

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio

Universitätsmedizin Rostock
Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Rolle oxidativer Stress-assoziiierter AGEs (Advanced Glycation Endproducts) für die neuronale Replikation bei der Alzheimerschen Erkrankung

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Eingereicht von

Sophie Christin Ludwig

Rostock 2016

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger

Datum der Einreichung: 15.04.2016

Datum der Verteidigung: 18.10.2016

Gutachter:

1. Frau PD Dr. Angela Kuhla, Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie, Universitätsmedizin Rostock
2. Frau Prof. Dr. Denise Manahan-Vaughan, Institut für Physiologie, Abteilung für Neurophysiologie, Ruhr Universität Bochum
3. Herr Prof. Dr. med. Andreas Wree, Institut für Anatomie, Universitätsmedizin Rostock

„Altern ist ein hochinteressanter Vorgang: Man denkt und denkt und denkt – plötzlich kann man sich an nichts mehr erinnern.“

Ephraim Kishon

Meiner Familie

Und

Meinem Partner

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	XII
1. Einleitung.....	1
1.1 Prognose der Demenzerkrankungen.....	1
1.2 Morbus Alzheimer – die am häufigsten vertretene Demenzform.....	2
1.3 Pathomorphologische Veränderungen bei der AD	3
1.3.1 β -Amyloid und neurofibrilläre Bündel (NFTs) als typische pathologische Veränderungen bei der AD	4
1.3.2 Der Wiedereintritt der Neurone in den Zellzyklus als ein weiterer pathogenetischer Faktor bei der AD	4
1.4 Ätiologie	6
1.4.1 EOAD – Minderheit der AD-Erkrankten.....	7
1.4.2 LOAD – Hauptform der AD	7
1.4.3 ApoE4-Gen als ein Risikofaktor	7
1.5 Oxidativer Stress und Advanced Glycation Endproducts (AGEs) bei der AD....	9
1.5.1 AGE/RAGE Interaktion und die Aktivierung des Zellzyklus	12
1.5.2 Aneuploider Chromosomensatz führt zum Nervenzelltod	14
1.6 Medikamentöse Therapie der AD.....	15
1.6.1 Acetylcholinesterase-Inhibitoren (AChE-Inhibitoren) und N-Methyl-D- Aspartat-Antagonisten (NMDA-Antagonisten).....	16
1.6.2 Alpha-Liponsäure (LA) – ein Antioxidans	17
1.7 Ziele und Fragestellungen der Arbeit	19

2. Material und Methoden	20
2.1 Tiermodell und experimentelle Gruppen	20
2.2 Gewebeasservierung	22
2.3 Malondialdehydassay	24
2.4 Western Blot Analyse	25
2.5 Immunhistochemie	28
2.6 Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	30
2.6.1 Vorbereitung der Schnitte	30
2.6.2 Vorbereitung der Hybridisierungsprobe	31
2.6.3 Hybridisierung und Amplifikation	32
2.7 Statistische Analyse	33
3. Ergebnisse	34
3.1 ApoE-Defizienz durch neuronale AGE-Ablagerungen gekennzeichnet, die durch langfristige LA-Therapie reduziert werden	34
3.2 Mitogenes Potenzial im Gehirn der ApoE-defizienten Maus wird durch langfristige LA-Therapie gesenkt	36
4. Diskussion	41
4.1 Diskussion von Material und Methoden	42
4.1.1 Methode der FISH zum Nachweis aneuploider Neurone	42
4.1.2 Eignung des ApoE-Mausmodells zur Detektion pathologischer Veränderungen bei der AD	43
4.2 Diskussion der Ergebnisse	44
4.2.1 Erhöhter oxidativer Stress bei ApoE-Defizienz	44
4.2.2 Signifikante AGE-Erhöhung erst bei seneszenten Mäusen durch Beeinflussung der Glyoxalase	44
4.2.3 RAGE-Expression und -Interaktion mit seinen Liganden	45
4.2.4 AGEs wirken als mitogenes Signal und initiieren den Zellzyklus	47

4.2.5 Eignung der LA als therapeutisches Antioxidans für die AD	48
5. Zusammenfassung	50
Literaturverzeichnis	XIV
Thesen zur Dissertation	XXIII
Danksagung	XXIV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Mausmodell und Anzahl der Versuchstiere in den Versuchsabschnitten.	21
Tabelle 2.2 Verwendete primäre Antikörper für die Western Blot Analysen.....	27
Tabelle 2.3 Verwendete sekundäre Antikörper und Konjugate für die Western Blot Analysen.....	27
Tabelle 2.4 Verwendete primäre Antikörper für die Immunhistochemie.....	29
Tabelle 2.5 Verwendete sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie.	29
Tabelle 2.6 Für die Vorbereitung der Schnitte verwendete Reagenzien.	30
Tabelle 2.7 Zusammensetzung von 20x SSC.....	30
Tabelle 2.8 Zusammensetzung von PBS, pH 7,4.	31
Tabelle 2.9 Waschschritte zur Vorbereitung der Hybridisierungsprobe.	32
Tabelle 2.10 Chemikalien für die Hybridisierung und Amplifikation.....	33
Tabelle 3.1 Genomischer Inhalt der Pyramidenzellen im Hippocampus	39

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Steigende Zahlen der Demenzerkrankten weltweit von 2010 bis 2050 im Vergleich von bisherigen mit aktuellen Schätzungen (Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V.).	2
Abbildung 1.2 Anteil der unterschiedlichen Demenzerkrankungen, wobei die AD den größten Anteil stellt (Möller et al., 2009).	3
Abbildung 1.3 Aktivierung der MAPK-Signalkaskade über freie Radikale und entzündliche Prozesse, die über die Aktivierung von NFκB zur vermehrten Expression von Cyclin D1 führen und damit den Wiedereintritt der Neurone in den Zellzyklus ermöglichen, welcher letztlich zum Zelltod führt (Arendt et al., 2000).	5
Abbildung 1.4 Die Bildung von AGEs (Stirban et al., 2013).	10
Abbildung 1.5 Die direkte toxische Wirkung auf Neurone erfolgt über AGEs, die durch Apoptose, Kalzium-Einstrom, oxidativen Stress und Hemmung der oxidativen Phosphorylierung zum Zelltod führen. Die indirekte Toxizität erfolgt über inflammatorische Prozesse, die zum neuronalen Zelltod führen (Dukic-Stefanovic et al., 2001).	13
Abbildung 1.6 Mitogene Effekte der AGEs und Auswirkungen auf die MAPK-Kaskade <i>in vitro</i> (Schmidt et al., 2007). Immunzytochemische Bilder (A) von Neurobasalmedium (NB) und 1 μM HSA-AGE behandelten Primärneuronen. Repräsentative densitometrische Messungen von Cyclin D1 (37kDa; B) und pp42/44 (42/44 kDa; C) -Expression in Primärneuronen, welche mit NB, 1 μM HSA-inf., 1 μM HSA-inc. und 1 μM HSA-AGE behandelt wurden. Eine Reihe weiterer Neurone wurde mit 10 μM UO126 für 2 h, gefolgt von der Applikation von 1 μM HSA-AGE, vorinkubiert. Zu beachten ist, dass nur HSA-AGE behandelte Neurone einen Einbau von BrdU zeigten (A, untere Abbildung, Pfeile). In Übereinstimmung zeigten HSA-AGE behandelte Neurone einen signifikanten Anstieg der Cyclin D1 und pp42/44 Expression, die jeweils deutlich durch die Applikation von UO126 reduziert wurde (B und C). Alle Werte wurden 3 unabhängigen Messungen entnommen. Die Mittelwerte ± Standardabweichung des Mittelwertes; einfache ANOVA, Post-hoc-Paarweisevergleichstest: *p <0,05 versus NB; §p <0,05 versus HSA-inf; ^{et} p <0,05	

versus HSA-inc; #p <0,05 versus HSA-AGE. Abkürzungen: AGEs, Advanced Glycation Endproducts; ANOVA, Varianzanalyse; HSA, Humanserumalbumin.	14
Abbildung 1.7 Kolokalisation aneuploider Neurone mit AGEs (Schmidt et al, 2007). Repräsentative Kolokalisation von CML-AGE-Färbung und chromogener <i>in situ</i> Hybridisierung (CISH) in Pyramidenneuronen des Hippocampus von AD-Gehirnen (A, obere Abbildungen, Vergrößerung x1000). Zu beachten ist das Vorliegen von 3 oder mehr Hybridisierungssignalen (Pfeile, alle Zellen sind im Locus coeruleus lokalisiert, n=4), die im Nukleus die DNA-Replikation anzeigt. Die quantitative Analyse zeigt, dass mehr als 10% der CML-AGE positiven Neurone im AD-Gehirn 3 oder mehr Hybridisierungssignale aufweisen (B). Repräsentative Kolokalisation von CML-AGE-Färbung und CISH im Kontrollgehirn (A, untere Abbildungen, Vergrößerung x1000), in welchem die Anzahl der Hybridisierungssignale das Maximum von 2 Signalen nicht übertrifft. Zusätzlich sind mehr als 32% der Neurone AGE positiv (B, schwarze Balken), die aber keine Polyploidie aufweisen (B, n.d., nicht messbar). Die Werte sind als Prozentangabe der gezählten Neuronen pro Gesichtsfeld angegeben. Abkürzungen: AD, Alzheimer's Disease; AGEs, Advanced Glycation Endproducts; CML, Carboxymethyllysine.	15
Abbildung 1.8 Schematische Darstellung der Behandlung der AD mit den Empfehlungsgraden (A,B,C) aus S3-Leitlinie „Demenzen“, 2009.	17
Abbildung 1.9 Biologische Effekte der LA (Shay et al., 2009).	18
Abbildung 2.1 Aufbau synthetisch hergestellter LA (Shay et al., 2009).	21
Abbildung 2.2 Die Bilder A - H zeigen den Ablauf der Schnittführung bei der Gehirnaufbereitung. Das Hirn (A) wurde zuerst im Bereich des Sinus sagittalis in 2 Hälften getrennt (B und D). Für die Immunhistochemie wurde eine Hirnhälfte quer zum Sulcus sagittalis in Höhe des Hippocampus halbiert (D). Beide Viertel wurden mit dieser Schnittfläche nach unten in einem Cryomold nebeneinander platziert (E-H).	23
Abbildung 2.3 Reaktionsgleichung von MDA mit NMPI zum Carbocyaninfarbkomplex.	24
Abbildung 3.1 Erfassung der oxidativen Stress-assoziierten AGEs <i>in vivo</i> . Quantitative MDA Analyse im Plasma (A) und repräsentativer Western Blot sowie densitometrische Messungen der AGEs (60kDa; B) in Gehirnen von 8, 24 und 78	

Wochen alten C57BL6/J- (Wildtyp; wt, n=21) und ApoE-defizienten Mäusen (ApoE^{-/-}, n=21). Eine weitere Gruppe ApoE^{-/-} Mäuse erhielt ab einem Alter von 4 Wochen für weitere 74 Wochen (n=7; 78 Wochen) täglich 20mg/kg LA pro Maus. Die Signale wurden mithilfe von β -Aktin normiert. Die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes; zweifache ANOVA, Post-hoc-Paarweisevergleichstest: *p <0,05 versus WT-Maus; §p <0.05 versus 8 Wochen alte Maus; #p <0,05 versus ApoE^{-/-} Maus. Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von AGE gefärbten Hirngewebsschnitten von 78 Wochen alten WT-, ApoE^{-/-} und LA-behandelten ApoE^{-/-} Mäusen (C, tatsächliche Vergrößerung x400). Zu beachten ist die starke AGE-Anfärbung in den Pyramidenzellen der 78 Wochen alten ApoE^{-/-} Maus (C, mittlere Abbildung, eingefügte Übersicht), welche sich deutlich vom Bild mit LA-Therapie unterscheidet. Abkürzungen: AGEs, Advanced Glycation Endproducts; ANOVA, Varianzanalyse; MDA, Malondialdehyd; LA, Alpha-Liponsäure..... 36

Abbildung 3.2 Evaluation des AGE-abhängigen RAGE-MAPK-Signalweges *in vivo*. Repräsentativer Western Blot und densitometrische Messungen von RAGE (50 kDa; A) und von Phospho p42/44 (42/44 kDa; B)) in Gehirnen von jeweils 8, 24 und 78 Wochen alten C57BL6/J- (Wildtyp; wt, n=21) und ApoE^{-/-} Mäusen (ApoE^{-/-}, n=21). Eine weitere Gruppe ApoE^{-/-} Mäuse erhielt ab einem Alter von 4 Wochen für weitere 74 Wochen (n=7; 78 Wochen) täglich 20mg/kg LA pro Maus. Die Signale wurden mithilfe von β -Aktin normiert. Die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes; zweifache ANOVA, Post-hoc-Paarweisevergleichstest: *p <0,05 versus WT-Maus; Abkürzungen: AGEs, Advanced Glycation Endproducts; ANOVA, Varianzanalyse; LA, Alpha-Liponsäure..... 37

Abbildung 3.3 Mitogene Wirkungen der AGEs *in vivo*. Repräsentativer Western Blot und densitometrische Messungen von Cyclin D1 (37 KDa; A) in Gehirnen von 8, 24 und 78 Wochen alten C57BL6/J Mäusen (Wildtyp; wt, n=21) und ApoE-defizienten Mäusen (ApoE^{-/-}, n=21). Eine weitere Gruppe ApoE-defizienter Mäuse erhielt ab einem Alter von 4 Wochen für weitere 74 Wochen (n=7; 78 Wochen) täglich 20mg/kg LA pro Maus. Die Signale wurden mithilfe von β -Aktin normiert. Die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes; zweifache ANOVA, Post-hoc-Paarweisevergleichstest: *p <0,05 versus WT-Maus; #p <0,05 versus ApoE^{-/-} Maus. Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Cyclin D1 gefärbten

Hirngewebsschnitten (B, tatsächliche Vergrößerung x400) und Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von FISH-Hybridisierungssignalen (C, tatsächliche Vergrößerung x1000) der 78 Wochen alten WT-, ApoE^{-/-} und LA-behandelten ApoE^{-/-} Maus. Zu beachten ist die starke Cyclin D1-Anfärbung der Neurone des Hippocampus (B, mittlere Abbildung, DAB Chromogen gefärbte Neurone) und die mehr als 3 Hybridisierungssignale, die eine Polyploidie anzeigen (C, mittlere Abbildung, Pfeile, grün zeigt Hybridisierungssignale an und blau zeigt 4',6-Diamidino-2-Phenylindol gefärbte Zellkerne an) in Gehirnen der 78 Wochen alten ApoE^{-/-} Maus. Abkürzungen: AGEs, Advanced Glycation Endproducts; ANOVA, Varianzanalyse; MDA, Malondialdehyd; LA, Alpha-Liponsäure. 40

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholin-Esterase
AD	Alzheimer's disease
AGE	Advanced Glycation Endproduct
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE-/-	ApoE-Defizienz
APP	Amyloid-Precursor-Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
BrdU	Bromdesoxyuridin
Cdk	Cyclin dependent Protein Kinases
CREB	cAMP Response Element-Binding Protein
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EOAD	Early Onset Alzheimer's disease
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
HSA-AGE	Humanserumalbumin-AGE
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
KG	Körpergewicht
LA	Alpha-Liponsäure
LOAD	Late onset Alzheimer's disease
MAP	Mikrotubuli-assoziierte Proteine

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCI	Mild Cognitive Impairment
MDA	Malondialdehyd
NFT	Neurofibrilläre Bündel
NFκB	Nuclear Factor κB
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronal Nitric Oxid Synthase
RAGE	Receptor of Advanced Glycation Endproducts
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween
WT	Wildtyp

1. Einleitung

„Wie heißen Sie?“
„Auguste.“
„Familiennamen?“
„Auguste.“
„Wie heißt ihr Mann?“
„Ich glaube... Auguste.“

- Alois Alzheimer -

Vor mehr als 100 Jahren entdeckte der Neuropathologe und Psychiater Alois Alzheimer bei seiner Patientin Auguste Deter eine für ihn merkwürdige Erkrankung. Der frühe Gedächtnisverlust seiner Patientin verwunderte ihn, sodass er sich das Gehirn von Auguste nach ihrem Tod schicken ließ und es mikroskopierte. 1906 hielt er bei einer Tagung Südwestdeutscher Irrenärzte einen Vortrag „über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ (Alzheimer Forschung Initiative e.V., 2010). Jedoch galt die Krankheit damals als Rarität, sodass die Ärzte und Wissenschaftler sich kaum für seine Ausführungen interessierten (Alzheimer Forschung Initiative e.V., 2010).

1.1 Prognose der Demenzerkrankungen

Ein Jahrhundert später erklärt Ron Brookmeyer 2007 bei der internationalen Konferenz zur Prävention von Demenzerkrankungen: *„Wir stehen einer globalen Alzheimer-Epidemie gegenüber, da die Weltbevölkerung im Schnitt immer älter wird“*. In seiner Studie stellte der Professor für Biostatistik heraus, dass sich die Zahl der Alzheimer-Patienten bis 2050 auf ca. 106 Millionen vervierfachen soll (Brookmeyer et al., 2007). In Deutschland sind gemäß dem Bundesministerium für Familien, Senioren, Frauen und Jugend derzeit ca. 1,4 Millionen Männer und Frauen betroffen. Das Risiko, an einer Demenz zu erkranken, steigt mit dem Alter. In Deutschland soll die Anzahl der Erkrankten laut Schätzungen auf 3 Millionen anwachsen (Rautenberg, 2014). Dabei sind, wahrscheinlich durch die höhere Lebenserwartung bedingt, rund 70% der Erkrankten Frauen. Aktuelle Untersuchungen zeigen sogar, dass die Zahl der Demenzkranke, noch höher als bisher angenommen, auf eine Anzahl von 135

Millionen Betroffenen weltweit bis 2050 steigen soll (siehe Abbildung 1.1). Somit steht das 21. Jahrhundert im Zeichen neurodegenerativer Erkrankungen.

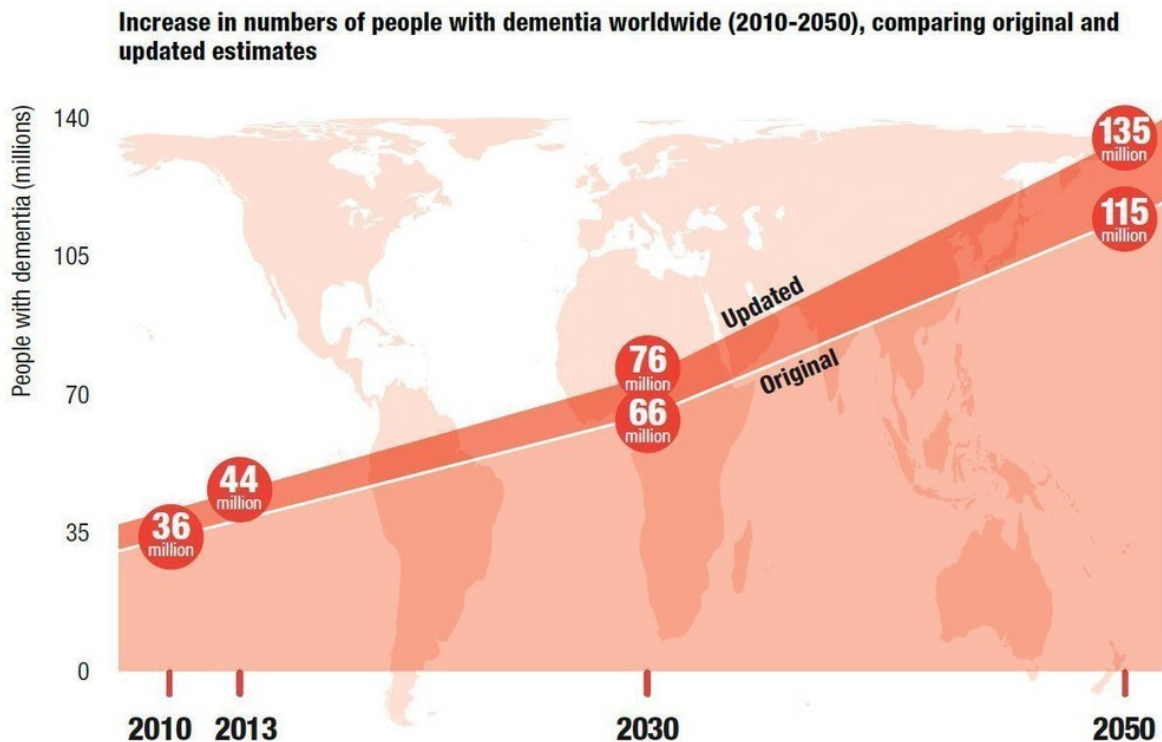


Abbildung 1.1 Steigende Zahlen der Demenzkranken weltweit von 2010 bis 2050 im Vergleich von bisherigen mit aktuellen Schätzungen (Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V.).

1.2 Morbus Alzheimer – die am häufigsten vertretene Demenzform

Laut der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10) bezeichnet eine Demenz ein „*Syndrom als Folge einer meist chronischen oder fortschreitenden Krankheit des Gehirns mit Störung vieler höherer kortikaler Funktionen, einschließlich Gedächtnis, Denken, Orientierung, Auffassung, Rechnen, Lernfähigkeit, Sprache und Urteilsvermögen.*“ Die wesentlichen Voraussetzungen für die Diagnose ist der Nachweis einer Abnahme des Gedächtnisses und des Denkvermögens mit signifikanter Beeinträchtigung der Aktivitäten des täglichen Lebens (S3-Leitlinie „Demenzen“, 2009). Außerdem müssen die Symptome nach ICD-10 für die Diagnosestellung für mindestens 6 Monate bestehen. Veränderungen der emotionalen Kontrolle, des Sozialverhaltens oder der Motivation sind, neben den kognitiven Einschränkungen, vor allem bei der Alzheimerschen Erkrankung (AD) oder bei Gefäßerkrankungen des Gehirns

auftretende Symptome (S3-Leitlinie „Demenzen“, 2009). Die Ursachen für eine Demenz sind vielfältig, woraus verschiedene Formen resultieren. Die AD stellt dabei den weitaus größten Anteil mit 55-70% (siehe Abbildung 1.2).

