 M Guanidin/HCl und 50 mM Tris/HCl; mit ddH_2O auf 50 ml auffüllen; Lagerung bei 4°C

Guanidinpuffer 2 (pH 8,0)

8,2 M Guanidin/HCl und 82 mM Tris/HCl; mit ddH_2O auf 50 ml auffüllen; Lagerung bei 4°C

Tris-Acetat-EDTA-(TAE) Puffer (50 x)

242 g Tris, 51,7 ml Ameisensäure und 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); mit ddH_2O auf 1000 ml auffüllen

6x DNA-Ladepuffer

60 mM EDTA, 10 mM TrisHCl (pH 7,6), 0,03% Bromphenolblau, 0,03% Xylencyanol und 60% Glycerol

4x Proteinprobenpuffer

200 mM TrisHCl (pH 6,8), 40% Glycerol; 16% SDS; 4% 2-Mercaptoethanol und 0,25% Bromphenolblau; mit ddH_2O auf 10 ml auffüllen, Lagerung bei -20°C

Lysepuffer für Mausschwänze

10 mM TrisHCl (pH 9,0), 1 M KCl, 0,4% IGEPAL CA-630, 0,1% Tween 20

Protein-Extraktionspuffer I

150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 20% SDS, 0,01% IGEPAL CA-630 und 100 mM TrisHCl; Proteasehemmer vor Gebrauch zugeben; Lagerung bei 4°C

Protein-Extraktionspuffer II

150 mM NaCl, 100 mM TrisHCl und 0,1% Triton X-100; Lagerung bei 4°C

Protein-Extraktionspuffer III - Triton X-100 Lysepuffer C

50 mM Tris (pH 7,5), 0,5% Triton X-100, 137,5 mM NaCl, 10% Glycerol, 5 mM EDTA und 1% IGEPAL CA-630; Lagerung bei 4°C

10x Blotpuffer

250 mM Tris und 1,92 M Glycin; mit ddH_2O auf 1000 ml auffüllen, Lagerung bei 4°C

1x Blotpuffer

25 mM Tris, 192 mM Glycin und 20% Methanol; mit ddH_2O auf 1000 ml auffüllen, Lagerung bei 4°C

10x Tris-Buffered Saline- (TBS) Puffer

500 mM Tris und 1,5 M NaCl; mit ddH_2O auf 1000 ml auffüllen; auf pH 7,4 mit HCl einstellen

1x Tris-Buffered Saline Tween-20- (TBST) Puffer

100 ml 10x TBS und 0,01% Tween20; mit ddH_2O auf 1000ml auffüllen

Medium *Stripping*-Puffer (pH2,2)

15 g Glycin, 1 g SDS und 10 ml Tween20; mit ddH_2O auf 1000ml auffüllen, zum Benutzen frisch ansetzen

10x Phosphate-Buffered Saline- (PBS) Puffer

80 g NaCl, 2 g KCl, 14,5 g Na_2HPO_4 und 2,4g KH_2PO_4; mit ddH_2O auf 1000ml auffüllen; auf pH 7,4 mit HCl einstellen; autoklavieren

9.5 Kits

Tabelle 5: Kits

Kit	Firma, Sitz
hAmyloid β42 ELISA (HS42TK)	The Genetics Company, Schlieren, Schweiz
BCA Protein Assay Kit	PIERCE, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (ehemals Amersham Bioscience), Buckinghamshire, UK

9.6 Primer

Tabelle 6: Primer

	Nummer	Primer
APPswe-forward	4120	5` GAATTCCGACATGACTCAGG 3`
APPswe-reverse	4121	5` GTTCTGCTGCATCTTGGACA 3`

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides Statt, dass ich diese vorliegende Dissertation selbständig durchgeführt und verfasst habe. Es wurden keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet.

Die vorliegende Dissertation wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktortitels nicht vorliegt.

Rostock 19. März 2012 Andrea Volz

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. K. Kraft und Herrn Prof. Dr. Dr. J. Pahnke, die mir dieses Dissertationsthema bereitgestellt haben und mir durch Ihre freundliche Unterstützung und Ihre Kompetenz das Schreiben dieser Arbeit ermöglicht haben.

Desweiteren danke ich meiner Betreuerin Jaqueline Hofrichter, die immer und für alle Fragen eine hilfsbereite Antwort hatte, mir den Laboralltag näher brachte, mich einarbeitete und experimentell unterstützte.

Danke auch an Cathleen Lange, für so manchen Maushaus-Beistand und die moralische Unterstützung. Ebenso den restlichen „Labormäusen“ für ihre tatkräftige Hilfe in jeglicher Laborlebenslage.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden bedanken, die mir stets aufmunternd und motivierend zur Seite standen.