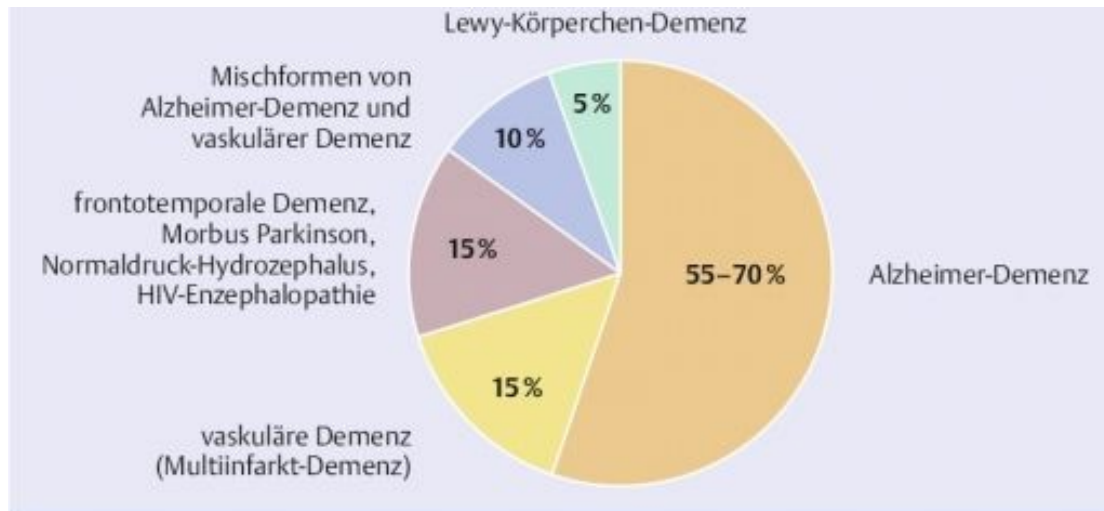


Abbildung 1.2 Anteil der unterschiedlichen Demenzerkrankungen, wobei die AD den größten Anteil stellt (Möller et al., 2009).

Bei der AD handelt es sich um eine primär degenerative, zerebrale Krankheit mit charakteristischen, neuropathologischen und neurochemischen Merkmalen.

1.3 Pathomorphologische Veränderungen bei der AD

Die klinischen Symptome bei der AD entstehen durch einen Nervenzellverlust, der vorwiegend im Temporal- und Parietallappen auftritt und zur Schrumpfung des Gehirns um bis zu 20% beiträgt (Alzheimer Gesellschaft Leipzig e.V.). Makroskopisch imponieren tiefere Windungsfurchen, bedingt durch eine Abnahme der Hirnwindungen hinsichtlich der Masse. Intrazerebral tritt eine Erweiterung der Liquorräume auf, woraus im Rahmen des Nervenzellverlustes eine Hirnatrophie resultiert (Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V., 1999). Durch den Nervenzelluntergang kommt es außerdem zur verminderten Synthese und Freisetzung bestimmter neuronaler Botenstoffe. So bedingt bspw. die Abnahme des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh), der vom Nucleus basalis Meynert gebildet wird, den typischen Gedächtnisverlust (Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V., 1999). Neben den makroskopischen und biochemischen Veränderungen treten auch typische mikroskopische Pathologien auf, die charakteristisch für die AD sind.

1.3.1 β -Amyloid und neurofibrilläre Bündel (NFTs) als typische pathologische Veränderungen bei der AD

Mikroskopisch treten in AD-Gehirnen die typischen β -Amyloidablagerungen und die NFTs auf, die schon Alois Alzheimer 1906 beschrieb und die noch heute die Grundlage für eine endgültige post-mortem Diagnose der Krankheit darstellen (Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V., 1999). Bei erkrankten Gehirnen ist der Abbau des β -Amyloids bedingt durch ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Elimination fehlerhaft, wodurch es zu einer Plaquebildung und Plaqueablagerung kommt (Hardy & Selkoe, 2002), die vorwiegend im Bereich des Isokortex stattfindet (Braak & Braak, 1991). Diese β -Amyloidablagerungen führen, wie auch die NFTs, über die Nervenzelldegeneration letztlich zur Demenz (Hardy & Selkoe, 2002). Bei den NFTs wirkt insbesondere die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins toxisch auf Neurone (Bu, 2009) und führt zu einer strukturellen Destabilisierung der Mikrotubuli (Gustke et al., 1992). Daraus resultierende Folgen sind die Zerstörung des Transportsystems und letztendlich das Absterben der Nervenzelle. Neben den dargestellten Pathomorphologien spielt auch der Wiedereintritt der Neurone in den Zellzyklus eine wichtige Rolle im Pathomechanismus der AD.

1.3.2 Der Wiedereintritt der Neurone in den Zellzyklus als ein weiterer pathogenetischer Faktor bei der AD

Bereits 1991 zeigten Braak & Braak, dass ein enger Zusammenhang zwischen dem Wiedereintritt der Neurone in den Zellzyklus und dem Zelltod von Neuronen im Hippocampus, sowie im frontalen, okzipitalen und temporalen Kortex besteht. In diesen Regionen des Gehirns treten einige Neuronen aus der G0 in die G1 Phase und verbleiben am Übergang von G1/S oder G2/M (Arendt, 2000; Nagy, 2000; Kruman, 2004), obwohl enddifferenzierte Neuronen in der G0 Phase verharren. Das Passieren dieser Kontrollpunkte wird durch Signalproteine (siehe Abbildung 1.3) wie bspw. Cyclin D1, ein G1 Phase-Marker, Cyclin E, ein G2 Phase-Marker (Hoozemans et al., 2002) und der CdK Inhibitor p16, ein Protein, das den Wiedereintritt in den Zellzyklus signalisiert (Mc Shea et al., 1997), ermöglicht. Diese Zellzyklusproteine sind in erkrankten Neuronen pathologisch erhöht und führen so vermehrt zum Wiedereintritt. Außerdem fördert vermutlich auch die Dysregulation der Zellzyklus-

Kinasen, vor allem CdK 2 und CdK 5, das Fortschreiten der AD (Baumann et al., 1993; Lew & Wang, 1995; Vincent et al., 1997).

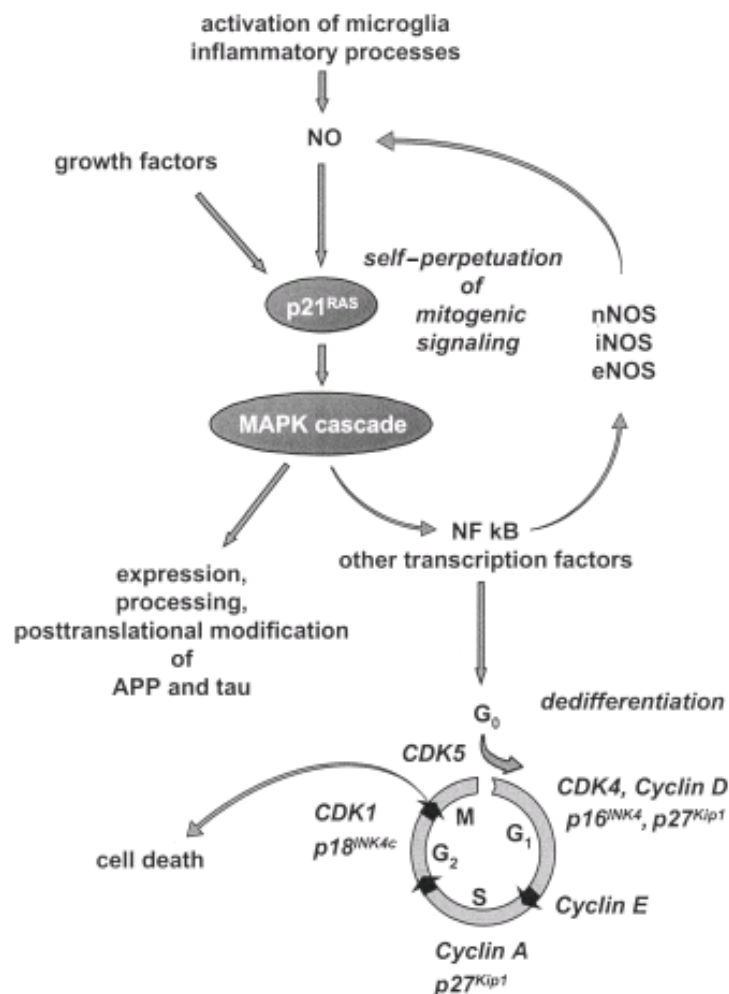


Abbildung 1.3 Aktivierung der MAPK-Signalkaskade über freie Radikale und entzündliche Prozesse, die über die Aktivierung von NFκB zur vermehrten Expression von Cyclin D1 führen und damit den Wiedereintritt der Neurone in den Zellzyklus ermöglichen, welcher letztlich zum Zelltod führt (Arendt et al., 2000).

Der Wiedereintritt der Neurone in den Zellzyklus resultiert in der Bildung eines polyploiden Genoms, weil die Zellteilung in der Mitosephase nicht beschränkt wird, was letztlich zum Nervenzelluntergang führt (siehe Abbildung 1.3). Yang et al. (2001) fanden einen Beweis für den Eintritt von Neuronen in den Zellzyklus bei an AD erkrankten Gehirnen und schlussfolgerten, dass der Nervenzelltod durch das chromosomale Ungleichgewicht, das durch das aneuploide Genom von 3 bis 4 Chromosomensätzen hervorgerufen wird, ursächlich ist. Bei diesem Prozess überleben die Neurone viele Monate in jenem Zustand, bevor sie durch einen

unbekannten Mechanismus in den Zelltod durch Apoptose geführt werden (Yang et Herrup, 2005). Im gesunden Gehirn befinden sich Neurone mit einem tetraploiden Chromosomensatz nicht in einem aktiven Zyklus und sind meist das Ergebnis einer Chromosomen-Fehlteilung während der Mitose (Mosch et al., 2007). Bei der AD können einige Neuronen wieder in den Zellzyklus eintreten und ihn mit einer kompletten DNA-Replikation vollständig durchlaufen (Mosch et al., 2007), ohne die Zellteilung zu bewältigen, was im Nervenzelluntergang resultiert.

Als Initiator des Zellzyklus führt Cyclin D1 über den Zellzykluswiedereintritt und das Nichtbeschreiten der Mitosephase letztlich zum Nervenzelltod. In diesem Zusammenhang konnten Dukic-Stefanovic et al. (2001) feststellen, dass, verglichen mit altersgleichen gesunden Gehirnen, eine signifikant erhöhte Anzahl Cyclin D1 positiver Neurone bei Gehirnen mit einer leichten Störung der Kognition (Mild Cognitive Impairment, MCI) und mit AD einhergingen. Yang et al. beschrieben 2003 den Zellzyklus-induzierten Nervenzelltod als ein zentrales Merkmal der MCI.

Fraglich ist, welche Faktoren verantwortlich für diesen Zellzykluswiedereintritt sind und ob auch ätiopathogenetische Faktoren bei diesem Mechanismus eine Rolle spielen. Mit Sicherheit ist festzustellen, dass weder die Pathogenese noch die Ätiologie der AD bis heute vollständig geklärt sind.

1.4 Ätiologie

Die AD beginnt meist schleichend und entwickelt sich langsam aber stetig über einen Zeitraum von mehreren Jahren, wobei man einen frühen von einem späten Krankheitsbeginn unterscheidet (S3-Leitlinie „Demenzen“, 2009), sodass die familiäre („Early Onset Alzheimer’s Disease“, EOAD) von der sporadischen („Late Onset Alzheimer’s Disease“, LOAD) Form abgegrenzt werden kann. Es existiert derzeit in der Diagnostik oder Therapie hinsichtlich der Pathophysiologie keine grundsätzliche Unterscheidung der beiden Formen mit Ausnahme der genetischen, autosomal-dominanten Varianten der AD (S3-Leitlinie „Demenzen“, 2009).

1.4.1 EOAD – Minderheit der AD-Erkrankten

Die EOAD macht 6-7% der AD-Patienten aus (Bauer, 1994) und ist durch einen frühen Beginn gekennzeichnet, d.h. das Erkrankungsalter liegt vor dem 65. Lebensjahr (S3-Leitlinie „Demenzen“, 2009). Zusätzlich zur charakteristischen und vergleichsweise raschen Verschlechterung des Verlaufs bestehen deutliche und vielfältige Störungen höherer kortikaler Funktionen (S3-Leitlinie „Demenzen“, 2009). Bisher sind 3 Gene bekannt, die bei der autosomal-dominant vererbten Form mutiert sein können, wobei 2% aller Fälle dominant vererbt werden (Deutsche Alzheimer Gesellschaft, 1999). Dies betrifft zum einen das Präsenilin 1- und Präsenilin 2 Gen, die auf dem Chromosom 14 bzw. 1 lokalisiert sind, und zum anderen das Amyloid-Precursor-Protein (APP-Gen) auf dem Chromosom 21 (Deutsche Alzheimer Gesellschaft, 1999). Die Mutationen beeinflussen das APP, welches maßgeblich an der modifizierten Herstellung und Ablagerung von β -Amyloid beteiligt ist (Huang, 2011).

1.4.2 LOAD – Hauptform der AD

Bei der LOAD, die für über 90% der AD-Fälle verantwortlich ist, findet der Beginn jenseits des 65. Lebensjahres statt. Typisch sind hier die langsam fortschreitende Progredienz und die Gedächtnisstörung als das Hauptmerkmal (S3-Leitlinie „Demenzen“, 2009). Das Alter stellt den größten Risikofaktor dar (Finckh, 2006). Darüber hinaus erhöht das ApoE4-Gen das Erkrankungsrisiko. Das Gen ist dabei an der Regulation des Transportes von Fettsäuren beteiligt. Studien konnten zeigen, dass etwa 50% aller AD-Patienten Träger dieser Genvariante sind, was jedoch nicht bedeutet, dass jeder Träger der ApoE4-Variante an der AD erkrankt (Alzheimer Forschung Initiative e.V., 2013). Weitere Risikofaktoren für die LOAD konnten bisher nicht identifiziert werden (Finckh, 2006).

1.4.3 ApoE4-Gen als ein Risikofaktor

Im Jahr 1993 entdeckten Strittmatter et al. das ϵ 4-Allel des ApoE-Gens, welches einen wichtigen Pathogenitätsfaktor bei der LOAD darstellt. Das humane ApoE-Gen befindet sich auf dem Chromosom 19 und kodiert für ein 34 kDa kleines Lipoprotein (Poirier, 2000), das ApoE-Protein, welches im Plasma zirkuliert (Raichlen & Alexander, 2014). Es ist beteiligt am Cholesteroll-Transport und der Lipid-Clearance,

an Zellreparaturprozessen, am Nervenzellwachstum und der Reinnervation (Irizarry et al., 2000). Synthetisiert wird es vor allem in der Leber und im Gehirn von Astrozyten und Mikroglia (Bales et al., 1999). Es gibt 3 Allelvarianten des ApoE-Gens ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$), die sich allein durch eine Punktmutation unterscheiden und damit eine unterschiedliche Bindungsaffinität vom ApoE-Protein zu den LDL-Rezeptoren aufweisen (Raichlen & Alexander, 2014). Aus den 3 Isoformen resultieren 6 unterschiedliche Genotypen ($\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$), wobei das $\epsilon 3$ -Allel mit 77% (Huang, 2011) am häufigsten auftritt. Dem $\epsilon 2$ -Allel wird eine protektive Wirkung gegen die AD zugesprochen, wohingegen das $\epsilon 4$ -Allel mit einem frühen Erkrankungsbeginn assoziiert ist (Irizarry et al., 2000). Die Häufigkeit des $\epsilon 4$ -Allels beträgt in der gesamten Population 15%, während diese bei AD-Patienten auf über 40% ansteigt (Bu, 2009). Corder et al. (1993) zeigten, dass homozygote $\epsilon 4$ -Allelträger im Alter von 85 Jahren ein Risiko von 50-90% haben an der AD zu erkranken, während die heterozygoten Träger nur ein 45%iges Risiko besitzen (Huang, 2011; Bu, 2009). Ein Grund dafür ist, dass ApoE4 bevorzugt große Lipoproteine bindet (Bu, 2009), welche zu einer Erhöhung des Cholesterolspiegels führen und folglich zur Bildung von arteriosklerotischen Plaques in den Arterien beitragen (Raichlen & Alexander, 2014). Diese Plaques sind nicht nur Ursache für Demenzen, sondern auch maßgeblich an einem höheren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Schlaganfälle beteiligt (Raichlen & Alexander, 2014). Zusätzlich belegen Untersuchungen, dass das ApoE4-Gen die AD-Pathogenese direkt über die Regulation des Fettstoffwechsels und der Synaptogenese durch die ApoE-Rezeptoren, sowie die Regulierung des β -Amyloid Stoffwechsels und deren Aggregation beeinflusst (Bu, 2009; Poirier, 2000). Es wird vermutet, dass eine erhöhte ApoE4-Expression in AD-Gehirnen die Hyperphosphorylierung von Tau begünstigt (Bu, 2009). Außerdem soll der intramolekulare Bereich des ApoE4-Gens verantwortlich für dessen Fähigkeit zur β -Amyloid Bildung, Verstärkung des β -Amyloid-induzierten lysosomalen Verlusts, Apoptose und für die Anfälligkeit zur Proteolyse sein (Huang, 2011). Das ApoE4-Gen ist somit beteiligt am fehlerhaften Abbau des β -Amyloids (Masliah et al., 1995). Zudem induziert β -Amyloid die Lipidperoxidation der Plasmamembranen und deren Produkte (Gella & Durany, 2009). Diese Lipide werden durch reaktive Sauerstoffradikale (ROS) modifiziert,

sodass eine enge Korrelation zwischen Lipidperoxiden, antioxidativen Enzymen, β -Amyloid-Plaques und NFTs besteht (Gella & Durany, 2009). Folglich weisen die Träger des ApoE4-Gens einen höheren Gehalt an oxidativem Stress auf, der besonders bei Krankheiten wie der AD eine Rolle spielt (Colton et al., 2002).

1.5 Oxidativer Stress und Advanced Glycation Endproducts (AGEs) bei der AD

Das Vorliegen von oxidativem Stress ist zusätzlich zu den bekannten Pathogenesen, wie den senilen Plaques und den NFTs, ein Charakteristikum bei der AD (Praticò, 2008). Ergebnisse weisen daraufhin, dass oxidativer Stress eine der ersten Veränderungen sein könnte, die während des Beginns und der Entwicklung der AD auftreten (Zhao & Zhao, 2013). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass der oxidative Stress im Alter zunimmt und damit das Risiko, eine AD zu entwickeln, erhöht. Als oxidativen Stress bezeichnet man eine Stoffwechsellage, bei der ein Ungleichgewicht zwischen oxidativen und reduzierenden Stoffen auftritt, das die Reparatur- und Entgiftungsfunktion einer Zelle stört, was wiederum zur Schädigung der Zelle führt. Hierbei werden ROS gebildet, die im Rahmen von mitochondrialen Elektronentransportketten und den Cytochrom-P450-Oxidasen entstehen. Erhöhter oxidativer Stress bei ApoE-defizienten Mäusen, welche für den ApoE4-Polymorphismus stehen, konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden (Suchy et al., 2009; Yi & Maeda, 2006). Den Nachweis für die Erhöhung des oxidativen Stresses liefern bestimmte Proteine, wie z.B. das Malondialdehyd (Gella & Durany, 2009), das als Abbauprodukt von mehrfach ungesättigten Fettsäuren entsteht. Charakteristische Merkmale degenerativer Krankheiten sind ein Circulus vitiosus bzw. positive Feedbackmechanismen. Während Zellbestandteile im Alter vermehrt akkumulieren, sind gleichzeitig die natürlichen Abwehrmechanismen der Zelle abgeschwächt, sodass die pathologische Anhäufung der Zellbestandteile nicht beseitigt werden kann, was zum Funktionsverlust der Zelle und letztendlich zum Zelltod führt (Gella & Durany, 2009). Gella und Durany (2009) glauben, dass besonders AGEs einen dieser Faktoren im Circulus vitiosus repräsentieren. Folglich sind diese aktiv am Zelltod von Neuronen beteiligt und haben schädliche Wirkungen auf die Zellen. So verursachen die AGEs durch Interaktion mit ihrem Rezeptor einen

erhöhten oxidativen Stress. In diesem Zusammenhang ist ebenfalls bekannt, dass der oxidative Stress die Bildung von AGEs begünstigt (Li et al., 2012).

AGEs sind dabei posttranslational modifizierte Proteine und entstehen in einer nicht-enzymatischen Reaktion zwischen Kohlenhydraten und Proteinen, bei der die primäre Aminogruppe mit den freien Aldehydgruppen unter Bildung einer Schiff'schen Base bis hin zum Amadori Produkt reagiert (siehe Abbildung 1.4). Durch Oxidation entstehen Carbonylintermediate, welche mit weiteren Aminosäuren zu heterozyklischen Verbindungen reagieren (Srikanth et al., 2011).

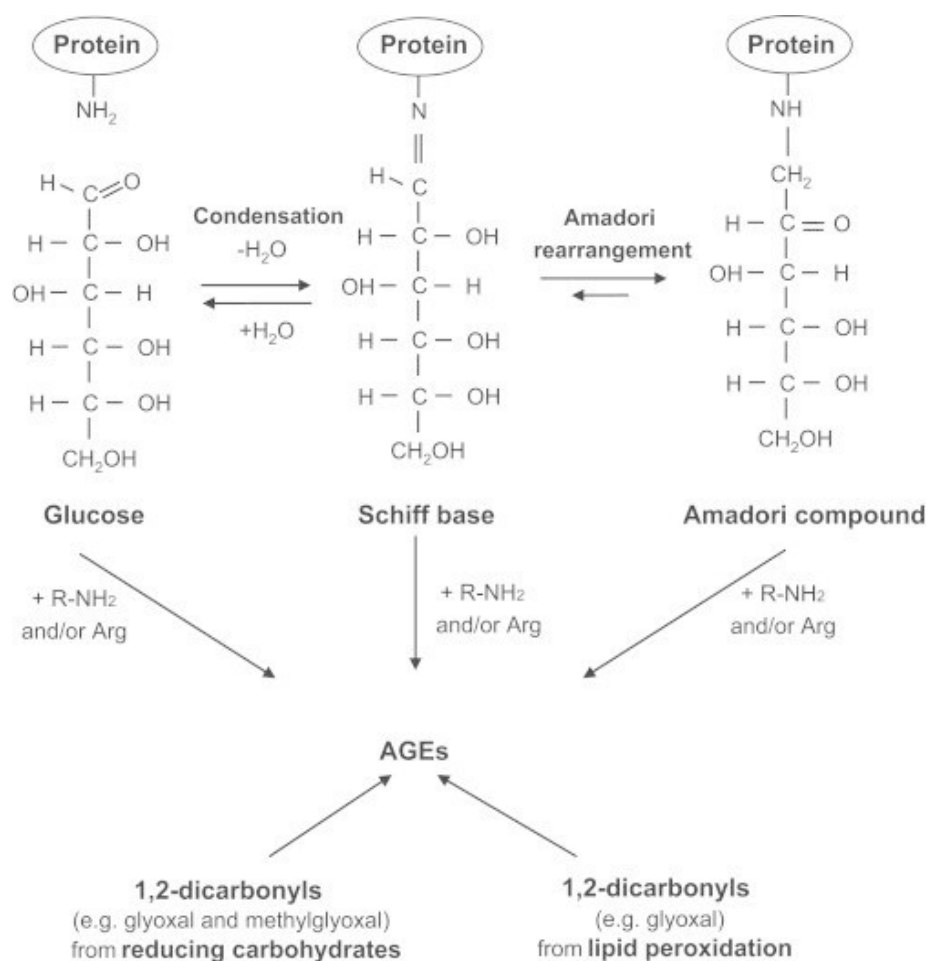


Abbildung 1.4 Die Bildung von AGEs (Stirban et al., 2013).

Die ersten Publikationen über AGEs bei der AD gehen auf das Jahr 1994 zurück, in denen gezeigt wurde, dass die β -Amyloid-Plaques in den betroffenen Gehirnen einen höheren Gehalt an AGEs aufweisen als in gleichaltrigen Kontrollen (Vitek et al.

1994). Während einige Autoren meinen, dass AGEs einen späten Marker der AD darstellen (Mattson et al., 1995), hat sich nun weitgehend durchgesetzt, dass die AGE-Ablagerungen früh und aktiv am Verlauf der neurodegenerativen Erkrankung beteiligt sind (Smith et al., 1995). Diese Beteiligung beruht einerseits auf unlöslichen, modifizierten Proteinablagerungen und andererseits auf der verstärkten inflammatorischen Antwort (Smith et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass die Polymerisation der β -Amyloid Proteine wesentlich durch die Vernetzung mit den AGEs beschleunigt wird (Srikanth et al., 2011). So konnten mehrere Studien die Präsenz der AGEs in Verbindung mit den für die AD typischen Proteinen β -Amyloid (Vitek et al., 1994) und MAP-Tau (Yan et al., 1994; Lüth et al., 2005; Srikanth et al., 2011) sowie zum ApoE-Protein nachweisen (Li & Dickson, 1997). Einen pathogenetischen Effekt bei der AD könnte in diesem Zusammenhang auch die dreimal stärkere Bindung der ApoE4-Isoform zu AGE-modifizierten Proteinen im Vergleich zur ApoE3-Isoform hervorrufen (Li & Dickson, 1997).

Während intrazelluläre AGEs über die Bindung von Zytoskelettproteinen die zellulären Funktionen inklusive der Transportprozesse behindern und damit zu Funktionsstörungen der Neurone und schließlich zum Zelltod führen, bewirken die extrazellulären AGE-Ablagerungen chronischen oxidativen Stress in den Neuronen und aktivieren zudem in Gliazellen die Produktion von freien Radikalen (Srikanth et al., 2011) und neurotoxischen Zytokinen (Dukic-Stefanovic et al., 2001). Auch die Bindung der AGEs an ihren Rezeptor, den „Receptor of Advanced Glycation Endproducts“ (RAGE), führt zur Bildung von Superoxidradikalen und Wasserstoffperoxid (Srikanth et al., 2011). Lüth et al. (2005) zeigten, dass AGE-Ablagerungen in enger Nachbarschaft zu der „neuronal Nitric Oxid Synthase“ (nNOS) und auch der Caspase-3, einem Marker für den apoptotischen Zelltod, auftreten. Zudem können hochgradig veränderte AGEs die Lebensfähigkeit einer Zelle reduzieren und einen Übergang in die Apoptose hervorrufen (Bigl et al., 2008). Weiterhin konnte man feststellen, dass der Anteil AGE-positiver Neurone mit dem Alter und dem Stadium der AD (Braak-Stadien) ansteigt (Lüth et al., 2005; Srikanth et al., 2011).

1.5.1 AGE/RAGE Interaktion und die Aktivierung des Zellzyklus

Die Aktivierung der Mikroglia über den Rezeptor RAGE durch dessen Liganden, besonders durch AGEs und β -Amyloid, führt zur Bildung von proinflammatorischen Mediatoren wie bspw. freien Radikalen und Zytokinen (Berbaum et al., 2008), welche die Entzündung im Gehirn verstärken, den oxidativen Stress erhöhen und letztendlich zu Funktionsstörungen der Neurone führen (Srikanth et al., 2011). So können bspw. die AGEs die Bildung proinflammatorischer Mediatoren über den nukleären Faktor κ B (NF κ B) abhängigen Signalweg initiieren (Srikanth et al., 2011). Mittels der Stimulation des p42/44 MAPK-Signalweges wird der Transkriptionsfaktor „cAMP response element-binding protein“ (CREB) oder NF κ B aktiviert (siehe Abbildung 1.5), welcher nicht nur Entzündungsmarker, sondern auch Zellzyklusproteine wie Cyclin D1 aktivieren kann (Arendt et al., 1995, 2000; Gartner et al., 1999).

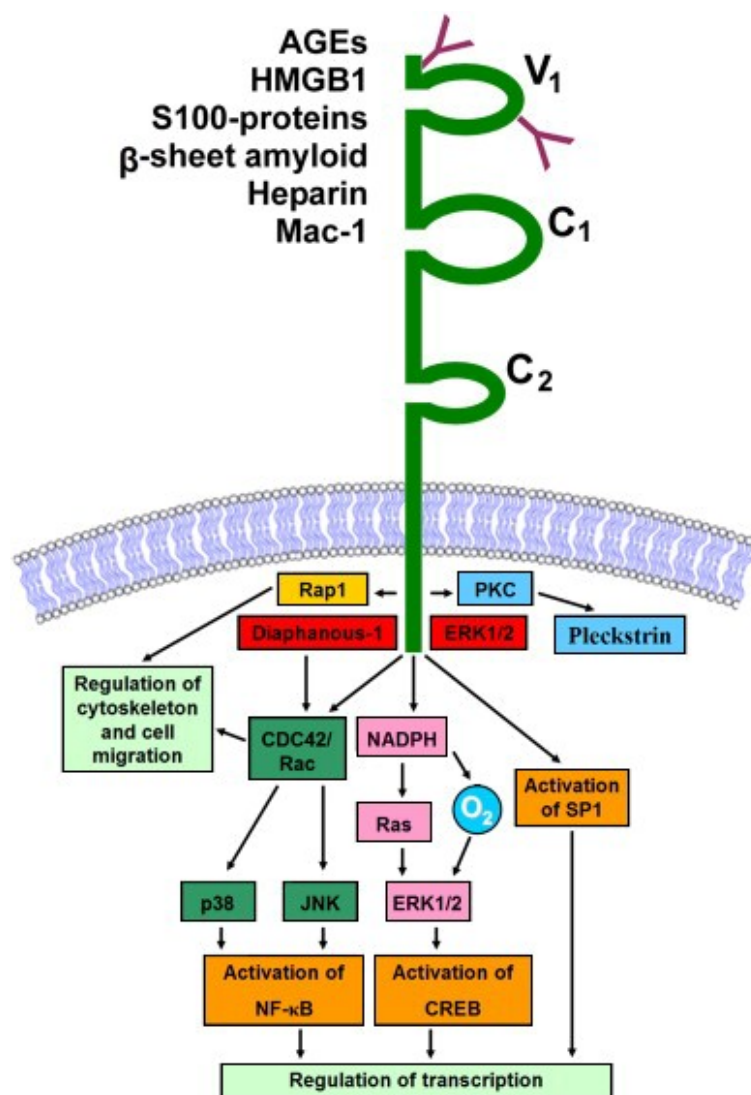


Abbildung 1.5 Die direkte toxische Wirkung auf Neurone erfolgt über AGEs, die durch Apoptose, Kalzium-Einstrom, oxidativen Stress und Hemmung der oxidativen Phosphorylierung zum Zelltod führen. Die indirekte Toxizität erfolgt über inflammatorische Prozesse, die zum neuronalen Zelltod führen (Dukic-Stefanovic et al., 2001).

Die mitogene Wirkung der AGEs über RAGE und weiterführend den p42/44 MAPK-Signalweg, der zur Bildung des Cyclin D1/cdk4 Komplexes führt, konnte durch Versuche mit Neuro2a Zellen gezeigt werden (Schmidt et al., 2007). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Neurone, die Ablagerungen von AGEs aufwiesen, auch Cyclin D1 positiv waren (Schmidt et al., 2007). Weiterhin konnte bei *in vitro* Versuchen gezeigt werden, dass AGEs über den p42/44 MAPK-Signalweg (Abbildung 1.6 C sowie Abbildung 1.3) die Cyclin D1-Expression erhöhen (Abbildung

1.6 B). Schlussfolgernd wurde hypothetisiert, dass die AGEs über die Bindung von RAGE mitogen wirken (Schmidt et al., 2007).

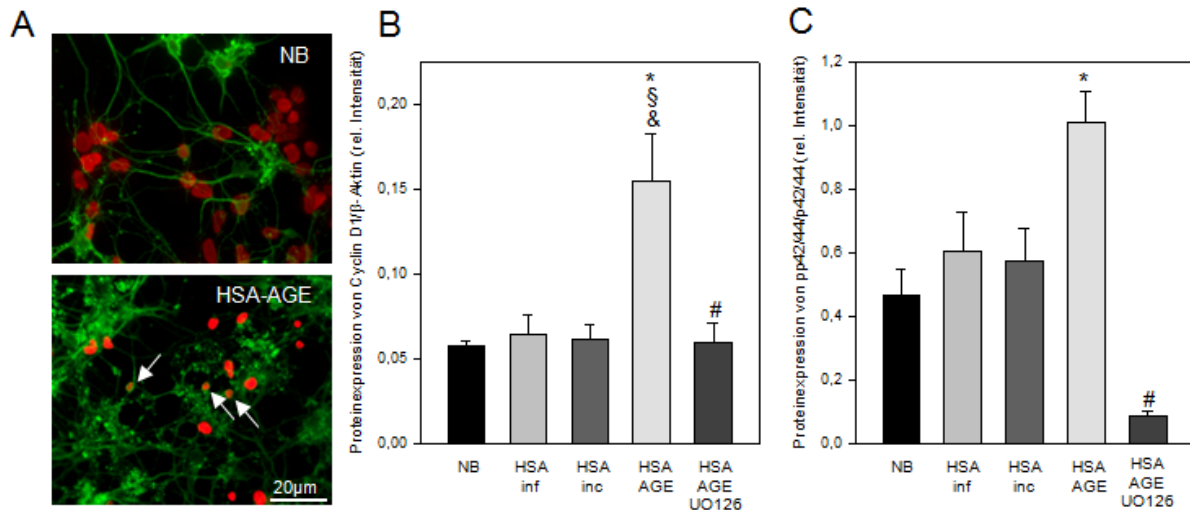


Abbildung 1.6 Mitogene Effekte der AGEs und Auswirkungen auf die MAPK-Kaskade *in vitro* (Schmidt et al., 2007). Immunzytochemische Bilder (A) von Neurobasalmedium (NB) und 1 µM HSA-AGE behandelten Primärneuronen. Repräsentative densitometrische Messungen von Cyclin D1 (37kDa; B) und pp42/44 (42/44 kDa; C) -Expression in Primärneuronen, welche mit NB, 1 µM HSA-inf., 1 µM HSA-inc. und 1 µM HSA-AGE behandelt wurden. Eine Reihe weiterer Neurone wurde mit 10 µM UO126 für 2 h, gefolgt von der Applikation von 1 µM HSA-AGE, vorinkubiert. Zu beachten ist, dass nur HSA-AGE behandelte Neurone einen Einbau von BrdU zeigten (A, untere Abbildung, Pfeile). In Übereinstimmung zeigten HSA-AGE behandelte Neurone einen signifikanten Anstieg der Cyclin D1 und pp42/44 Expression, die jeweils deutlich durch die Applikation von UO126 reduziert wurde (B und C). Alle Werte wurden 3 unabhängigen Messungen entnommen. Die Mittelwerte ± Standardabweichung des Mittelwertes; einfache ANOVA, Post-hoc-Paarweisevergleichstest: *p < 0,05 versus NB; §p < 0,05 versus HSA-inf; ^{et}p < 0,05 versus HSA-inc; #p < 0,05 versus HSA-AGE. Abkürzungen: AGEs, Advanced Glycation Endproducts; ANOVA, Varianzanalyse; HSA, Humanserumalbumin.

1.5.2 Aneuploider Chromosomensatz führt zum Nervenzelltod

Diese mitogene Wirkung der AGEs konnte mit dem Nachweis von extrazellulären AGE-Ablagerungen, die vorwiegend in der näheren Umgebung von polyploiden Neurone auftraten (Schmidt et al., 2007), noch bestätigt werden (siehe Abbildung 1.7 A). Quantitative Analysen bestätigten, dass mehr als 10% der AGE positiven Neurone in AD-Hirnen 3 oder mehr Hybridisierungssignale aufwiesen, welche auf eine Polyploidie hindeuten (siehe Abbildung 1.7 B). Bei nicht erkrankten Gehirnen konnte dagegen kein polyploides Genom detektiert werden.

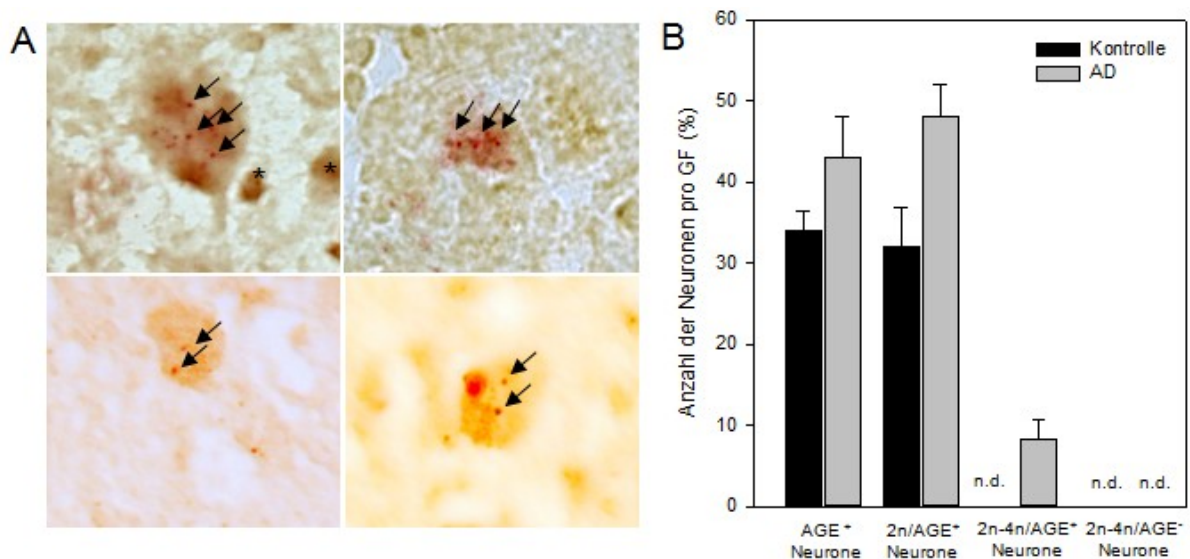


Abbildung 1.7 Kolokalisation aneuploider Neurone mit AGEs (Schmidt et al, 2007). Repräsentative Kolokalisation von CML-AGE-Färbung und chromogener *in situ* Hybridisierung (CISH) in Pyramidenneuronen des Hippocampus von AD-Gehirnen (A, obere Abbildungen, Vergrößerung x1000). Zu beachten ist das Vorliegen von 3 oder mehr Hybridisierungssignalen (Pfeile, alle Zellen sind im Locus coeruleus lokalisiert, n=4), die im Nukleus die DNA-Replikation anzeigen. Die quantitative Analyse zeigt, dass mehr als 10% der CML-AGE positiven Neurone im AD-Gehirn 3 oder mehr Hybridisierungssignale aufweisen (B). Repräsentative Kolokalisation von CML-AGE-Färbung und CISH im Kontrollgehirn (A, untere Abbildungen, Vergrößerung x1000), in welchem die Anzahl der Hybridisierungssignale das Maximum von 2 Signalen nicht übertrifft. Zusätzlich sind mehr als 32% der Neurone AGE positiv (B, schwarze Balken), die aber keine Polyploidie aufweisen (B, n.d., nicht messbar). Die Werte sind als Prozentangabe der gezählten Neurone pro Gesichtsfeld angegeben. Abkürzungen: AD, Alzheimer's Disease; AGEs, Advanced Glycation Endproducts; CML, Carboxymethyllysin.

Das Alter, als Hauptrisikofaktor der AD, führt zu einem erhöhten oxidativen Stress, der wiederum über die Bildung von AGEs in einem AGE-getriggerten Wiedereintritt der Neurone in den Zellzyklus resultiert. Es stellt sich also die Frage, wie man diesen Circulus vitiosus aufhalten oder präventiv gegen ihn wirken kann, um den Nervenzelltod zu reduzieren bzw. aufzuhalten und damit die Entstehung oder Progression der AD zu verhindern.

1.6 Medikamentöse Therapie der AD

Obwohl die AD mittlerweile schon ein Jahrhundert bekannt ist und aufgrund der Altersstruktur immer mehr an Bedeutung gewinnt, gibt es bis heute keine Medikamente, welche den Verlauf der Krankheit aufhalten, geschweige denn heilen oder die Entstehung verhindern können.

1.6.1 Acetylcholinesterase-Inhibitoren (AChE-Inhibitoren) und N-Methyl-D-Aspartat-Antagonisten (NMDA-Antagonisten)

Die derzeit vorhandenen Medikamente zur Behandlung der Kernsymptome der AD, wie die kognitiven Störungen und die Beeinträchtigung der Alltagstätigkeiten, sind die AChE-Hemmer und der NMDA-Antagonist Memantin. Bei der mittelschweren AD sind aktuell die AChE-Inhibitoren Donepezil, Galantamin und Rivastigmin zugelassen (siehe Abbildung 1.8), die in der Regel gut vertragen werden (S3-Leitlinie „Demenzen“, 2009). Zu den häufigen Nebenwirkungen zählen hierbei Erbrechen, Übelkeit, Schwindel, Appetitlosigkeit, Diarrhoe und Kopfschmerzen, aber auch Bradykardien und Synkopen. Bei dem nicht-kompetitiven NMDA-Antagonisten Memantin, der für die moderate bis schwere AD zugelassen ist (siehe Abbildung 1.8), sind häufige Nebenwirkungen Schwindel, Kopfschmerz, Obstipation, erhöhter Blutdruck und Schläfrigkeit (S3-Leitlinie „Demenzen“, 2009). Als pflanzliches Mittel gilt Ginkgo Biloba zur Verbesserung kognitiver Störungen. Allerdings besteht keine überzeugende Evidenz für die Wirksamkeit ginkgohaltiger Präparate. Auch bei anderen Therapeutika, wie den Vitamin E Präparaten, nichtsteroidalen Antiphlogistika (Rofecoxib, Naproxen, Diclofenax, Indomethacin), Piracetam, Nicergolin, Hydergin, Lecithin, Nimodipin, Cerebrolysin und Selegilin konnte keine Wirksamkeit nachgewiesen werden, sodass eine Behandlung mit diesen Medikamenten nicht empfohlen wird (S3-Leitlinie „Demenzen“, 2009). Weitere Therapeutika, die den pathobiologischen Krankheitsverlauf verzögern, sogenannte krankheitsmodifizierende Medikamente („*disease modifying drugs*“), befinden sich in Erprobung. Allerdings gibt es bis heute keine überzeugenden Wirksamkeitsnachweise solcher Substanzen bei der Behandlung der AD (S3-Leitlinie „Demenzen“, 2009). In Anbetracht der fehlenden Heilungsmöglichkeiten oder präventiven Maßnahmen und nicht zuletzt auch wegen der steigenden Kosten im Gesundheitswesen ist es notwendig, neue Therapieansätze zu entwickeln.

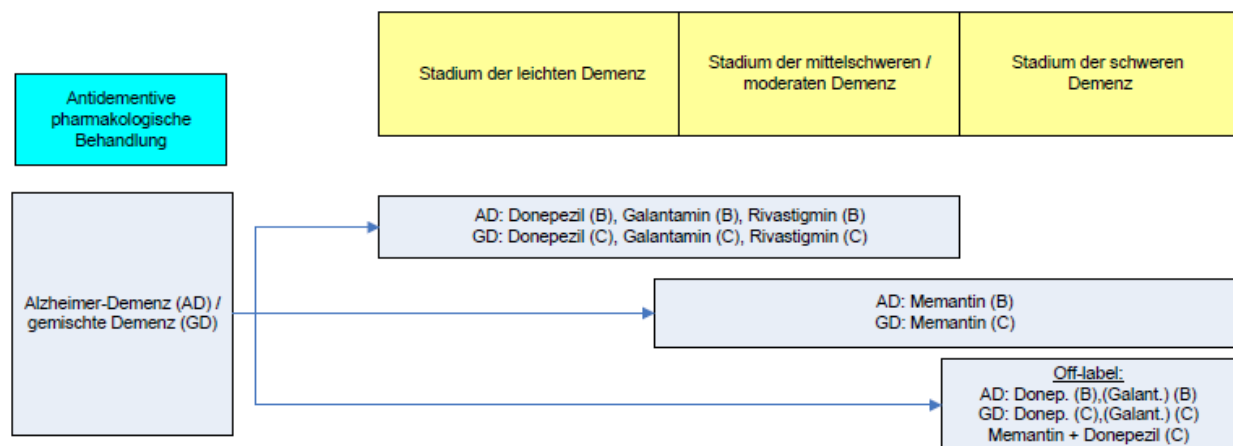


Abbildung 1.8 Schematische Darstellung der Behandlung der AD mit den Empfehlungsgraden (A,B,C) aus S3-Leitlinie „Demenzen“, 2009.

1.6.2 Alpha-Liponsäure (LA) – ein Antioxidans

Da der oxidative Stress bei der AD eine wesentliche Rolle spielt, gilt als Ziel der Arbeit mithilfe einer antioxidativen Therapie, wie der LA, die AGE-Bildung und den daraus resultierenden pathogenetischen Weg zu unterdrücken, um damit das Fortschreiten der Krankheit zu verhindern bzw. präventiv gegen die AD zu wirken. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit LA besonders in ApoE-defizienten Mäusen zu einer signifikanten Senkung des oxidativen Stresses führt (Suchy et al., 2009; Yi & Maeda, 2006), sodass die Nahrungsergänzung mit diesem Antioxidans einen durchaus positiven Effekt auf die kognitive Leistungsfähigkeit hat (Suchy et al., 2009).

Die LA wird vom Körper in geringen Mengen enzymatisch im Mitochondrium hergestellt. Sie ist ein essentieller Kofaktor bei der oxidativen Decarboxylierung von α -Ketosäure im Mitochondrium und daher von entscheidender Bedeutung beim mitochondrialen Energiestoffwechsel. Die LA wird neben der *de novo* Synthese hauptsächlich aus Nahrungsmitteln aufgenommen. Besonders in Muskelfleisch, Herz, Leber und grünem Gemüse sowie Obst ist die LA vorhanden. Mit ihrer reduzierten Form, der Dihydroliponsäure, bildet die LA ein biochemisches Redoxsystem, um freie Radikale zu eliminieren. Neben der antioxidativen Wirkung dient sie als Schwermetall-Chelator und hat Auswirkungen auf bestimmte Signalwege (Packer et al., 1995), wie in Abbildung 1.9 dargestellt. Zudem sorgt sie

für die Regeneration anderer Antioxidantien, wie Vitamin C und Vitamin E sowie Glutathion (Nohl et al., 1999; Roy & Packer, 1998; Packer et al., 1997), welches zwar als Nahrungsergänzungsmittel erhältlich ist, bei oraler Einnahme aber nur begrenzt vom Körper verwertet werden kann. Auch Vitamin E kann mittels der Lipidperoxidation mehrfach ungesättigte Fettsäuren in Membranlipiden, Lipoproteinen und Depotfett vor einer Zerstörung schützen, indem es als Radikalfänger wirkt (Joshi & Praticò, 2012). Aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaft ging man davon aus, dass es unter anderem auch präventiv bei der AD wirken kann. *In vitro* Experimente konnten zeigen, dass Vitamin E unter anderem den oxidativen Stress bei neuronalen Zellkulturen senken kann (Joshi & Praticò, 2012). Allerdings konnten die positiven Wirkungen oder präventiven Effekte in durchgeführten randomisierten klinischen Studien bisher nicht nachgewiesen werden (Heart Protection Study Collaborative Group, 2002; Morris & Carson, 2003; Vivekananthan et al., 2003).

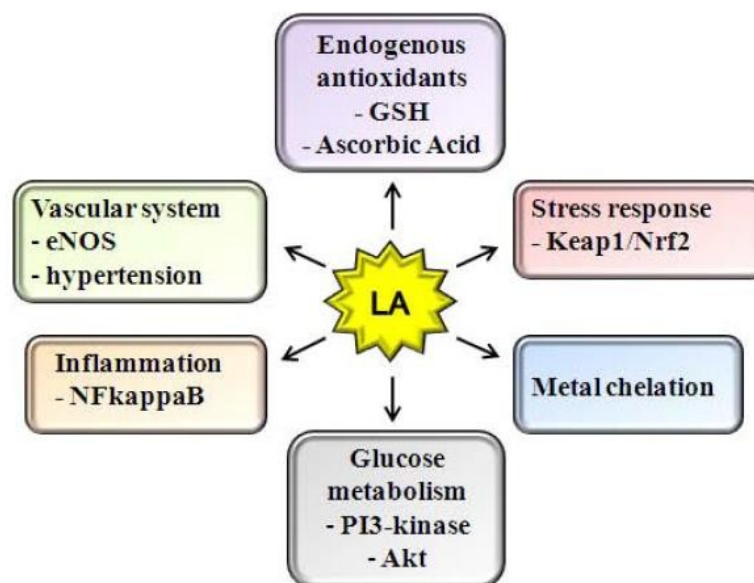


Abbildung 1.9 Biologische Effekte der LA (Shay et al., 2009).

Dagegen gibt es viele Belege, dass die Nahrungsergänzung mit LA einen hohen therapeutischen Wert bei einer Vielzahl pathologischer Zustände besitzt, wie bei der diabetischen Polyneuropathie oder bei altersabhängigen kardiovaskulären, kognitiven und neuromuskulären Defiziten (Yi et al., 2013). Aufgrund dessen, dass die Plasmamembranen im Gehirn und Nervengewebe besonders reich an mehrfach

ungesättigten Fettsäuren sind und ihr Gehalt an Antioxidantien im Vergleich zu anderen Geweben niedriger ist, unterliegen besonders diese Gewebe Krankheiten, die durch freie Radikale hervorgerufen werden (Packer et al., 1997). Darunter zählen vor allem die neurodegenerativen Krankheiten. Somit sind Antioxidantien, wie die LA, potentielle Therapeutika für die Behandlung von Erkrankungen, bei denen Prozesse mit freien Radikalen eine große Rolle spielen. Zusätzlich besitzt die LA die Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke passieren zu können und sich im Gewebe anzureichern. Durch die Wirkung der LA auf die Genregulation kann sie auch Entzündungsprozessen entgegenwirken, da sie einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung von NFκB hat (Packer et al., 1997).

1.7 Ziele und Fragestellungen der Arbeit

Um die therapeutische Wirkung von LA für die AD zu analysieren, sollte untersucht werden, ob und inwiefern die tägliche orale Gabe bei der ApoE^{-/-} Maus (ApoE-defizient) im Vergleich zu einem Wildtypstamm (WT) in der Lage ist, die für die AD typischen Pathogenitätsmerkmale, wie den oxidativen Stress und die AGE-Ablagerungen, zu minimieren. Dieses Mausmodell geht mit Neurodegeneration einher und verstärkt den oxidativen Stress (Ramassamy et al., 1999).

Auch die pathogenetische Rolle der AGEs und über welchen Signalweg sie bei der Entwicklung der AD wirken, sollte eruiert werden. Dabei wurde anhand des WT-Stammes und AD-Mausmodells *in vivo* untersucht, ob die AGEs in enger Nachbarschaft zu dem Zellzyklusmarker Cyclin D1 vorkommen und inwiefern sie die Cyclin D1-Expression positiv beeinflussen. Für die mitogene Aktivität der AGEs über ihren Rezeptor RAGE fehlte bislang ein *in vivo* Nachweis.

Bei der Untersuchung der Gehirne der WT- und ApoE-defizienten Mäuse sollte zudem nicht nur analysiert werden, ob sie sich in Hinblick auf oxidativen Stress, AGE-Ablagerungen und Cyclin D1 innerhalb der Mauspopulationen unterscheiden, sondern ob es altersspezifische Unterschiede innerhalb der jeweiligen Population gibt. Weiterhin sollte mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) eruiert werden, ob der Zellzyklus regelrecht durchlaufen wird oder eine fehlerhafte Mitosephase zur Bildung einer Aneuploidie der Neurone führt.

2. Material und Methoden

2.1 Tiermodell und experimentelle Gruppen

Da der ApoE4-Polymorphismus bei der AD eine wesentliche Rolle spielt, wurden für die Versuche ApoE-defiziente B6.129P2-Apoe/Crl-Mäuse verwendet, die vom Charles River Laboratorium kommerziell bezogen wurden. Als Kontrollgruppe diente der Stamm der ApoE-kompetenten Mäuse C57BL/6J (WT) aus dem Jackson Laboratorium. Bei allen Versuchstieren handelte es sich um männliche schwarze Mäuse. Die Versuchstiere waren zu Beginn des Experimentes 4 Wochen alt. Danach erfolgte die zufällige Verteilung beider Stämme mit jeweils 7 Tieren auf unterschiedliche Altersgruppen. Diese wurden in juvenile (8 Wochen), adulte (24 Wochen) und seneszente (78 Wochen) Tiergruppen unterteilt.

Das Experiment gliederte sich in die Untersuchung des ApoE-Defizienz-induzierten oxidativen Stresses in Abhängigkeit vom Alter (Versuchsabschnitt I) und der lebenslangen antioxidativen Therapie mit LA bei ApoE-Defizienz (Versuchsabschnitt II). Im Versuchsabschnitt I wurde jeweils der Stamm des WTs und der der ApoE-defizienten Mäuse mit den unterschiedlichen Altersklassen (jeweils n=7) für die Untersuchungen eingesetzt, während bei dem Versuchsabschnitt II die 78 Wochen alten ApoE-defizienten Mäuse (n=7) verwendet wurden (siehe Tabelle 2.1).

Im Versuchsabschnitt I wurden die ApoE-defizienten und die WT-Mäuse der unterschiedlichen Altersgruppen unter standardisierten Bedingungen mit einem 12 h Tag/Nacht Rhythmus (mit einer Helligkeitsphase von 6 Uhr bis 18 Uhr) gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (ssniff®). Die Haltung erfolgte in standardisierten Käfigen mit einem Besatz von maximal 5 Tieren.

Im Versuchsabschnitt II erfolgte die antioxidative Therapie mit LA. Dabei erhielten die ApoE-defizienten Mäuse beginnend im Alter von 4 Wochen täglich eine einmalige orale Gabe LA (20 mg/kg pro Maus) bis zum Alter von 78 Wochen.

Bei der verwendeten LA bzw. der 1,2-Dithiolan-3-valeriansäure handelt es sich um eine schwefelhaltige Fettsäure. Sie kommt natürlich im Körper vor und wird dort gebildet. Einen wichtigen Vorteil der LA und eine Bedingung für das Experiment stellt die leichte Passage der Blut-Hirn-Schranke dar.

Enantiomeric Forms of Lipoic Acid

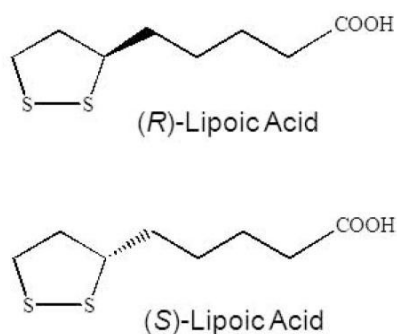


Abbildung 2.1 Aufbau synthetisch hergestellter LA (Shay et al., 2009).

Die hier verwendete synthetisch hergestellte LA enthält sowohl die rechtsdrehende, R-LA als auch die linksdrehende, S-LA enantiomere Form (siehe Abbildung 2.1).

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in standardisierten Käfigen mit einem Tier, um die Aufnahme der LA über das Trinkwasser zu sichern. Außerdem erhielten sie das gleiche Futter und wurden dem gleichen Tag/Nacht Rhythmus unterzogen wie im Versuchsabschnitt I.

Die Tierversuche wurden entsprechend des Tierschutzgesetzes und der Nutzerordnung der Zentralen Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt. Insgesamt sind 49 Tiere für das Experiment verwendet worden.

Tabelle 2.1 Mausmodell und Anzahl der Versuchstiere in den Versuchsabschnitten.

Mausstamm	Versuchsabschnitt I	Versuchsabschnitt II
Wildtyp	WT 8 Wochen – LA (n=7)	
	WT 24 Wochen – LA (n=7)	
	WT 78 Wochen – LA (n=7)	
ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-} 8 Wochen – LA (n=7)	
	ApoE ^{-/-} 24 Wochen – LA (n=7)	
	ApoE ^{-/-} 78 Wochen – LA (n=7)	ApoE ^{-/-} 78 Wochen + LA (n=7)

2.2 Gewebeasservierung

Entsprechend der Altersgruppen erfolgte nach 8, 24 bzw. 78 Wochen die Blut- und Hirngewebeentnahme unter einer Ketamin/Xylazin Narkose in der Dosierung 90/6 mg/kg KG, die intraperitoneal appliziert wurde. Nach Entnahme des Blutes aus der Vena cava inferior wurde die Maus dekapitiert, der Schädel aufgetrennt und das komplette Gehirn freipräpariert (siehe Abbildung 2.2, A). Der Bulbus olfactorius wurde entfernt und die beiden Gehirnhälften mit einem Skalpells entlang des Sulcus sagittalis getrennt (siehe Abbildung 2.2, B und C). Die Gehirnhälften wurden entsprechend der nachfolgenden Untersuchungen unterschiedlich asserviert. Für die Immunhistochemie wurde jeweils eine Hälfte in eine 4%ige Paraformaldehyd-Lösung für 24 h inkubiert. Danach wurden sie, ebenfalls für 24 h, in eine 20% Glukoselösung (500 ml destilliertes Wasser und 100 g Glukose) überführt. Anschließend wurden sie in -80°C kaltes Isopropanyl für 3 min inkubiert und danach im Tiefkühlfach bei -20°C aufbewahrt. Für die Western Blot Analyse wurde jeweils die zugehörige zweite Hirnhälfte im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Das Blut wurde in ein Ca^{2+} -EDTA-beschichtetes Röhrchen pipettiert. Im Anschluss wurde die Probe für 10 min mit 3400 x g in einer GS15 Zentrifuge (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma wurde abpipettiert und bei -20°C gelagert. Im Plasma konnte der Gehalt an Malondialdehyd (MDA) bestimmt werden.

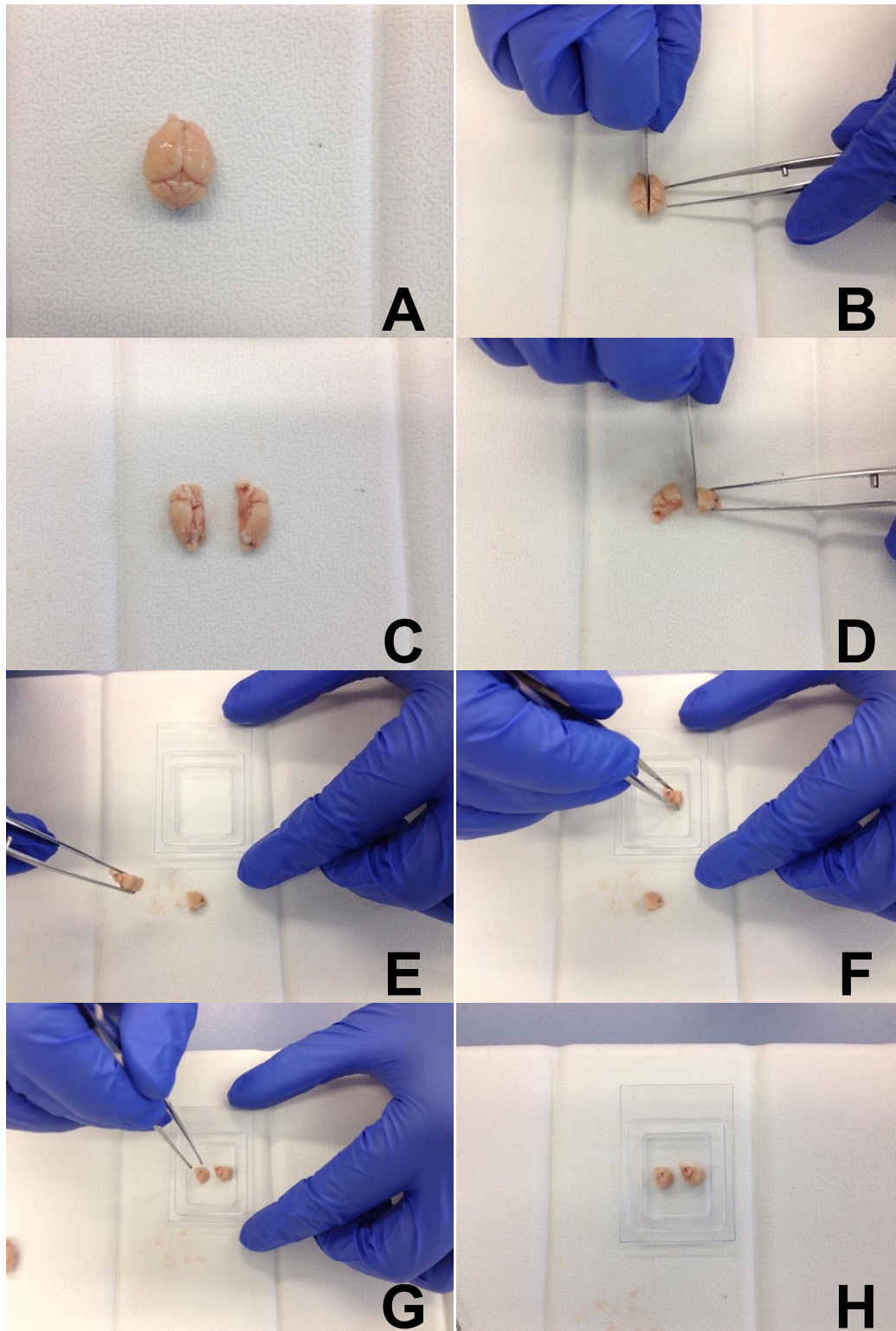


Abbildung 2.2 Die Bilder A - H zeigen den Ablauf der Schnittführung bei der Gehirnaufbereitung. Das Hirn (A) wurde zuerst im Bereich des Sinus sagittalis in 2 Hälften getrennt (B und D). Für die Immunhistochemie wurde eine Hirnhälfte quer zum Sulcus sagittalis in Höhe des Hippocampus halbiert (D). Beide Viertel wurden mit dieser Schnittfläche nach unten in einem Cryomold nebeneinander platziert (E-H).

2.3 Malondialdehydassay

Über den Gehalt an MDA im Blut kann man auf den oxidativen Stress in der Zelle schließen. MDA ist ein Endprodukt des oxidativen Fettsäureabbaus und damit ein labordiagnostischer Marker für die Lipidperoxidation. Es kommt zur Lipidperoxidation, wenn freie Radikale die körpereigenen Schutzmechanismen überwinden und mit ungesättigten Fettsäuren reagieren. Die Bestimmung des oxidativen Stresses im Plasma wurde mit dem BIOXYTECH MDA-586-Assay (Spectrophotometric Assay for Malondialdehyde, Oxis Research, California, USA) durchgeführt. Die MDA-586 Methode basiert auf der Reaktion des chromogenen Reagenz N-Methyl-2-Phenylindol (R1, NMPI) mit MDA bei 45°C. Dabei reagiert ein Molekül MDA mit 2 Molekülen NMPI und bildet einen stabilen Carbocyaninfarbkomplex (siehe Abbildung 2.3) mit einer maximalen Absorption bei 586 nm.

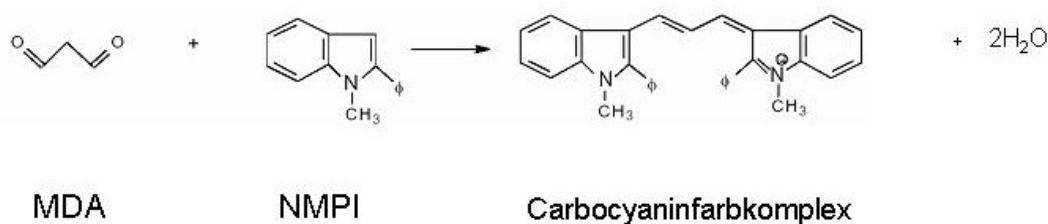


Abbildung 2.3 Reaktionsgleichung von MDA mit NMPI zum Carbocyaninfarbkomplex.

Für das MDA-Assay wurden folgende Reagenzien verwendet:

- Reagenz 1 = N-Methyl-2-Phenylindol, in Acetonitril
- Reagenz 2 = konzentrierte Salzsäure
- MDA Standard = 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (TMPO) in Tris-HCl
- BHT (butylated hydroxytoluene) in Acetonitril
- Probucol in Methanol
- Methanol

In jedes Tube wurden 10 µl Probucol pipettiert und 200 µl der Probe (Plasma) hinzugefügt. Nach Zugabe von 640 µl des verdünnten Reagenz R1 wurde die Probe gevortext und anschließend 150 µl R2 hinzugefügt. Nach wiederholtem Vortexen wurden die Samples für 1 h bei 45°C inkubiert. Die Proben wurden 10 min bei 10000

x g zentrifugiert und der klare Überstand im Anschluss in eine Küvette transferiert. Die Absorption wurde bei 586 nm gemessen.

Danach wurde die Konzentration des Analysats in der Probe bestimmt:

$$[\text{MDA}] = \frac{A_{586} - b \cdot df}{a}$$

Folgende Parameter sind definiert:

[MDA] = Konzentration von MDA in der Probe

A_{586} = Absorption der Probe bei 586 nm

a = Regressionskoeffizient (Steigung)

b = y-Achsenabschnitt (intercept)

df = Verdünnungsfaktor der Probe (dilution factor)

2.4 Western Blot Analyse

Die Methode der Western Blot Analyse stellt eine Möglichkeit dar, Proteine semiquantitativ zu analysieren.

Um AGEs, Cyclin D1, RAGE und pp42 im Hirngewebe nachzuweisen, wurde das bei -80°C gelagerte Hirngewebe in Lysispuffer homogenisiert (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5% Triton-X 100, 0,02% NaN_3 , 0,2 mM PMSF), für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 10000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde verworfen und die Konzentration im Überstand mittels Bichinonsäure-Kits (BCA) von Thermo Scientific (Rockford, USA) bestimmt. Dabei wurden je 10 µl einer Proteinlösung und 100 µl des BCA-Reagenz in einer 96-well-Platte für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption bei 562 nm/620 nm mithilfe des Sunrise Tecan gemessen und mit dem Programm Magellan ausgewertet. Aus dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung wurde die Proteinkonzentration ermittelt und bovines Serumalbumin (BSA) als Standard in den Konzentrationen von 0,1 – 2 mg/ml verwendet.

Jeweils 40 µg Proteinlysate wurden mit gleichem Volumen SDS-Probenpuffer vermischt und im Anschluss auf 95°C für 10 min erhitzt und abgekühlt. Ein Proteinmarker, der den jeweiligen kDa-Bereich abdeckt und zur Größenbestimmung der Proteine dient, wurde jeweils in die erste Geltasche pipettiert. Danach wurden die Proteine für ca. 1,5 h bei 120 V nach ihrer Größe in der Elektrophoreseapparatur (Biorad Mini Protean) mit Hilfe der Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Das im Überschuss zugefügte Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet an die Proteine, die so negativ geladen und im angelegten elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Nach der Elektrophorese wurden das Proteinlysate mittels Semi-Dry-Blot auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P, Millipore, Eschborn, Deutschland) transferiert. Das Blotting im Blotpuffer erfolgte bei 0,25 A für 1 h bei RT mit einer Blotapparatur. Nach dem Transfer wurden die Membranen in Tris-Buffered Saline and Tween (TBST) gründlich gespült und für eine Stunde in Blockierlösung (2%igem BSA) von Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) inkubiert. Der Proteinnachweis erfolgt schließlich durch das Aufbringen spezifischer Primär- und Sekundärantikörper. Die Membranen wurden dabei mit dem jeweiligen primären Antikörper (siehe Tabelle 2.2), der in Blockpuffer verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert.

Anschließend wurden die Membranen mit Waschpuffer dreimal für 10 min in TBST und zweimal für 5 min in TBS gespült und mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei RT inkubiert, wobei anschließend der gleiche Waschvorgang stattfand. Danach wurde die Membran mit „enhanced“ Chemolumineszenz-Lösung (ECL plus, Thermo Scientific, Rockford, USA) für 5 min bei RT inkubiert und auf dem ChemiDoc™ XRS System (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) digitalisiert. Die Signale wurden densitometrisch gemessen (Quantity One; Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) und mit denen der β -Aktin-Bande, bzw. das phosphorylierte p42 mit der nicht-phosphorylierten p42 Form, als Ladekontrolle verglichen. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler Anti- β Aktin-Antikörper der Maus in der Verdünnung 1:20000 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und als Sekundärantikörper ein Anti-Maus-IgG AA9044 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in der Verdünnung von

1:6000 eingesetzt. Für die spezifischen Marker verwendete Antikörper sind der Tabelle 2.2 und Tabelle 2.3 zu entnehmen.

Tabelle 2.2 Verwendete primäre Antikörper für die Western Blot Analysen.

Primäre Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Firma
AGE	HRP	1:2000	AGE612HRP; Biologo, Kronshagen, Deutschland
RAGE	HRP	1:500	ab30381; Abcam, Cambridge, UK
p42/44 ERK 1/2		1:1000	Cell Signaling 4695
pp42/44 ERK 1/2		1:1000	Cell Signaling 9101
Cyclin D1 (M-20)		1:800	Santa Cruz Biotechnology (sc718)

Tabelle 2.3 Verwendete sekundäre Antikörper und Konjugate für die Western Blot Analysen.

Sekundäre Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Firma
Anti-Kaninchen-IgG (RAGE)	HRP	1:5000	Cell Signaling 7074
Anti-Kaninchen-IgG (pp42)	HRP	1:5000/1:10000	Cell Signaling 7074
Anti-Kaninchen-IgG (p42)	HRP	1:5000/1:10000	Cell Signaling 7074
Anti-Kaninchen-IgG (Cyclin D1)	HRP	1:10000	Cell Signaling 7074

2.5 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient dem zellulären Nachweis von Proteinen, wie bspw. den bei AD relevanten AGEs und Cyclin D1. Durch diese Methode sollte geklärt werden, ob AGEs verstärkt in der Nachbarschaft Cyclin D1-positiver Neurone vorkommen.

Für die immunhistochemische Färbung erfolgte zuerst die Einbettung der Hirnhälften. Diese wurden auf einer Kühlplatte nochmals quer zum Sulcus sagittalis in Höhe des Hippocampus halbiert (siehe Abbildung 2.2, D). Beide Viertel wurden mit dieser Schnittfläche nach unten in einem Cryomold (Sakura, Torrance, USA) nebeneinander platziert (siehe Abbildung 2.2, E-H). Mit Tissue-Tek® (Sakura, Alphen aanden Rijn, Niederlande) wurden sie anschließend fixiert, für 10 min bei -80°C schockgefroren und bei -20°C gelagert.

Nach 24 h Inkubationszeit bei -20°C konnten die Hirnschnitte mittels eines CryoCut (Leica CM 1850, Nussloch, Deutschland) angefertigt werden. Dabei wurden pro Block 2 Schnitte mit einer Dicke von 4 µm hergestellt und auf Polylysine beschichtete Objektträger (Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Die Hirnschnitte wurden bis zur immunhistochemischen Färbung für 24 h luftgetrocknet.

Vorbereitend für die Färbung wurden die Schnitte 10 min in Aceton fixiert und anschließend 30 min luftgetrocknet. Danach wurden sie 3 min in Pufferlösung gespült. Anschließend folgte das Auftragen des Peroxidase Blocks (Dako, Glostrup, Dänemark) für 5 min. Nach dreimaligem Waschen für 2 min folgte der Protein Block (Dako, Carpinteria, USA). Während bei der Cyclin D1-Färbung nur der Protein Block auf die Schnitte gegeben wurde, musste bei der AGE-Färbung ein Antikörper „Goat polyclonal to Mouse IgG (ab6668)“ von abcam in der Verdünnung 1:10 mit dem Protein Block inkubiert werden. Dabei handelt es sich um ein Maus anti-AGE Antikörper, der die Interaktionen aufgrund der verwendeten Spezies Maus vermeiden soll. Nach 30 min Einwirkzeit in der feuchten Kammer wurde der Proteinblock abgeklopft und jeweils der primäre Antikörper (siehe Tabelle 2.4) auf die Schnitte gegeben.

Tabelle 2.4 Verwendete primäre Antikörper für die Immunhistochemie.

Primäre Antikörper	Verdünnung	Firma
Kaninchen anti-Cyclin D1	1:100	Santa Cruz (sc-718)
Maus anti-AGE	1:100	TransGenic (Clone No. 6D12)

Die Inkubation erfolgte 1 h bei RT und nachfolgend über Nacht im Kühlschrank. Vor dem Auswaschen des primären Antikörpers wurden die Hirnschnitte 1 h vorher aus dem Kühlschrank genommen und so auf RT erwärmt. Nach dreimaligem Waschen für 2 min folgte die Applikation des jeweiligen sekundären Antikörpers (siehe Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5 Verwendete sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie.

Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Firma
Ziege anti-Kaninchen	1:100	DAKO, Glostrup, Dänemark (Code-Nr. P 0448)
Ziege anti-Maus	1:100	DAKO, Glostrup, Dänemark (Code-Nr. P 0447)

Nach einstündiger Inkubationszeit bei RT wurde der Antikörper in Pufferlösung ausgewaschen.

Die Färbung erfolgte mit Diaminobenzidin in einer Chromogen-Lösung (DAKO, Carpinteria, USA). Nach wiederum dreimaligem Waschen für 2 min wurden die Hirnschnitte in destilliertes Wasser überführt. Anschließend folgte die Färbung in Hämalaun für 2 min. Nach 10 min „Hochbläuen“ im lauwarmen Wasser folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit den Konzentrationen 70%, 85%, 96% und 100% Ethanol und 100% X-TRA. Im Anschluss daran fand die endgültige Fixierung mit dem Eindeckmedium (X-TRA-KITT; Mediate, Burgdorf, Deutschland) und dem Deckglas statt.

2.6 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Für den Nachweis der aneuploiden Neurone wurde das Prinzip der FISH angewandt. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, mit dem Chromosomen, Chromosomenabschnitte oder einzelne Gene mittels Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht werden können.

2.6.1 Vorbereitung der Schnitte

Für die verwendeten Reagenzien bei der Vorbereitung der Schnitte siehe Tabelle 2.6.

Tabelle 2.6 Für die Vorbereitung der Schnitte verwendete Reagenzien.

Reagenz	Verdünnung/Endkonzentration	Firma
20*SSC	siehe Tab. 2.7	siehe Tab. 2.7
RNase A	1:1000	QIAGEN (Lot-Nr.142351601)
Pepsin	0,5 µl/ml	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Formamid-Lösung	70%	Merck KGaA, 64271 Darmstadt 1.09684.1000
Ethanol	70%	Mediate 99% (mit Aqua dest. verdünnt)
Aceton	100%	LAB-SCAN 67-64-1
PBS (Phosphat Buffered Saline)	siehe Tab. 2.8	siehe Tab. 2.8

Tabelle 2.7 Zusammensetzung von 20x SSC.

Reagenz	Endkonzentration	Firma
NaCl	1,5 M	Fischer Scientific, Pittsburgh USA
Natriumcitrat	0,3 M	Fischer Scientific, Pittsburgh USA

Tabelle 2.8 Zusammensetzung von PBS, pH 7,4.

Reagenz	Endkonzentration	Firma
Na ₂ HPO ₄	12 mM	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
KH ₂ PO ₄	3 mM	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	0,1 M	ROTH, Karlsruhe, Deutschland

Der erste Schritt bestand in der Fertigung der 6 µm starken Hirnschnitte mittels des CryoCut. Anschließend wurden diese für 15 min im Ofen bei 65°C inkubiert. Die Fixierung an den Objektträger erfolgte mit Aceton für 10 min. Danach wurden die Schnitte luftgetrocknet.

Um die störende Ribonukleinsäure (RNA) bei der FISH im Hirngewebe zu inhibieren, wurden die Schnitte mit je 200 µl einer RNase A in der Verdünnung 1:1000 mit 2*SSC für 1 h bei 37°C inkubiert. Parafilm wurde als Abdeckung der Schnitte verwendet, um das Austrocknen zu verhindern. Anschließend folgte das Auswaschen der RNase mit 2*SSC für 5 min und nachfolgend mit PBS (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.8), ebenfalls für 5 min. Für die Aufspaltung der Proteinstruktur folgte im Anschluss die dreiminütige Inkubation mit Pepsin (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Da dieses einen niedrigen pH-Wert für die Aktivität benötigt, wurde die Lösung mit 0,5 µl/ml Pepsin mit 10 nM HCl hergestellt. Anschließend wurde das Pepsin für 5 min mit PBS ausgewaschen. Nach Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe mit den Konzentrationen 70%, 85%, 96%, 100% Ethanol und 100% X-TRA wurden die Schnitte abermals luftgetrocknet und nachfolgend in 70%iger Formamid-Lösung für 2 min bei 70°C inkubiert. Gleich danach wurden sie in -20°C kaltes, 70%iges Ethanol für ebenfalls 2 min überführt und nach der sich anschließenden aufsteigenden Alkoholreihe wiederum luftgetrocknet.

2.6.2 Vorbereitung der Hybridisierungsprobe

Für die Hybridisierung der komplementären DNA-Abschnitte folgte die Aufbereitung der Hybridisierungsprobe. Dabei handelt es sich um eine Maus-spezifische direkt gelabelte, kommerzielle Satelliten-DNA (StarFISH®, cambio, Cambridge, UK), die an das Chromosom 11 bindet. Für die Trennung der komplementären Abschnitte wurde

diese erst bei 37°C für 5 min erwärmt und anschließend bei 85°C für 10 min erhitzt. Danach wurde die Probe sofort auf die Schnitte pipettiert. Die anschließende Hybridisierung fand bei 37°C in der feuchten Kammer für 16 h statt. Nachfolgend wurden mehrere Waschschrte bei 45°C (siehe Tabelle 2.9) durchgeführt, um nicht gebundene DNA-Abschnitte zu entfernen.

Tabelle 2.9 Waschschrte zur Vorbereitung der Hybridisierungsprobe.

Anzahl der Waschschrte	Reagenz	Zusammensetzung	Dauer des Waschschrtes (in min)
1	1*SSC	25 ml 20*SSC 475 ml Aqua dest.	5
2	Stringency wash solution	50 ml Formamid 50 ml 1*SSC	5
2	1*SSC	25 ml 20*SSC 475 ml Aqua dest	5
3	Detergent wash solution	500 ml 4*SSC 250 µl Detergent DT	4

2.6.3 Hybridisierung und Amplifikation

Damit Chromosomen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar werden, benötigt man Antikörper, die an die vorgesehenen Bindungsstellen der Probe binden können und anschließend einen Fluoreszenz-Farbstoff, der selektiv an die Antikörper bindet. Für diese Detektion dienen die Working Reagenzien der Firma STAR FISH (siehe Tabelle 2.10).

Tabelle 2.10 Chemikalien für die Hybridisierung und Amplifikation.

Chemikalie	Zusammensetzung	Firma
Working Reagent A	370 µl Blocking Protein 2130 µl Detergent wash solution	STAR FISH, Cambio Camebridge; UK
Working Reagent B	6 µl Detection Reagent F1 1244 µl Working Reagent A	STAR FISH, Cambio Camebridge; UK
Working Reagent C	12,5 µl Detection Reagent F2 1237,5 µl Working Reagent A	STAR FISH, Cambio Camebridge; UK
Detergent wash solution	500 ml 4*SSC 250 µl Detergent DT	

Zuerst wurde Working Reagenz B auf die Schnitte pipettiert, für 20 min bei 37°C inkubiert und nachfolgend in 3 Waschschritten in der Detergent Wash Solution für jeweils 4 min ausgewaschen. Danach wurde Working Reagent C unter gleichen Bedingungen inkubiert und mit den gleichen Waschschritten ausgewaschen. Als Eindeckmedium wurden 30 µl von Reagenz MD verwendet. Darüber wurde ein Deckgläschen gelegt, das an den Rändern mit Nagellack fixiert wurde, um dessen Halt zu gewährleisten. Die Aufbewahrung der Schnitte erfolgte im Kühlschrank. Die Auswertung der Schnitte erfolgte mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops (Zeiss, Jena, Germany), welches mit einer Digitalkamera ausgestattet ist. Die Anzahl der Hybridisierungssignale pro Zellkern wurde unter 1000facher Vergrößerung mithilfe des Fluoreszenzfilters bei einer Wellenlänge von 430 nm ausgewertet.

2.7 Statistische Analyse

Alle Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Die statistischen Differenzen wurden unter Nutzung der Varianzanalyse und dem Post-hoc-Paarweisevergleichstest für die Analyse zwischen Applikationen, Stämmen und Altersstufen bestimmt. Die Ergebnisse wurden als signifikant gewertet, wenn $p < 0,05$ betrug und als Tendenz, wenn $0,05 < p < 0,1$ betrug. Mithilfe des Programms SigmaStat Software 3.5 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) wurde die statistische Analyse ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 ApoE-Defizienz durch neuronale AGE-Ablagerungen gekennzeichnet, die durch langfristige LA-Therapie reduziert werden

Da die ApoE-Defizienz mit einem erhöhten oxidativen Stress einhergeht und dieser wiederum eine Voraussetzung für die Glykierung ist, wurde die mögliche Auswirkungen des oxidativen Stresses auf die Glykierung und somit die Bildung von AGEs beim WT und der ApoE-defizienten Maus untersucht.

Zunächst zeigte sich in Abhängigkeit vom Alter bei der WT-Maus ein moderater Anstieg des oxidativen Stresses, der mithilfe von MDA bestimmt wurde. So stieg der MDA-Gehalt von 2,5 μM bei den 8 Wochen alten auf 3,8 μM bei den 78 Wochen alten WT-Mäusen (Abbildung 3.1 A), während die ApoE-defizienten Mäuse keine altersbedingte Zunahme des oxidativen Stresses zeigten. Dagegen konnte bei allen Altersgruppen der ApoE-defizienten Mäuse ein höherer Gehalt an MDA im Vergleich zur WT-Maus gemessen werden. Dabei zeigte sich bei den 8- und 24 Wochen alten ApoE-defizienten Mäusen ein zweifach höherer Gehalt an MDA im Vergleich zu den korrespondierenden WT-Mäusen (Abbildung 3.1 A).

Infolge des per se und zusätzlich signifikant erhöhten oxidativen Stresses der ApoE-defizienten Maus, der gegenüber dem WT-Stamm nachgewiesen werden konnte, fand auch eine erhöhte AGE-Bildung statt. Diese äußerte sich in einem doppelten Anstieg bei den 24 Wochen alten ApoE-defizienten Mäusen und in einem vierfachen und damit signifikantem Anstieg des AGE-Gehalts bei den 78 Wochen alten ApoE-defizienten Mäusen im Vergleich zum WT-Stamm (Abbildung 3.1 B). Diese deutliche Zunahme der AGE-Konzentration bei den 78 Wochen alten ApoE-defizienten Mäusen ist auch am nebenstehenden repräsentativen Western Blot detektierbar. Beim WT zeigte sich analog zum altersabhängigen Anstieg des oxidativen Stresses auch eine moderate Zunahme der AGE-Ablagerungen (Abbildung 3.1 B). Zur Bestätigung der quantitativen Analyse wurden immunhistochemische Färbungen aufeinanderfolgender Maushirnschnitte des Hippocampus angefertigt, die eine

verstärkte neuronale AGE-Akkumulation besonders in den Pyramidenzellen der 78 Wochen alten ApoE-defizienten Maus zeigte (Abbildung 3.1 C).

Bei der Langzeittherapie mit LA konnte der oxidative Stress bei den 78 Wochen alten ApoE-defizienten Mäusen im Vergleich zur fehlenden LA-Therapie des gleichaltrigen Mausstamms signifikant gesenkt werden, was an einer vierfachen Reduzierung des MDA-Levels auf 1,1 μM zu sehen ist (Abbildung 3.1 A) und somit um das Dreifache geringer war als der Wert der 78 Wochen alten WT-Maus. Daraufhin zeigte sich im Rahmen der verminderten Glykierung auch eine signifikante mehr als dreifache Reduktion der AGE-Akkumulation bei der 78 Wochen alten ApoE-defizienten Maus (Abbildung 3.1 B) vs. ohne LA-Therapie. Analog dazu zeigte sich auch bei den immunhistochemischen Färbungen eine geringere Anfärbbarkeit hinsichtlich der AGE-Ablagerungen bei den 78 Wochen alten ApoE-defizienten Mäusen unter LA-Therapie vs. ohne LA-Therapie. Bei der 78 Wochen alten WT-Maus konnten immunhistochemisch verminderte AGE-Akkumulationen nachgewiesen werden (Abbildung 3.1 C).

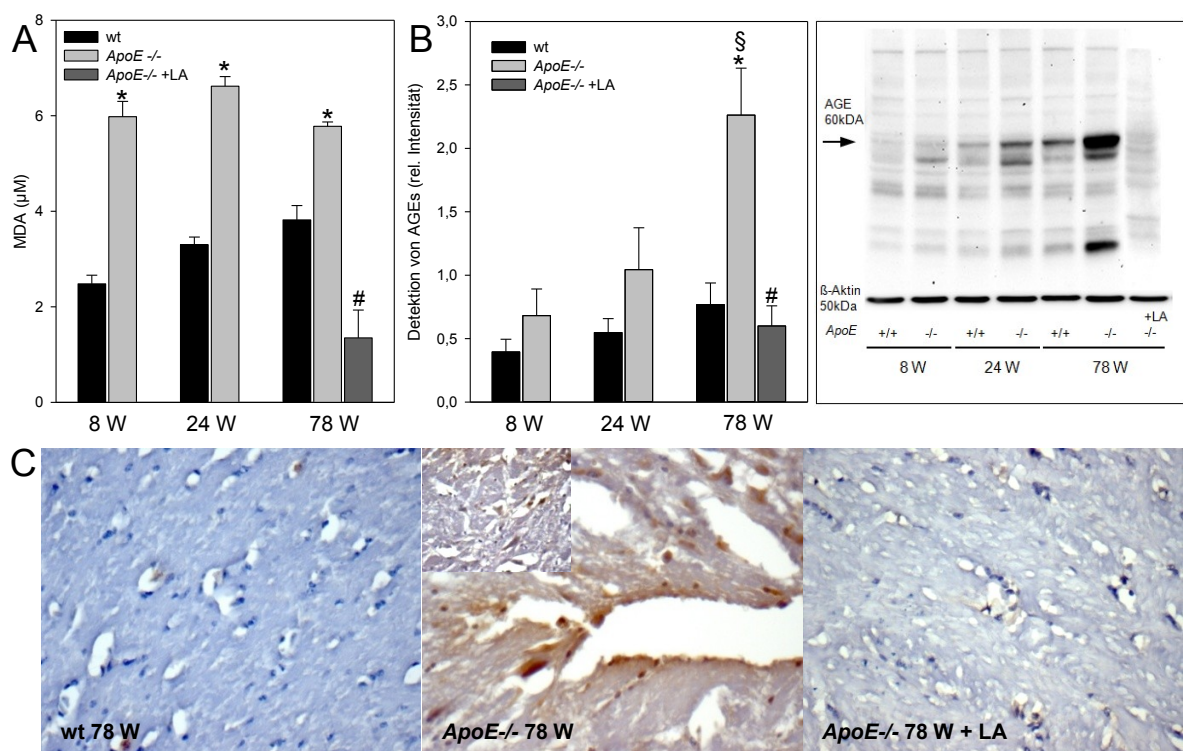


Abbildung 3.1 Erfassung der oxidativen Stress-assoziierten AGEs *in vivo*. Quantitative MDA Analyse im Plasma (A) und repräsentativer Western Blot sowie densitometrische Messungen der AGEs (60kDa; B) in Gehirnen von 8, 24 und 78 Wochen alten C57BL6/J- (Wildtyp; wt, n=21) und ApoE-defizienten Mäusen (ApoE^{-/-}, n=21). Eine weitere Gruppe ApoE^{-/-} Mäuse erhielt ab einem Alter von 4 Wochen für weitere 74 Wochen (n=7; 78 Wochen) täglich 20mg/kg LA pro Maus. Die Signale wurden mithilfe von β -Aktin normiert. Die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes; zweifache ANOVA, Post-hoc-Paarweisevergleichstest: *p <0,05 versus WT-Maus; §p <0.05 versus 8 Wochen alte Maus; #p <0,05 versus ApoE^{-/-} Maus. Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von AGE gefärbten Hirngewebsschnitten von 78 Wochen alten WT-, ApoE^{-/-} und LA-behandelten ApoE^{-/-} Mäusen (C, tatsächliche Vergrößerung x400). Zu beachten ist die starke AGE-Anfärbung in den Pyramidenzellen der 78 Wochen alten ApoE^{-/-} Maus (C, mittlere Abbildung, eingefügte Übersicht), welche sich deutlich vom Bild mit LA-Therapie unterscheidet. Abkürzungen: AGEs, Advanced Glycation Endproducts; ANOVA, Varianzanalyse; MDA, Malondialdehyd; LA, Alpha-Liponsäure.

3.2 Mitogenes Potenzial im Gehirn der ApoE-defizienten Maus wird durch langfristige LA-Therapie gesenkt

Eine Voraussetzung für die Wirkung der AGEs als mitogenes Signal ist eine beständige neuronale Expression ihres Rezeptors RAGE. Beim WT-Stamm blieb die RAGE-Expression bei den 3 Altersstufen auf gleichem Niveau, wobei bei den ApoE-defizienten Mäusen die Expression von RAGE zunächst leicht anstieg und im Alter abfiel (Abbildung 3.2 A). Vergleicht man den WT-Stamm mit der ApoE-defizienten Maus, fällt auf, dass mit einer ApoE-Defizienz eine Erhöhung der RAGE-Expression einhergeht, welche im Alter von 24 Wochen gegenüber der WT-Maus deutlich und zweifach erhöht war (Abbildung 3.2 A).

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass es mit zunehmendem Alter der WT- bzw. der ApoE-defizienten Maus zu keinem altersbedingten Anstieg der Phosphorylierung von p42 in beiden Mausstämmen kam. Vergleicht man jedoch ApoE-defiziente Mäuse mit dem WT-Stamm, so zeigt sich im Alter von 24 und 78 Wochen eine signifikante Erhöhung der p42 Phosphorylierung (Abbildung 3.2 B), während bei den 8 Wochen alten ApoE-defizienten Mäusen nur eine leichte Zunahme der Phosphorylierung von p42 gegenüber dem WT zu verzeichnen war.

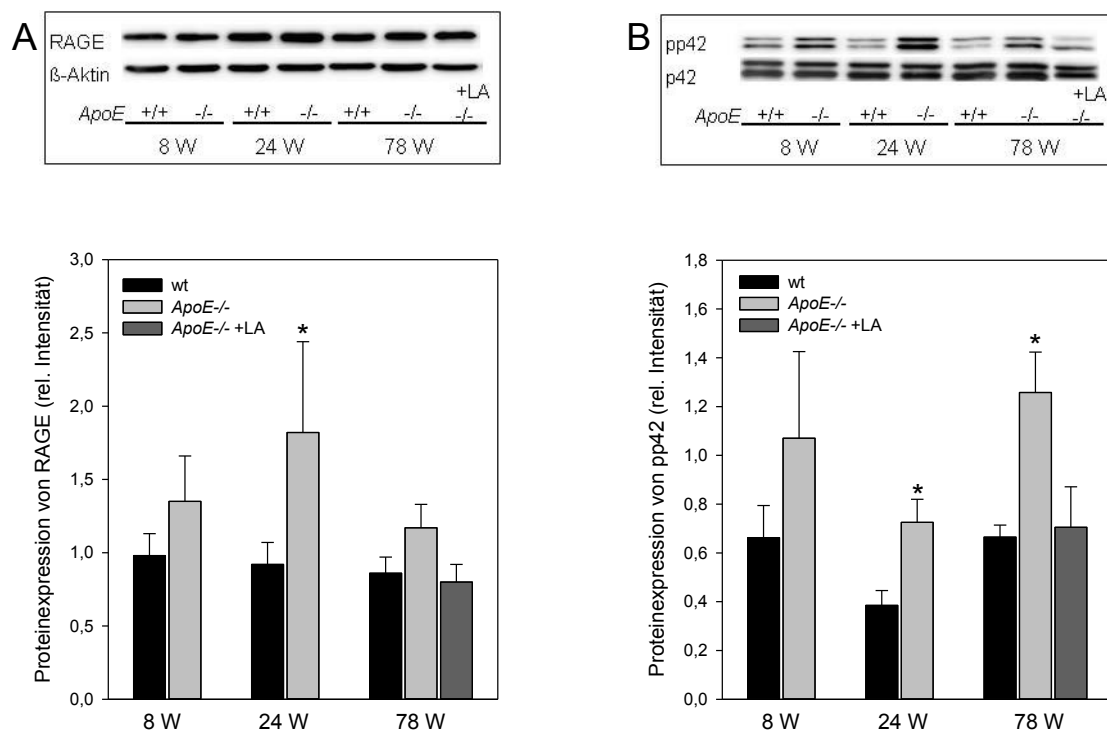


Abbildung 3.2 Evaluation des AGE-abhängigen RAGE-MAPK-Signalweges *in vivo*. Repräsentativer Western Blot und densitometrische Messungen von RAGE (50 kDa; A) und von Phospho p42/44 (42/44 kDa; B) in Gehirnen von jeweils 8, 24 und 78 Wochen alten C57BL6/J- (Wildtyp; wt, n=21) und ApoE^{-/-} Mäusen (ApoE^{-/-}, n=21). Eine weitere Gruppe ApoE^{-/-} Mäuse erhielt ab einem Alter von 4 Wochen für weitere 74 Wochen (n=7; 78 Wochen) täglich 20mg/kg LA pro Maus. Die Signale wurden mithilfe von β -Aktin normiert. Die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes; zweifache ANOVA, Post-hoc-Paarweisevergleichstest: *p < 0,05 versus WT-Maus; Abkürzungen: AGEs, Advanced Glycation Endproducts; ANOVA, Varianzanalyse; LA, Alpha-Liponsäure.

Begleitend zu der höheren p42/44 MAPK-Phosphorylierung der ApoE-defizienten Maus fand auch ein stärkerer Wiedereintritt der Neurone in den Zellzyklus statt. So zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Cyclin D1-Expression bei den 78 Wochen alten ApoE-defizienten Mäusen im Vergleich zum WT, was auch im repräsentativen Western Blot deutlich zu sehen war (Abbildung 3.3 A). Die erhöhte Cyclin D1-Expression in den Neuronen konnte zusätzlich mittels Immunhistochemie deutlich gemacht werden (Abbildung 3.3 B). Im Gegensatz zu den ApoE-defizienten Mäusen zeigten die WT-Mäuse eine leichte Abnahme der Cyclin D1-Expression mit zunehmendem Alter. Das Cyclin D1-Expressions-Niveau der 8- und 24 Wochen alten Mäuse beider Stämme war annähernd gleich (Abbildung 3.3 A).

Zusätzlich wurde untersucht, ob die AGE-Akkumulation und die Cyclin D1-Expression in der 78 Wochen alten ApoE-defizienten Maus mit einer verstärkten DNA-Replikation assoziiert war. Unter Verwendung der FISH konnte nachgewiesen werden, dass die ApoE-Defizienz mit polyploiden Neuronen im Bereich des Hippocampus einherging. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg mit 3 bis 4 Hybridisierungssignalen pro Zelle im Vergleich zum WT (Abbildung 3.3 C). Dies konnte auch quantitativ nachgewiesen werden, indem 21,2% der Pyramidenzellen der 78 Wochen alten ApoE-defizienten Mäuse einen drei- bis vierfachen Chromosomensatz aufwiesen, während nur 1,7% der 78 Wochen alten WT-Mäuse eine Aneuploidie zeigten (siehe Tabelle 3.1).

Während die LA-Therapie die RAGE-Expression der 78 Wochen alten ApoE-defizienten Maus nur in einem geringen Ausmaß reduzierte (Abbildung 3.2 A), bewirkte die LA dagegen eine signifikante Abnahme der Cyclin D1-Expression (Abbildung 3.3 A) entsprechend der Abnahme von MDA und AGEs. Begleitend zu der verminderten Glykierung verursachte die LA-Therapie auch eine verminderte Aktivierung des p42/44 MAPK-Signalweges in den ApoE-defizienten Mäusen, die sich in einer fast dreifachen und damit signifikanten Reduzierung der Cyclin D1-Expression widerspiegelte (Abbildung 3.3 A). Auch bei der immunhistochemischen Färbung konnte eine schwächere Expression von Cyclin D1 in den Pyramidenzellen, ähnlich zum Bild des WTs, im Vergleich zu gleichaltrigen ApoE-defizienten Mäusen ohne LA-Behandlung detektiert werden (Abbildung 3.3 B).

Das abgeschwächte mitogene Signal bei der Therapie mit LA ist durch einen signifikant geringeren Grad an Hybridisierungssignalen gekennzeichnet. So konnte der aneuploide Chromosomensatz auf einen diploiden bei den mit LA-therapierten ApoE-defizienten 78 Wochen alten Mäusen verringert werden, was einem euploiden Genom entspricht (Abbildung 3.3 C). Dies zeigte sich auch quantitativ, indem der Anteil der Pyramidenzellen der 78 Wochen alten ApoE-defizienten Mäuse mit einem drei- bis vierfachen Chromosomensatz mittels der LA-Therapie von 21,2% auf 4,1% gesenkt werden konnte (siehe Tabelle 3.1). In diesem Zusammenhang beinhalteten 66,1% der Neurone der ApoE-defizienten 78 Wochen alten Mäuse mit der LA-Therapie einen euploiden Chromosomensatz, der im Vergleich zu den ApoE-defizienten Mäusen ohne Therapie um 20% erhöht wurde (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 Genomischer Inhalt der Pyramidenzellen im Hippocampus

		Hybridisierungssignale pro Zellkern (%)		
		0	1-2	3-4
WT	78 W	38,2 ± 2,5	60,1 ± 2,5	1,7 ± 0,6
ApoE ^{-/-}	78 W	32,1 ± 2,5	46,7 ± 3,1	21,2 ± 2,8 ^a
ApoE ^{-/-} + LA	78 W	29,8 ± 2,7	66,1 ± 2,7	4,1 ± 0,8 ^b

In Gehirnen von 78 Wochen alten C57BL6/J Mäusen (WT, n=7) bzw. ApoE-defizienten Mäusen (ApoE^{-/-}, n=7). Eine zusätzliche Gruppe von ApoE^{-/-} Mäusen erhielt ab dem Alter von 4 Wochen zusätzlich täglich 20mg/kg LA pro Maus für weitere 74 Wochen (n=7, 78 Wochen alt). Die Zellen wurden anhand der Anzahl der Fluoreszenzsignale gemessen, die den genomischen Inhalt pro Neuron repräsentieren. Die Anzahl der Hybridisierungssignale pro Zellkern wurde mithilfe der 1000x Vergrößerung mithilfe des Fluoreszenzfilters ausgewertet und die Anzahl der gezählten Neurone pro Gesichtsfeld in Prozent angegeben. Die Dichte der Neurone mit 3-4 Signalen war bei den ApoE^{-/-} Mäusen signifikant erhöht, während sie wiederum durch die LA-Therapie signifikant abnahm. Die Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes. Abkürzungen: WT, Wildtyp; LA, Alpha-Liponsäure.

^a p < 0,05 versus WT Maus

^b p < 0,05 versus ApoE^{-/-} Maus

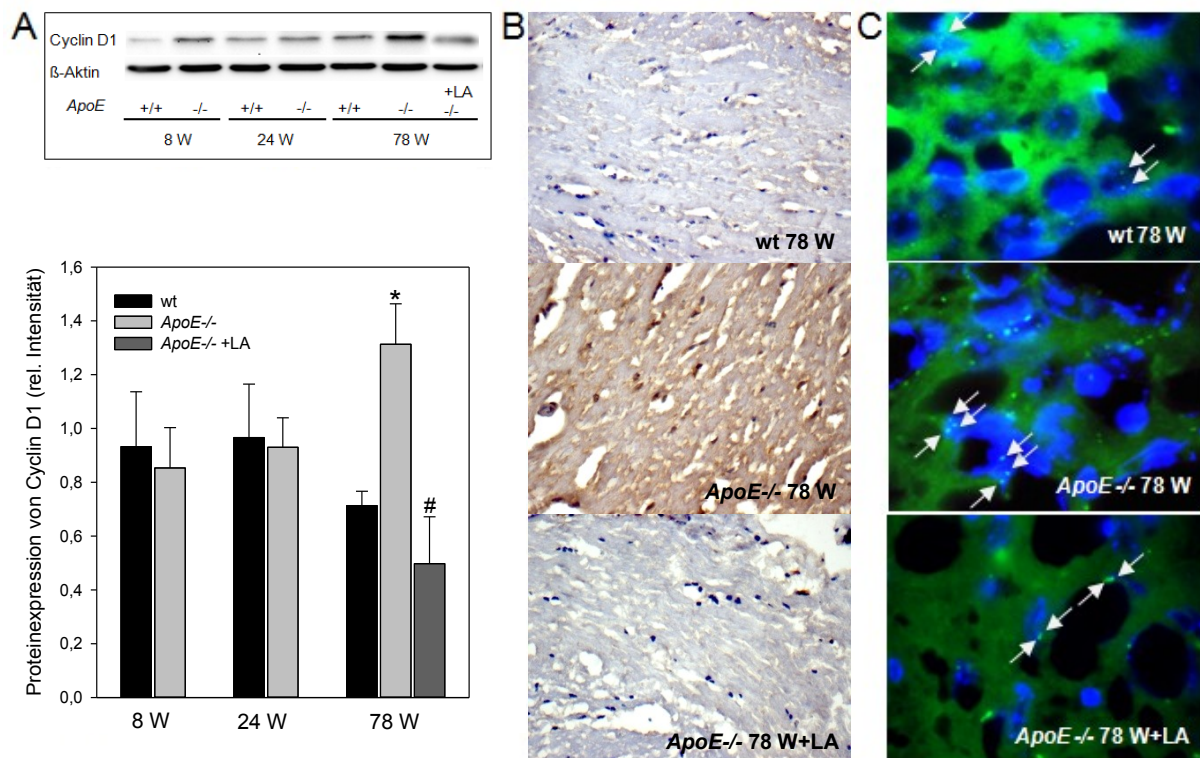


Abbildung 3.3 Mitogene Wirkungen der AGEs *in vivo*. Repräsentativer Western Blot und densitometrische Messungen von Cyclin D1 (37 KDa; A) in Gehirnen von 8, 24 und 78 Wochen alten C57BL6/J Mäusen (Wildtyp; wt, n=21) und ApoE-defizienten Mäusen (ApoE^{-/-}, n=21). Eine weitere Gruppe ApoE-defizienter Mäuse erhielt ab einem Alter von 4 Wochen für weitere 74 Wochen (n=7; 78 Wochen) täglich 20mg/kg LA pro Maus. Die Signale wurden mithilfe von β -Aktin normiert. Die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes; zweifache ANOVA, Post-hoc-Paarweisevergleichstest: *p < 0,05 versus WT-Maus; #p < 0,05 versus ApoE^{-/-} Maus. Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Cyclin D1 gefärbten Hirngewebsschnitten (B, tatsächliche Vergrößerung x400) und Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von FISH-Hybridisierungssignalen (C, tatsächliche Vergrößerung x1000) der 78 Wochen alten WT-, ApoE^{-/-} und LA-behandelten ApoE^{-/-} Maus. Zu beachten ist die starke Cyclin D1-Anfärbung der Neurone des Hippocampus (B, mittlere Abbildung, DAB Chromogen gefärbte Neurone) und die mehr als 3 Hybridisierungssignale, die eine Polyploidie anzeigen (C, mittlere Abbildung, Pfeile, grün zeigt Hybridisierungssignale an und blau zeigt 4',6-Diamidino-2-Phenylindol gefärbte Zellkerne an) in Gehirnen der 78 Wochen alten ApoE^{-/-} Maus. Abkürzungen: AGEs, Advanced Glycation Endproducts; ANOVA, Varianzanalyse; MDA, Malondialdehyd; LA, Alpha-Liponsäure.

4. Diskussion

Es erscheint immer wahrscheinlicher, dass AGEs eine große pathophysiologische Rolle bei den AD vorkommenden Veränderungen im Gehirn spielen. Das schließt vor allem die Bildung von unlöslichen Proteinablagerungen, den erhöhten oxidativen Stress, die Initiierung von entzündlichen Prozessen (Geoffroy et al., 2004; Satoh et al., 1997) und den Wiedereintritt der Neurone in den Zellzyklus über RAGE (Münch et al., 2003; Schmidt et al., 2007) mit ein. Dieser Wiedereintritt führt wiederum zum Zelltod, vermutlich durch Apoptose bedingt (Yang & Herrup, 2007). Aufgrund dessen, dass Cyclin D1 als ein Zellzyklusmarker für das Verbleiben in der G1 Phase betrachtet wird, können extrazellulär vorhandene AGEs ein möglicher Faktor für den Übergang der Neurone von der G0 in die G1 Phase sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass AGEs in höheren Konzentrationen bei der AD auftreten (Dei et al., 2002; Lüth et al., 2005). In diesem Zusammenhang konnte die mitogene Wirkung der AGEs bei neuronalen (Schmidt et al., 2007), mesangialen (Geoffroy et al., 2004) und glatten Muskelzellen (Satoh et al., 1997) bereits hinreichend bewiesen werden, während die Eigenschaft ihrer proliferativen Fähigkeiten weiterhin unbekannt ist. Mithilfe der FISH konnte gezeigt werden, dass die AGE-Ablagerungen oftmals in näherer Umgebung von polyploiden Neuronen vorkommen, worauf die Anwesenheit von 4 oder mehr, vollständigen oder teilweise replizierten Chromosomen bei Neuronen im Bereich des Hippocampus in AD-Gehirnen hinweisen (Kuhla et al., 2015). Ob dies der Beweis für einen direkten Zusammenhang zwischen den AGE-Ablagerungen und der DNA-Replikation ist, bleibt abzuwarten. Anhand dieser Daten kann man spekulieren, dass AGEs als eine mitogene Quelle in Betracht kommen. Yang et al. beschrieben 2006, dass der Wiedereintritt in den Zellzyklus einen frühen pathologischen Mechanismus der AD darstellt, sodass möglicherweise weder die aktivierten Mikroglia noch die β -Amyloidplaques verantwortlich für deren Initiierung sein können.

4.1 Diskussion von Material und Methoden

4.1.1 Methode der FISH zum Nachweis aneuploider Neurone

Um einen Beleg für den Wiedereintritt der Neurone in den Zellzyklus und die anschließende Replikation der Chromosomen nachzuweisen, wurde die Methode der FISH genutzt. Mittels dieser können Änderungen der Chromosomenzahl, chromosomale Teilverluste, Genamplifikationen und andere Aberrationen an zytologischen Präparaten weitgehend unabhängig von Fixations- oder Färbearart (van de Vijver et al., 2007) im Interphase-Zellkern identifiziert werden. Ein Kritikpunkt für die Auswertung der Hirnschnitte könnte sein, dass Zellkernanschnitte ausgezählt wurden. Somit sind die Hybridisierungssignale nicht eindeutig einer Ebene zuzuordnen und schwer auszählbar. Zusätzlich verblassen die FISH-Signale innerhalb einiger Wochen und bei zu starker bzw. langer Belichtung, während die Signale bei der ebenfalls durchgeführten Immunhistochemie lange erhalten bleiben (van de Vijver et al., 2007).

Analog zu den Autoren, die auch eine Aneuploidie in gesunden Gehirnen nachwiesen, konnte auch bei dieser Arbeit eine Polyploidie von einzelnen Neuronen in nicht erkrankten WT-Maushirnen bestätigt werden. Die Autoren beschrieben, dass Neurone in gesunden Gehirnen auch eine Polyploidie aufweisen können und nicht aktiv am Zellzyklus beteiligt sind, sondern meist durch eine Fehltrennung der Chromosomen während der Mitose entstehen (Mosch et al., 2007; Rehen et al., 2005; Yurov et al., 2005). Damit ist die Aneuploidie auch ein Bestandteil in gesunden Gehirnen, die aber nur in geringem Ausmaß vorkommt (Rehen et al., 2005). Mosch et al. (2007) konnten zeigen, dass die Aneuploidie, vor allem bei Chromosomensätzen, die den diploiden überschreiten, charakteristisch für die AD ist. Bei der AD sind einige Neurone in der Lage, wieder in den Zellzyklus einzutreten und ihn über die Interphase mit einer kompletten DNA-Replikation abzuschließen. So können letztlich diese zwei genannten Mechanismen, die Fehltrennung in der Mitose und die durch einen unbekannten Trigger selbstständige Initiierung des Zellzyklus, unterschieden werden, die den Grund für einen mehr als diploiden Chromosomensatz im erwachsenen menschlichen Gehirn darstellen (Mosch et al., 2007).

4.1.2 Eignung des ApoE-Mausmodells zur Detektion pathologischer Veränderungen bei der AD

Zur Untersuchung des mitogenen Effektes der AGEs *in vivo* wurde das Modell der ApoE-defizienten Maus verwendet. Der ApoE4-Polymorphismus ist in ca. 64% der Fälle mit der AD assoziiert (Saunders et al., 1993) und stellt einen wichtigen Pathogenitätsfaktor der LOAD dar (Strittmatter et al., 1993), die wiederum bei ca. 90% der an AD Erkrankten auftritt (S3-Leitlinie „Demenzen“, 2009). Daneben ist ApoE4 für eine Reihe pathogener Mechanismen der AD bekannt, wie der Ablagerung und des Abbaus von β -Amyloid und dessen Plaquebildung (Bales et al., 1999), der Beeinträchtigung des antioxidativen Abwehrsystems (Ramassamy et al., 2001), der Dysregulation von neuronalen Signalwegen (Herz & Beffert, 2000), den synaptischen und zytoskelettalen Veränderungen und Funktionsstörungen (Masliah et al., 1995), der erhöhten Phosphorylierung von Tau und der Bildung von NFTs (Bu, 2009) sowie der Störung des Glukosemetabolismus und der mitochondrialen Funktion und Integrität (Huang, 2011). Aufgrund der dargestellten Eigenschaften des ApoE-Polymorphismus und vor allem des damit einhergehenden oxidativen Stresses wurde das ApoE^{-/-}-Mausmodell zur Simulation des ApoE4-Polymorphismus als ein Modell der Neurodegeneration, um die AGE-Bildung und die damit zusammenhängenden Pathologien und Auswirkungen zu untersuchen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Erhöhter oxidativer Stress bei ApoE-Defizienz

Dass bei den ApoE-defizienten Mäusen erhöhter oxidativer Stress auftritt, konnte bereits in einigen Studien nachgewiesen werden (Suchy et al., 2009; Yi et al., 2006). Auch bei den Messungen des MDA-Spiegels, als Marker für den oxidativen Stress, fanden sich signifikant höhere Werte bei der ApoE-defizienten Maus. Ramassamy et al. (2001) konnten zeigen, dass besonders der Hippocampus im Vergleich zum frontalen Kortex von den ROS-assoziierten Schäden betroffen ist. Des Weiteren begünstigen ROS auch die Bildung von Amyloidfibrillen (Dyrks et al., 1993) und schädigen so die Nervenzellfortsätze. Das β -Amyloid induziert zusätzlich die Lipidperoxidation der Plasmamembranen und derer Produkte (Gella & Durany, 2009). Diese Produkte der Lipidperoxidation, wie z.B. das MDA, sind bei Patienten mit AD, aber auch bei Patienten mit MCI erhöht (Zhao & Zhao, 2013).

Das Alter stellt bei der LOAD den größten Risikofaktor dar (Finckh, 2006) und erhöht wiederum den oxidativen Stress (Ramassamy et al. 2001). Analog zu diesen Ergebnissen konnte dieser Mechanismus nachweisen. Bei dem WT wurde ein Anstieg des MDA-Levels mit Zunahme des Alters detektiert. Außerdem konnte belegt werden, dass der oxidative Stress die β -Amyloid Produktion und Aggregation verstärkt sowie die Phosphorylierung und Polymerisation von Tau begünstigt (Zhao & Zhao, 2013). Das wiederum führt zu einem Teufelskreislauf, der den Beginn und den Verlauf der AD fördert (Zhao & Zhao, 2013), sodass der oxidative Stress als wichtiger pathologischer Faktor der AD angesehen werden muss. Das wiederum legt nahe, dass die präventive Behandlung oder die Therapie mit einem Antioxidans in der Lage sein sollte, die Pathogenese der AD einschränken oder sogar verhindern zu können.

4.2.2 Signifikante AGE-Erhöhung erst bei seneszenten Mäusen durch Beeinflussung der Glyoxalase

Des Weiteren konnte herausgestellt werden, dass mit erhöhtem oxidativem Stress in der ApoE-defizienten Maus auch eine verstärkte AGE-Bildung einhergeht. Außerdem wurde ein ausgeprägter Anstieg der AGE-Ablagerungen mit steigendem Alter

nachgewiesen und damit ein Beweis für den erhöhten oxidativen Stress erbracht. Da die AGEs das Cross-Linking von extrazellulären Proteinen, wie den β -Amyloid, beschleunigen können, wird vermutet, dass die nachfolgende Bildung dieser Plaques die umgebenden Astrogliazellen aktivieren und so die Bildung von weiterem oxidativem Stress sowie einen Anstieg der Entzündungsmarker in AD-Hirnen bewirken können (Lüth et al., 2005; Wong et al., 2001).

Eine Erklärung dafür, dass die AGEs erst bei den 78 Wochen alten ApoE-defizienten Mäusen im Vergleich zum WT signifikant erhöht waren, könnte sein, dass die Detoxifikationsmechanismen der Zelle zum Abbau der AGEs erst im Alter gestört sind. Es ist bekannt, dass die Glyoxalase im Alter und mit fortgeschrittenem Stadium der AD abnimmt (Kuhla et al., 2007). Sie baut das Methylglyoxal, das einen Vorläufer der AGEs darstellt, zu Laktat ab, das wiederum in den Pyruvatstoffwechsel eingehen kann (Thornalley, 1993). Außerdem liegen verstärkte Cross-links zwischen den AGEs vor, die diese vor dem proteasomalen Abbau schützen, sodass es zur Aggregatbildung kommen kann (Kuhla et al., 2007). So konnten Kuhla et al. 2007 anhand menschlichen Hirngewebes zeigen, dass mit verminderter Expression von Glyoxalase I die AGE-Ablagerungen, besonders im späten Stadium der AD, zunehmen.

4.2.3 RAGE-Expression und -Interaktion mit seinen Liganden

Analog zu bisherigen Untersuchungen bei menschlichen Gehirnen (Miller et al., 2008) und anhand des 3xTg AD Mausmodells (Choi et al., 2014) wurde gezeigt, dass die RAGE-Expression bei der AD anhand ApoE-defizienten Maus im Vergleich zum gesunden Gehirn erhöht ist. Ein Grund dafür ist, dass die RAGE-Expression hauptsächlich durch das Vorhandensein bzw. die Akkumulation seiner Liganden beeinflusst wird (Fang et al., 2010). Dadurch ist die Expression von RAGE in den meisten Geweben, besonders im ZNS erwachsener gesunder Tiere relativ gering ausgeprägt (Fang et al., 2010), während sie mit fortgeschrittenem Braak-Stadium, bedingt durch eine erhöhte Ablagerung der Liganden, steigt (Miller et al., 2008). Zu diesen Liganden gehören vorzugsweise die AGEs und das β -Amyloid (Lue et al., 2001). Die Bindung von β -Amyloid an RAGE in den Neuronen kann dabei eine zelluläre Störung durch die Induzierung oxidativen Stresses und die Aktivierung des

Transkriptionsfaktors NFκB verursachen (Lue et al., 2001). Auch die AGE/RAGE Interaktion führt über die Erhöhung von NFκB zur Bildung proinflammatorischer Mediatoren (Srikanth et al., 2011). Der dadurch verursachte oxidative Stress hat wiederum einen positiven Einfluss auf die Bildung der AGEs (Li et al., 2012), die den Kreislauf der Inflammation weiter unterhalten. Außerdem fördern die AGEs die Bildung des pathogenen β-Amyloids (Vitek et al., 1994), das eine Hochregulation der RAGE-Expression in den betroffenen cerebralen Gefäßen, Neuronen und Mikroglia bewirkt (Fang et al., 2010). Somit interagieren auch die Liganden von RAGE untereinander, indem sie sich in ihrer Bildung gegenseitig positiv beeinflussen. Außerdem bewirkt die Bindung an ihren Rezeptor ebenfalls einen positiven Effekt auf die Akkumulation der Liganden. Die Entstehung dieses Circulus vitiosus fördert die Progredienz der AD.

Bei Auswertung der Ergebnisse zeigte sich, dass die RAGE-Expression bei den 24 Wochen alten WT-Mäusen ihren Höchststand erreicht und bei 78 Wochen wieder abnimmt. Eine Erklärung wäre, dass die Sensitivität von RAGE für seine, in einer Vielzahl vorliegenden Liganden, nach einer bestimmten Zeit abnimmt und damit eine geringere Interaktion resultiert. Diese wiederum mündet in der verminderten Expression von RAGE, die, wie oben beschrieben, über die Liganden selbst beeinflusst wird. In einem Bericht von Leclerc et al. (2007) wurde beschrieben, dass der Höchststand der RAGE-Expression während der Entwicklung erreicht wird und eine Abnahme der Expression im Reifeprozess während des normalen Alterns stattfindet. Dies konnte bei den genetisch vorbelasteten ApoE-defizienten Mäusen beobachtet werden, wohingegen sich die RAGE-Expression bei dem WT auf gleichem Niveau mit einer minimalen Reduktion im Verlauf der Altersstufen hielt. Allerdings muss diese Expressionsminderung von RAGE im Alter bzw. bei den 78 Wochen alten ApoE-defizienten Mäusen nicht bedeuten, dass eine verminderte Aktivierung der MAPK-Kaskade stattfindet, denn zum einen ist die Expression des phosphorylierten p42 in den 78 Wochen alten ApoE-Mäusen erhöht und zum anderen die Cyclin D1-Expression. Dies lässt vermuten, dass für die Bildung von Cyclin D1 und dem damit verbundenen Zellzykluswiedereintritt wahrscheinlich auch andere Rezeptoren und Liganden eine Rolle spielen. Signalwege, welche die Cyclin D1-Expression ebenfalls erhöhen sind bspw. der β-Catenin/LEF-1 Signalweg, der

eine Rolle beim Kolonkarzinom spielt (Shtutman et al., 1999) oder der Jak2/Stat Signalweg, der beim Mammakarzinom beteiligt ist (Brockmann et al., 2002).

4.2.4 AGEs wirken als mitogenes Signal und initiieren den Zellzyklus

Basierend auf den mitogenen Eigenschaften der AGEs bezüglich immortalisierter Neurone (Schmidt et al., 2007) wurde auch die Aktivierung eines Signalweges, der möglicherweise zum Zellzykluswiedereintritt ruhender Neurone führt, untersucht. Es wurde eine erhöhte Expression von Cyclin D1 und eine verstärkte DNA-Replikation, begleitet von einer signifikanten Phosphorylierung der p42/44 Kaskade, beobachtet. Dies spricht für eine Aktivierung der MAPK-Kaskade, welche eine Hochregulation der NFκB abhängigen Zellzyklusproteine, wie Cyclin D1, zur Folge hat (Gartner et al., 1999).

Das Auftreten von AGE/Cyclin D1 doppelpositiven Neuronen konnten Schmidt et al. (2007) am menschlichen Gehirn nachweisen. Die Autoren zeigten, dass AGEs nicht nur den Wiedereintritt von bereits differenzierten Neuronen verursachen (Schmidt et al., 2007), sondern auch, dass der Zellzyklus bis zur S-Phase durchlaufen wird. Im Gehirn der ApoE-defizienten Maus waren die AGEs häufig mit dem neuronalen Wiedereintritt in den Zellzyklus und der Polyploidie assoziiert. In der Zusammenschau mit den *in vitro* Ergebnissen von Schmidt et al. (2007) wird vermutet, dass diese Korrelation auf das AGE induzierte mitogene Signal hinweist und AGEs an dem gescheiterten Versuch bereits terminal differenzierter Neurone, in den Zellzyklus wiedereinzutreten, beitragen. Als Konsequenz entwickeln diese Neurone ein tetraploides Genom, ohne jemals die Mitose zu durchlaufen. In diesem Stadium der Aneuploidie können die Neurone einige Monate überleben, bis sie in den Zelltod eintreten (Yang & Herrup, 2005). Der Mechanismus, der zum Zelluntergang führt, ist bisher unbekannt. Ein möglicher Trigger könnten die AGE-Akkumulationen darstellen. Diese Beziehung zwischen AGEs, Cyclin D1 und der Zellalterung konnte auch an anderen Geweben, wie z.B. den epithelialen Zellen der Niere, demonstriert werden (Berkenkamp et al., 2014).

Das Phänomen des Wiedereintritts in den Zellzyklus gibt es auch in anderen Mausmodellen der Neurodegeneration, wie bspw. der meist verwendeten APP-Maus als AD-Modell (AD-R1.40, Tg2576 [oder Tg2576/PS1], und APP23), bei denen der

Wiedereintritt im Verlauf der Krankheit auftritt, bevor pathologische Zeichen wie die Plaquebildung stattfinden (Yang et al., 2006), ebenso wie in der 5xTg Maus oder der PS/APP Maus (Li et al., 2011). Inwiefern die AGE-modifizierten β -Amyloid-Ablagerungen verantwortlich für den Zellzykluswiedereintritt in der APP Maus sind, kann bisher nur spekuliert werden. Weiterhin wird von einigen Autoren berichtet, dass bestimmte Zellzyklusereignisse auch durch ROS (Kuan et al., 2004; Wen et al., 2004), die wiederum auch in dem APP-Mausmodell erhöht sind (Hamilton & Holscher, 2012), direkt ausgelöst werden können. Weiterhin bleibt abzuwarten, ob die beobachteten Zellzyklusereignisse in der ApoE-defizienten Maus direkt durch ROS, indirekt durch oxidativen Stress assoziierte AGE-Ablagerungen oder durch beides ausgelöst werden.

4.2.5 Eignung der LA als therapeutisches Antioxidans für die AD

In einem Versuch, den oxidativen Stress und die damit einhergehende AGE-Akkumulation inklusive der mitogenen Effekte zu reduzieren, wurden die ApoE-defizienten Mäuse lebenslang mit einer antioxidativen Substanz LA behandelt. LA überwindet die Blut-Hirn-Schranke und wird von allen Arealen des ZNS aufgenommen (Packer et al., 1997). Die Kombination aus Aufnahme, der Anreicherung im Gehirn, der wechselseitigen Beziehungen im Stoffwechsel, der antioxidativen Eigenschaften und der Regeneration anderer Antioxidantien vereinen viele Vorteile und lassen die LA als ideales therapeutisches Mittel zur Behandlung oder Prävention von Erkrankungen des ZNS, die mit freien Radikalen einhergehen, in Frage kommen (Packer et al., 1997). Des Weiteren erhöht LA den ACh-Spiegel durch Aktivierung der ACh-Transferase und verursacht eine erhöhte Glukoseaufnahme, wodurch mehr Acetyl-Coenzym A für die Synthese von ACh bereitgestellt wird (Holmquist et al., 2007). Andererseits hat die Verabreichung von LA auch Nachteile, da sie eine schnelle Eliminationsgeschwindigkeit aufweist und eine Tendenz zur Polymerisation zeigt (Koufaki, 2014).

Versuche einer antioxidativen Therapie wurden bereits bei Menschen durchgeführt. Die LA wird bspw. als Therapeutikum bei der diabetischen Polyneuropathie und bei endothelialen Funktionsstörungen eingesetzt (Koufaki, 2014). Laufende Studien untersuchen, ob die Vorteile der LA nicht nur für eine Behandlung von Diabetes,

sondern auch für die Prävention von Gefäßerkrankungen, Hypertonie und Entzündungsprozessen geeignet sind (Shay et al., 2009). Zudem untersuchten Arbeitsgruppen in den letzten 15 Jahren die Konstruktion und Synthese von LA-enthaltenen Hybridmolekülen, die neben der neuroprotektiven, antidiabetischen und antientzündlichen Aktivität auch kardioprotektiv und antitumorös wirken (Koufaki, 2014).

Übereinstimmend mit früheren Studien (Ramassamy et al., 1999) konnte gezeigt werden, dass die antioxidative Therapie die AD-typischen Pathologien, wie die Lipidperoxidation, in der ApoE-defizienten Maus vermindert. Die lebenslange LA-Therapie führte zu einer signifikanten Verminderung der oxidativen Stress-assoziierten AGEs, des damit einhergehenden mitogenen Signals und somit der Polyploidie der Neurone in der ApoE-defizienten Maus. Diese Ergebnisse bestätigen die Aussage von Packer et al. (1997), dass die LA besonders wirkungsvoll bei der Prävention bzw. Milderung zahlreicher neurodegenerativer Prozesse ist.

Die Therapie der AD mit LA begann bei Untersuchungen mit Menschen erst, nachdem bei ihnen die Krankheit festgestellt wurde. Das könnte zu spät sein, um mit der Therapie zu beginnen und bereits vorhandene Pathologien, wie die oxidativen Stress- assoziierten AGEs, die β -Amyloid-Plaques oder die NFTs, zu mindern bzw. zu heilen. Vermutlich könnte die LA hauptsächlich bei ApoE-defizienten Genträgern präventiv durch die Reduktion des oxidativen Stresses der Zelle wirken und deshalb lediglich vor Erkrankungsbeginn der AD die Pathogenese hinreichend positiv beeinflussen.

5. Zusammenfassung

Da die Bevölkerung im Schnitt immer älter wird, steht das 21. Jahrhundert im Zeichen neurodegenerativer Erkrankungen. Bei der AD stellen neben den β -Amyloid-Plaques und den NFTs auch der Wiedereintritt der Neurone in den Zellzyklus einen wichtigen Pathomechanismus dar. Neurone, die in den Zellzyklus eintreten, sterben bedingt durch Apoptose, bevor sie sich teilen können. Die Expression von Zellzyklusgenen bereits differenzierter Neurone könnte Ursache des mitogenen Signals sein. Aufgrund dessen, dass Mikroglia- und Astrogliazellen in der Nähe von β -Amyloid proliferieren, ist es wahrscheinlich, dass die Bestandteile der Plaques oder Faktoren, die von den Plaque-aktivierten Gliazellen sezerniert werden, als neuronales mitogenes Signal wirken. AGEs, die proteingebundene Oxidationsprodukte von Zuckern sind, könnten einen dieser mitogenen Bestandteile darstellen. Es konnte bereits am menschlichen AD-Hirn nachgewiesen werden, dass Cyclin D1 positive Neurone in enger Nachbarschaft zu AGEs vorkommen oder direkt von extrazellulären AGE-Ablagerungen umgeben sind. Bislang fehlte aber ein *in vivo* Nachweis für die mitogene Aktivität der AGEs. Mithilfe des ApoE-defizienten Mausmodells, als ein Modell der Neurodegeneration, sollte der Mechanismus aufgeklärt werden, wie es über die AGE-Akkumulation zur DNA-Replikation kommt. Mithilfe der FISH konnte belegt werden, dass in Übereinstimmung mit der Expression von Zellzyklusproteinen polyploide neuronale Zellen in der Nähe von AGE-gefärbten Neuronen im AD-Hirn der Maus im Vergleich zu nicht erkrankten Kontrollen auftraten. In Ergänzung zu den bisherigen Daten wurde nachgewiesen, dass erhöhter oxidativer Stress vermehrte AGE-Ablagerungen, begleitet von einer Aktivierung der MAPK-Kaskade über RAGE, in den Neuronen verursacht. Diese Kaskade induziert wiederum die Expression von Cyclin D1 und darüber die DNA-Replikation. Zusätzlich bewirkt die Reduzierung des oxidativen Stresses durch die Behandlung mit LA eine verminderte Ablagerung von AGEs, wodurch weniger Neurone wieder in den Zellzyklus eintreten und somit ein euploides Genom besitzen. Vermutlich könnte die LA hauptsächlich bei ApoE-defizienten Genträgern präventiv durch die Reduktion des oxidativen Stresses der Zelle wirken und deshalb lediglich vor Erkrankungsbeginn der AD die Pathogenese hinreichend positiv beeinflussen.

Literaturverzeichnis

Alzheimer Forschung Initiative e.V.: „Prof. Weggen: Ist Alzheimer erblich?“, Stand: 17.04.2013. <https://www.alzheimer-forschung.de/alzheimer-krankheit/aktuelles.htm?showid=3968> (abgerufen am 04.11.2015).

Alzheimer Forschung Initiative e.V.: „Über die Entdeckung einer eigenartigen Krankheit“ Stand: 24.01.2010. <https://www.alzheimer-forschung.de/alzheimer-krankheit/aktuelles.htm?showid=3137> (abgerufen am 08.07.2015).

Alzheimer Gesellschaft Leipzig e.V.: „Pathologische Grundlagen“, Stand: keine Angabe. <http://alzheimer-leipzig.de/informationen/demenz-alzheimer> (abgerufen am 8.07.2015).

Arendt, T.; Holzer, M.; Grossmann, A.; Zedlick, D.; Bruckner, M. K. (1995): Increased expression and subcellular translocation of the mitogen activated protein kinase kinase and mitogen-activated protein kinase in Alzheimer's disease. In: *Neuroscience* 68 (1), S. 5–18.

Arendt, T.; Holzer, M.; Stobe, A.; Gartner, U.; Luth, H. J.; Bruckner, M. K.; Ueberham, U. (2000): Activated mitogenic signaling induces a process of dedifferentiation in Alzheimer's disease that eventually results in cell death. In: *Ann N Y Acad Sci* 920, S. 249–255.

Bales, K. R.; Verina, T.; Cummins, D. J.; Du, Y.; Dodel, R. C.; Saura, J. et al. (1999): Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (26), S. 15233–15238.

Bauer, J.: „Die Alzheimer Krankheit. Neurobiologie, Psychosomatik, Diagnostik, Therapie.“, Hrsg. von Schattauer, Stuttgart 1994, ISBN 3-7945-1634-6.

Baumann, K.; Mandelkow, E. M.; Biernat, J.; Piwnica-Worms, H.; Mandelkow, E. (1993): Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. In: *FEBS Lett* 336 (3), S. 417–424.

Berbaum, Katrin; Shanmugam, Kirubakaran; Stuchbury, Grant; Wiede, Florian; Korner, Heiner; Munch, Gerald (2008): Induction of novel cytokines and chemokines by advanced glycation endproducts determined with a cytometric bead array. In: *Cytokine* 41 (3), S. 198–203. DOI: 10.1016/j.cyto.2007.11.012.

Berkenkamp, Birgit; Susnik, Nathan; Baisantry, Arpita; Kuznetsova, Inna; Jacobi, Christoph; Sorensen-Zender, Inga et al. (2014): *In vivo* and *in vitro* analysis of age-associated changes and somatic cellular senescence in renal epithelial cells. In: *PLoS one* 9 (2), S. e88071. DOI: 10.1371/journal.pone.0088071.

Bigl, Katrin; Gaunitz, Frank; Schmitt, Annett; Rothmund, Sven; Schliebs, Reinhard; Munch, Gerald; Arendt, Thomas (2008): Cytotoxicity of advanced glycation endproducts in human micro- and astroglial cell lines depends on the degree of

protein glycation. In: *J Neural Transm* 115 (11), S. 1545–1556. DOI: 10.1007/s00702-008-0126-4.

Braak, H.; Braak, E. (1991): Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. In: *Acta Neuropathol* 82 (4), S. 239–259.

Brockman, Jennifer L.; Schroeder, Matthew D.; Schuler, Linda A. (2002): PRL activates the cyclin D1 promoter via the Jak2/Stat pathway. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 16 (4), S. 774–784. DOI: 10.1210/mend.16.4.0817.

Brookmeyer, Ron; Johnson, Elizabeth; Ziegler-Graham, Kathryn; Arrighi, H. Michael (2007): Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. In: *Alzheimers Dement* 3 (3), S. 186–191. DOI: 10.1016/j.jalz.2007.04.381.

Bu, Guojun (2009): Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. In: *Nat Rev Neurosci* 10 (5), S. 333–344. DOI: 10.1038/nrn2620.

Choi, Bo-Ryoung; Cho, Woo-Hyun; Kim, Jiyoung; Lee, Hyong Joo; Chung, ChiHye; Jeon, Won Kyung; Han, Jung-Soo (2014): Increased expression of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. In: *Experimental et molecular medicine* 46, S. e75. DOI: 10.1038/emm.2013.147.

Colton, Carol A.; Brown, Candice M.; Cook, Danielle; Needham, Leila K.; Xu, Qing; Czapiga, Meggan et al. (2002): APOE and the regulation of microglial nitric oxide production: a link between genetic risk and oxidative stress. In: *Neurobiology of aging* 23 (5), S. 777–785.

Corder, E. H.; Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D. E.; Gaskell, P. C.; Small, G. W. et al. (1993): Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. In: *Science* 261 (5123), S. 921–923.

Dei, Rika; Takeda, Akinori; Niwa, Hisayoshi; Li, Mei; Nakagomi, Yuji; Watanabe, Masaki et al. (2002): Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease. In: *Acta neuropathologica* 104 (2), S. 113–122. DOI: 10.1007/s00401-002-0523-y.

Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V.: „Die Genetik der Alzheimer-Krankheit“, Stand: 1999. <https://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/FactSheet04.pdf> (abgerufen am 07.07.2015).

Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V.: „Die neurobiologischen Grundlagen der Alzheimer-Krankheit“, Stand: 1999. https://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/FactSheet02_01.pdf (abgerufen am 07.07.2015).

DGPPN, DGN, Deutsche Alzheimer Gesellschaft: „S3-Leitlinie Demenzen“, Stand: 2009. https://www.dgppn.de/fileadmin/user_upload/_medien/download/pdf/kurzversion-leitlinien/s3-leitlinie-demenz-kf.pdf (abgerufen am 08.07.2015).

Dukic-Stefanovic, S.; Schinzel, R.; Riederer, P.; Munch, G. (2001): AGES in brain ageing: AGE-inhibitors as neuroprotective and anti-dementia drugs? In: *Biogerontology* 2 (1), S. 19–34.

Dyrks, T.; Dyrks, E.; Masters, C. L.; Beyreuther, K. (1993): Amyloidogenicity of rodent and human beta A4 sequences. In: *FEBS Lett* 324 (2), S. 231–236.

Fang, Fang; Lue, Lih-Fen; Yan, Shiqiang; Xu, Hongwei; Luddy, John S.; Chen, Doris et al. (2010): RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (4), S. 1043–1055. DOI: 10.1096/fj.09-139634.

Finckh, U.: „Genetische Faktoren bei Alzheimer-Demenz“, Stand: 2006 <http://www.aerzteblatt.de/pdf/103/15/a1010.pdf> (abgerufen am 11.11.2015)

Gartner, U.; Holzer, M.; Arendt, T. (1999): Elevated expression of p21ras is an early event in Alzheimer's disease and precedes neurofibrillary degeneration. In: *Neuroscience* 91 (1), S. 1–5.

Gella, Alejandro; Durany, Nuria (2009): Oxidative stress in Alzheimer disease. In: *Cell Adh Migr* 3 (1), S. 88–93.

Geoffroy, Karen; Wiernsperger, Nicolas; Lagarde, Michel; El Bawab, Samer (2004): Bimodal effect of advanced glycation end products on mesangial cell proliferation is mediated by neutral ceramidase regulation and endogenous sphingolipids. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (33), S. 34343–34352. DOI: 10.1074/jbc.M403273200.

Gustke, N.; Steiner, B.; Mandelkow, E. M.; Biernat, J.; Meyer, H. E.; Goedert, M.; Mandelkow, E. (1992): The Alzheimer-like phosphorylation of tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs. In: *FEBS Lett* 307 (2), S. 199–205.

Hamilton, Alison; Holscher, Christian (2012): The effect of ageing on neurogenesis and oxidative stress in the APP(swe)/PS1(deltaE9) mouse model of Alzheimer's disease. In: *Brain research* 1449, S. 83–93. DOI: 10.1016/j.brainres.2012.02.015.

Hardy, John; Selkoe, Dennis J. (2002): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. In: *Science* 297 (5580), S. 353–356. DOI: 10.1126/science.1072994.

Herz, J.; Beffert, U. (2000): Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. In: *Nature reviews. Neuroscience* 1 (1), S. 51–58. DOI: 10.1038/35036221.

Holmquist, Lina; Stuchbury, Grant; Berbaum, Katrin; Muscat, Sonja; Young, Simon; Hager, Klaus et al. (2007): Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer's disease and related dementias. In: *Pharmacology et therapeutics* 113 (1), S. 154–164. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2006.07.001.

Hoozemans, Jeroen J M; Bruckner, Martina K.; Rozemuller, Annemieke J M; Veerhuis, Robert; Eikelenboom, Piet; Arendt, Thomas (2002): Cyclin D1 and cyclin E are co-localized with cyclo-oxygenase 2 (COX-2) in pyramidal neurons in Alzheimer disease temporal cortex. In: *J Neuropathol Exp Neurol* 61 (8), S. 678–688.

Huang, Yadong (2011): Roles of apolipoprotein E4 (ApoE4) in the pathogenesis of Alzheimer's disease: lessons from ApoE mouse models. In: *Biochem Soc Trans* 39 (4), S. 924–932. DOI: 10.1042/BST0390924.

Irizarry, M. C.; Rebeck, G. W.; Cheung, B.; Bales, K.; Paul, S. M.; Holzman, D.; Hyman, B. T. (2000): Modulation of A beta deposition in APP transgenic mice by an apolipoprotein E null background. In: *Ann N Y Acad Sci* 920, S. 171–178.

Joshi, Yash B.; Pratico, Domenico (2012): Vitamin E in aging, dementia, and Alzheimer's disease. In: *BioFactors (Oxford, England)* 38 (2), S. 90–97. DOI: 10.1002/biof.195.

Koufaki, Maria (2014): Therapeutic applications of lipoic acid: a patent review (2011 - 2014). In: *Expert opinion on therapeutic patents* 24 (9), S. 993–1005. DOI: 10.1517/13543776.2014.937425.

Kruman, Inna I. (2004): Why do neurons enter the cell cycle? In: *Cell Cycle* 3 (6), S. 769–773.

Kuan, Chia-Yi; Schloemer, Aryn J.; Lu, Aigang; Burns, Kevin A.; Weng, Wei-Lan; Williams, Michael T. et al. (2004): Hypoxia-ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain. In: *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 24 (47), S. 10763–10772. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3883-04.2004.

Kuhla, Angela; Ludwig, Sophie C.; Kuhla, Bjorn; Munch, Gerald; Vollmar, Brigitte (2015): Advanced glycation end products are mitogenic signals and trigger cell cycle reentry of neurons in Alzheimer's disease brain. In: *Neurobiol Aging* 36 (2), S. 753–761. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.025.

Kuhla, Bjorn; Boeck, Katharina; Schmidt, Angela; Ogunlade, Vera; Arendt, Thomas; Munch, Gerald; Luth, Hans-Joachim (2007): Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains. In: *Neurobiology of aging* 28 (1), S. 29–41. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.11.007.

Leclerc, Estelle; Fritz, Gunter; Weibel, Mirjam; Heizmann, Claus W.; Galichet, Arnaud (2007): S100B and S100A6 differentially modulate cell survival by interacting with distinct RAGE (receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (43), S. 31317–31331. DOI: 10.1074/jbc.M703951200.

Lew, J.; Wang, J. H. (1995): Neuronal cdc2-like kinase. In: *Trends Biochem Sci* 20 (1), S. 33–37.

Li, Jinlong; Liu, Danian; Sun, Ling; Lu, Yunting; Zhang, Zhongling (2012): Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: mechanisms and

perspective. In: *Journal of the neurological sciences* 317 (1-2), S. 1–5. DOI: 10.1016/j.jns.2012.02.018.

Li, Luming; Cheung, Timmy; Chen, Jianmin; Herrup, Karl (2011): A comparative study of five mouse models of Alzheimer's disease: cell cycle events reveal new insights into neurons at risk for death. In: *International journal of Alzheimer's disease* 2011, S. 171464. DOI: 10.4061/2011/171464.

Li, Y. M.; Dickson, D. W. (1997): Enhanced binding of advanced glycation endproducts (AGE) by the ApoE4 isoform links the mechanism of plaque deposition in Alzheimer's disease. In: *Neurosci Lett* 226 (3), S. 155–158.

Lue, L. F.; Walker, D. G.; Brachova, L.; Beach, T. G.; Rogers, J.; Schmidt, A. M. et al. (2001): Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. In: *Experimental neurology* 171 (1), S. 29–45. DOI: 10.1006/exnr.2001.7732.

Lüth, Hans-Joachim; Ogunlade, Vera; Kuhla, Bjorn; Kientsch-Engel, Rosemarie; Stahl, Peter; Webster, Julie et al. (2005): Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. In: *Cereb Cortex* 15 (2), S. 211–220. DOI: 10.1093/cercor/bhh123.

Masliah, E.; Mallory, M.; Ge, N.; Alford, M.; Veinbergs, I.; Roses, A. D. (1995): Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. In: *Exp Neurol* 136 (2), S. 107–122. DOI: 10.1006/exnr.1995.1088.

Mattson, M. P.; Carney, J. W.; Butterfield, D. A. (1995): A tombstone in Alzheimer's? In: *Nature* 373 (6514), S. 481. DOI: 10.1038/373481a0.

McShea, A.; Harris, P. L.; Webster, K. R.; Wahl, A. F.; Smith, M. A. (1997): Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease. In: *Am J Pathol* 150 (6), S. 1933–1939.

Miller, Miles C.; Tavares, Rosemarie; Johanson, Conrad E.; Hovanesian, Virginia; Donahue, John E.; Gonzalez, Liliana et al. (2008): Hippocampal RAGE immunoreactivity in early and advanced Alzheimer's disease. In: *Brain research* 1230, S. 273–280. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.06.124.

Möller, HJ., Laux, G., Deister, A.: „Psychiatrie und Psychotherapie“, In: Duale Reihe. 4. Auflage. Thieme-Verlag: Stuttgart 2009, ISBN 978-3131285447.

Morris, Cynthia D.; Carson, Susan (2003): Routine vitamin supplementation to prevent cardiovascular disease: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. In: *Annals of internal medicine* 139 (1), S. 56–70.

Mosch, Birgit; Morawski, Markus; Mittag, Anja; Lenz, Dominik; Tarnok, Attila; Arendt, Thomas (2007): Aneuploidy and DNA replication in the normal human brain and Alzheimer's disease. In: *J Neurosci* 27 (26), S. 6859–6867. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0379-07.2007.

- MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial (2002). In: *Lancet (London, England)* 360 (9326), S. 23–33.
- Münch, G.; Gasic-Milenkovic, J.; Arendt, T. (2003): Effect of advanced glycation endproducts on cell cycle and their relevance for Alzheimer's disease. In: *Journal of neural transmission. Supplementum* (65), S. 63–71.
- Nagy, Z. (2000): Cell cycle regulatory failure in neurones: causes and consequences. In: *Neurobiol Aging* 21 (6), S. 761–769.
- Nohl, H.; Gille, L.; Kozlov, A. V. (1999): Critical aspects of the antioxidant function of coenzyme Q in biomembranes. In: *BioFactors (Oxford, England)* 9 (2-4), S. 155–161.
- Packer, L.; Tritschler, H. J.; Wessel, K. (1997): Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. In: *Free Radic Biol Med* 22 (1-2), S. 359–378.
- Packer, L.; Witt, E. H.; Tritschler, H. J. (1995): alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. In: *Free Radic Biol Med* 19 (2), S. 227–250.
- Poirier, Judes (2000): Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease A Role in Amyloid Catabolism. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 924 (1), S. 81–90. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05564.x.
- Pratico, Domenico (2008): Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. In: *Trends Pharmacol Sci* 29 (12), S. 609–615. DOI: 10.1016/j.tips.2008.09.001.
- Raichlen, David A.; Alexander, Gene E. (2014): Exercise, APOE genotype, and the evolution of the human lifespan. In: *Trends Neurosci* 37 (5), S. 247–255. DOI: 10.1016/j.tins.2014.03.001.
- Ramassamy, C.; Averill, D.; Beffert, U.; Bastianetto, S.; Theroux, L.; Lussier-Cacan, S. et al. (1999): Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype. In: *Free Radic Biol Med* 27 (5-6), S. 544–553.
- Ramassamy, C.; Krzykowski, P.; Averill, D.; Lussier-Cacan, S.; Theroux, L.; Christen, Y. et al. (2001): Impact of apoE deficiency on oxidative insults and antioxidant levels in the brain. In: *Brain Res Mol Brain Res* 86 (1-2), S. 76–83.
- Rautenberg, D.: „Infografik: Demenz- Zahlen und Fakten“, Stand: 18.03.2014. <http://www.jedermann-gruppe.de/demenz-zahlen-fakten-infografik/> (abgerufen am 08.07.2015).
- Rehen, Stevens K.; Yung, Yun C.; McCreight, Matthew P.; Kaushal, Dhruv; Yang, Amy H.; Almeida, Beatriz S V et al. (2005): Constitutional aneuploidy in the normal human brain. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25 (9), S. 2176–2180. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4560-04.2005.

- Roy, S.; Packer, L. (1998): Redox regulation of cell functions by alpha-lipoate: biochemical and molecular aspects. In: *BioFactors (Oxford, England)* 8 (1-2), S. 17–21.
- Satoh, H.; Togo, M.; Hara, M.; Miyata, T.; Han, K.; Maekawa, H. et al. (1997): Advanced glycation endproducts stimulate mitogen-activated protein kinase and proliferation in rabbit vascular smooth muscle cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 239 (1), S. 111–115. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7424.
- Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D.; George-Hyslop, P. H.; Pericak-Vance, M. A.; Joo, S. H. et al. (1993): Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. In: *Neurology* 43 (8), S. 1467–1472.
- Schmidt, A.; Kuhla, B.; Bigl, K.; Munch, G.; Arendt, T. (2007): Cell cycle related signaling in Neuro2a cells proceeds via the receptor for advanced glycation end products. In: *J Neural Transm* 114 (11), S. 1413–1424. DOI: 10.1007/s00702-007-0770-0.
- Shay, Kate Petersen; Moreau, Regis F.; Smith, Eric J.; Smith, Anthony R.; Hagen, Tory M. (2009): Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. In: *Biochim Biophys Acta* 1790 (10), S. 1149–1160. DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.07.026.
- Shtutman, M.; Zhurinsky, J.; Simcha, I.; Albanese, C.; D'Amico, M.; Pestell, R.; Ben-Ze'ev, A. (1999): The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (10), S. 5522–5527.
- Smith, M. A.; Sayre, L. M.; Vitek, M. P.; Monnier, V. M.; Perry, G. (1995): Early AGEing and Alzheimer's. In: *Nature* 374 (6520), S. 316. DOI: 10.1038/374316b0.
- Srikanth, Velandai; Maczurek, Annette; Phan, Thanh; Steele, Megan; Westcott, Bernadette; Juskiw, Damian; Munch, Gerald (2011): Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. In: *Neurobiol Aging* 32 (5), S. 763–777. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.04.016.
- Stirban, Alin; Gawlowski, Thomas; Roden, Michael (2014): Vascular effects of advanced glycation endproducts: Clinical effects and molecular mechanisms. In: *Mol Metab* 3 (2), S. 94–108. DOI: 10.1016/j.molmet.2013.11.006.
- Strittmatter, W. J.; Saunders, A. M.; Schmechel, D.; Pericak-Vance, M.; Enghild, J.; Salvesen, G. S.; Roses, A. D. (1993): Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (5), S. 1977–1981.
- Suchy, James; Chan, Amy; Shea, Thomas B. (2009): Dietary supplementation with a combination of alpha-lipoic acid, acetyl-L-carnitine, glycerophosphocoline, docosahexaenoic acid, and phosphatidylserine reduces oxidative damage to murine brain and improves cognitive performance. In: *Nutr Res* 29 (1), S. 70–74. DOI: 10.1016/j.nutres.2008.11.004.

- Thornalley, P. J. (1993): The glyoxalase system in health and disease. In: *Molecular aspects of medicine* 14 (4), S. 287–371.
- Van de Vijver, Marc et al. "Chromogenic *in Situ* hybridisation for the Assessment of HER2 Status in Breast Cancer: An International Validation Ring Study." *Breast cancer research : BCR* 9.5 (2007): R68. *PMC*. Web. 31 Mar. 2016.
- Vincent, I.; Jicha, G.; Rosado, M.; Dickson, D. W. (1997): Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. In: *J Neurosci* 17 (10), S. 3588–3598.
- Vitek, M. P.; Bhattacharya, K.; Glendening, J. M.; Stopa, E.; Vlassara, H.; Bucala, R. et al. (1994): Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (11), S. 4766–4770.
- Vivekananthan, Deepak P.; Penn, Marc S.; Sapp, Shelly K.; Hsu, Amy; Topol, Eric J. (2003): Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. In: *Lancet (London, England)* 361 (9374), S. 2017–2023. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)13637-9.
- Wen, Tong-Chun; Rogido, Marta; Genetta, Tom; Sola, Augusto (2004): Permanent focal cerebral ischemia activates erythropoietin receptor in the neonatal rat brain. In: *Neuroscience letters* 355 (3), S. 165–168.
- Wong, A.; Luth, H. J.; Deuther-Conrad, W.; Dukic-Stefanovic, S.; Gasic-Milenkovic, J.; Arendt, T.; Munch, G. (2001): Advanced glycation endproducts co-localize with inducible nitric oxide synthase in Alzheimer's disease. In: *Brain research* 920 (1-2), S. 32–40.
- Yan, S. D.; Chen, X.; Schmidt, A. M.; Brett, J.; Godman, G.; Zou, Y. S. et al. (1994): Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (16), S. 7787–7791.
- Yang, Y.; Geldmacher, D. S.; Herrup, K. (2001): DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. In: *J Neurosci* 21 (8), S. 2661–2668.
- Yang, Yan; Herrup, Karl (2005): Loss of neuronal cell cycle control in ataxia-telangiectasia: a unified disease mechanism. In: *J Neurosci* 25 (10), S. 2522–2529. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4946-04.2005.
- Yang, Yan; Herrup, Karl (2007): Cell division in the CNS: protective response or lethal event in post-mitotic neurons? In: *Biochimica et biophysica acta* 1772 (4), S. 457–466. DOI: 10.1016/j.bbadis.2006.10.002.
- Yang, Yan; Mufson, Elliott J.; Herrup, Karl (2003): Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. In: *J Neurosci* 23 (7), S. 2557–2563.
- Yang, Yan; Varvel, Nicholas H.; Lamb, Bruce T.; Herrup, Karl (2006): Ectopic cell cycle events link human Alzheimer's disease and amyloid precursor protein transgenic mouse models. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the*

Society for Neuroscience 26 (3), S. 775–784. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3707-05.2006.

Yi, Xianwen; Maeda, Nobuyo (2006): alpha-Lipoic acid prevents the increase in atherosclerosis induced by diabetes in apolipoprotein E-deficient mice fed high-fat/low-cholesterol diet. In: *Diabetes* 55 (8), S. 2238–2244. DOI: 10.2337/db06-0251.

Yi, Xiaohua; Pashaj, Anjeza; Xia, Mengna; Moreau, Regis (2013): Reversal of obesity-induced hypertriglyceridemia by (R)-alpha-lipoic acid in ZDF (fa/fa) rats. In: *Biochem Biophys Res Commun* 439 (3), S. 390–395. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.08.063.

Yurov, Yuri B.; Iourov, Ivan Y.; Monakhov, Viktor V.; Soloviev, Ilia V.; Vostrikov, Viktor M.; Vorsanova, Svetlana G. (2005): The variation of aneuploidy frequency in the developing and adult human brain revealed by an interphase FISH study. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 53 (3), S. 385–390. DOI: 10.1369/jhc.4A6430.2005.

Zhao, Yan; Zhao, Baolu (2013): Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. In: *Oxid Med Cell Longev* 2013, S. 316523. DOI: 10.1155/2013/316523.

Thesen zur Dissertation

1. Bei der Alzheimerschen Erkrankung (AD) stellt der Wiedereintritt der Neurone in den Zellzyklus einen wichtigen pathogenetischen Faktor dar.
2. Durch Nichtbeschreiten der Mitosephase kommt es zur Bildung eines aneuploiden Genoms der Neurone, das über den Eintritt in die Apoptose den Nervenzelltod fördert.
3. Zudem weiß man, dass ein ApoE4-Polymorphismus für die späte Form der AD verantwortlich ist und zum erhöhten oxidativen Stress führt, welcher über eine vermehrte Glykierung die Bildung und Ablagerung von Advanced Glycation Endproducts (AGEs) bewirkt.
4. Um einen ApoE-Polymorphismus zu simulieren, wurde das Modell der ApoE-defizienten Maus verwendet.
5. So findet man in den ApoE-defizienten Mäusen die oxidativen-Stress assoziierten AGE-Ablagerungen, die vor allem in seneszenten Mäusen durch eine altersbedingte Abnahme der Enzymaktivität, wie bspw. der Glyoxalase, auftreten.
6. Einhergehend mit der AGE-Akkumulation kommt es zur erhöhten Expression ihres Rezeptors RAGE bei der seneszenten ApoE-defizienten Maus im Vergleich zum gesunden Mausgehirn.
7. Des Weiteren konnte bei Neuronen mit AGE-Ablagerungen der Wiedereintritt in den Zellzyklus in Form einer erhöhten Cyclin D1-Expression beobachtet werden.
8. Demnach könnten die AGEs mitogen wirken, indem sie über RAGE und der nachfolgenden verstärkten Aktivierung der MAPK-Kaskade die Cyclin D1-Expression erhöhen, was wiederum die DNA-Replikation induziert.
9. Durch eine lebenslange Behandlung mit dem Antioxidans Alpha-Liponsäure (LA) kommt es zur signifikanten Reduktion der oxidativen Stress-assoziierten AGE-Ablagerungen, des damit einhergehenden mitogenen Signals und somit der Polyploidie der Neurone in der ApoE-defizienten Maus.
10. Vermutlich könnte die LA besonders bei dem ApoE-Polymorphismus präventiv durch die Reduktion des oxidativen Stresses der Zelle wirken und deshalb lediglich vor Erkrankungsbeginn der AD die Pathogenese hinreichend positiv beeinflussen.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Brigitte Vollmar, der Direktorin des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock, für die Möglichkeit, diese Arbeit an ihrem Institut durchzuführen. Ihre Betreuung und stete Unterstützung haben mich geprägt und mein Studium wesentlich beeinflusst. Auch für ihre Hilfe bei der Veröffentlichung der eigenen Forschungsergebnisse, der Fertigstellung der Arbeit und die Möglichkeit eines Vortrages auf einem Kongress bedanke ich mich sehr herzlich.

Ganz besonders danke ich Frau PD Dr. rer. nat. Angela Kuhla für die enge Zusammenarbeit, ihre professionelle und hervorragende technische Unterstützung bei der Durchführung komplexer Experimente, sowie der ständigen Bereitschaft, Fragen und Probleme zu klären.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Berit Blendow, Eva Lorbeer-Rehfeld und Maren Nerowski sowohl für ihre stetige Hilfsbereitschaft und wertvolle technische Assistenz im Laboralltag als auch für ihre informativen Anregungen und Erklärungen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dorothea Frenz für viele schöne gemeinsame Stunden bei der Laborarbeit und ihre stetige Hilfe, die vieles erleichtert hat. Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei Frau Anja Gellert für ihre fortwährende Hilfe und Unterstützung bedanken. Auch den hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Experimentellen Chirurgie bin ich für die gute und freundliche Zusammenarbeit und für das angenehme Arbeitsklima am Institut sehr dankbar.

Mein Dank gilt zudem all meinen Freundinnen und Freunden, die mich im Studium und während der Promotion nicht nur tatkräftig unterstützt haben, sondern mich stets aufbauten und für die erforderliche Abwechslung sorgten. Ein besonderer Dank geht an meinen Partner Tino, der mich immer wieder motiviert hat und zu der Form der Doktorarbeit wesentlich beigetragen hat.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Großmutter bedanken, für ihre, vor allem finanzielle, Unterstützung, ihre Kraft und ihre Liebe, die mich all die Jahre durch mein Studium begleitet haben und mich auch bei der Erstellung der Dissertation moralisch unterstützten und somit zum Gelingen beigetragen haben.