

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie
und Psychotherapie der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Hans-Jürgen Möller

**Serotonin-induziertes Kalzium-Signal
in Lymphozyten von Patienten
mit Morbus Alzheimer**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Andrea Katharina Alice Viskorf
aus Münster

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Berichterstatter.....Prof. Dr. B. Bondy
2. Berichterstatter.....Prof. Dr. A. Konnerth
Mitberichterstatter.....Prof. Dr. R. Baumeister
.....Prof. Dr. J. Remien
DekanProf. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung24.07.2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1. Die Alzheimersche Erkrankung.....	5
1.1.1. „Ich habe mich sozusagen verloren...“ (Auguste D.).....	5
1.1.2. Epidemiologie und Risikofaktoren.....	6
1.1.3. Diagnose.....	8
1.1.4. Klinik.....	8
1.1.5. Therapie.....	9
1.2. Allgemeine pathophysiologische Aspekte.....	11
1.2.1. Pathologie des M. Alzheimer.....	11
1.2.2. Neurochemische Veränderungen bei M. Alzheimer.....	11
2. Die Hypothesen dieser Dissertation.....	15
2.1. Eine serotonerge Hypothese und der 5-HT _{2a} -Rezeptor.....	15
2.1.1. Funktionen des serotonergen Systems.....	15
2.1.2. Veränderungen des serotonergen Systems bei der Alzheimer-Demenz.....	17
2.1.3. Mögliche Ursachen für einen kortikalen Nervenzelluntergang und Funktion des 5-HT _{2a} -Rezeptors bei AD.....	19
2.2. Die „Kalzium-Hypothese“.....	23
2.2.1. Physiologie der intrazellulären Kalzium-Homöostase.....	23
2.2.2. Kalzium-Hypothese der neurodegenerativen Erkrankungen.....	26
2.2.3. Veränderungen der Kalzium-Homöostase bei der Alzheimer-Demenz.....	28
2.2.4. Mögliche Ursachen einer Störung der Kalzium-Homöostase.....	30
3. Ziele der Dissertation.....	35
4. Material und Methoden.....	37
4.1. Patienten und Probanden.....	37
4.1.1. Patienten.....	37
4.1.2. Kontrollpersonen.....	39
4.2. Kalzium-Messungen.....	40
4.2.1. Untersuchungsmaterial.....	40
4.2.2. Kalzium-Messungen am LS 50 B.....	41
4.2.3. Strahlengang.....	42
4.2.4. Die 5-HT-Rezeptorantagonisten.....	43
4.2.5. Statistische Analyse.....	43
4.3. Bestimmung des His452Tyr-Polymorphismus des 5-HT _{2a} -Rezeptor-Gens.....	45
4.3.1. Materialgewinnung.....	45
4.3.2. PCR-Restriktions-Längenpolymorphismus.....	46
5. Ergebnisse.....	51
5.1. Das 5-HT induzierte Kalzium-Signal in humanen Lymphozyten.....	51
5.1.1. Morphologie des aufgezeichneten Kalzium-Signals.....	51
5.1.2. Dosis-Wirkungs-Beziehung des Agonisten 5-HT.....	52
5.1.3. Einteilung der Kalziumkurven in 4 Abschnitte und Auswertung.....	53
5.1.4. Der 5-HT _{2a} -Rezeptor auf humanen Lymphozyten.....	53

5.2. Das Serotonin-induzierte Kalzium-Signal bei gerontopsychiatrischen Patienten und gesunden Kontrollen	57
5.2.1. Patienten und Kontrollen	57
5.2.2. Vergleich der Kalziumionenkonzentration zu 4 definierten Zeiten: Basalwert, initiales Maximum, Minimum, finales Maximum	60
5.2.3. Vergleich der Kinetik	63
5.2.4. Zusammenfassung	65
5.3. Der His452Tyr-Polymorphismus des 5-HT _{2a} -Rezeptor-Gen:	66
5.3.1. Patienten und Kontrollen	66
5.3.2. Verteilung der Allel-Frequenzen bei Patienten und Kontrollen	67
5.3.3. Assoziation des durch 5-HT ausgelösten Kalzium-Signals mit dem 5-HT-Rezeptor-Genotyp.....	68
6. Diskussion	71
6.1. Lymphozyten als Modell für zelluläre degenerative Prozesse des zentralen Nervensystems (ZNS).....	71
6.2. Der 5-HT _{2a} -Rezeptor auf humanen Lymphozyten	73
6.3. Die basale Kalziumionenkonzentration	74
6.4. Das initiale Maximum des Kalzium-Signals	75
6.4.1. Genetische Faktoren für ein erhöhtes Kalzium-Signal nach serotonerger Stimulation	77
6.4.2. Gesteigerte serotonerge Signaltransduktion und depressive bzw. kognitive Symptome bei AD	79
6.5. Das Minimum des Serotonin-induzierten Kalzium-Signals	81
6.6. Das finale Maximum des Serotonin-induzierten Kalzium-Signals	81
6.6.1. Faktoren, die zu einem verstärkten CCE beitragen könnten.....	81
6.6.2. Veränderungen des CCE's bei der familiären Form.....	83
6.6.3. Folgen des verstärkten Kapazitiven KalziumionenEinstroms.....	85
6.7. Die Kinetik des Kalzium-Signals: Hinweis auf eine verkürzte Halbwertszeit...86	
6.7.1. Faktoren, die zu einem früheren Erreichen des Minimums beitragen könnten	86
6.7.2. Mögliche Folgen der verkürzten Halbwertszeit des serotonergen Signals	87
6.8. Die Gruppe der „anderen kognitiven Störungen“	88
6.8.1. Das serotonin-induzierte Kalzium-Signal ist kein diagnostischer Marker.....	88
6.8.2. Veränderung der Kalzium-Homöostase in der aKS-Gruppe	88
6.9. Zusammenfassende kritische Beurteilung	88
7. Zusammenfassung.....	91
8. Danksagung	93
9. Abkürzungsverzeichnis	94
10. Literaturverzeichnis	96
Lebenslauf: Andrea Katharina Alice Viskorf.....	109

1. Einleitung

1.1. Die Alzheimersche Erkrankung

1.1.1. „ICH HABE MICH SOZUSAGEN VERLOREN...“ (AUGUSTE D.)

Viele Familien sind davon betroffen: Der Vater, Opa oder Onkel wirkt zunächst etwas zerstreut, kann sich Neues schlecht merken und drückt sich umständlicher aus. Dann kommt es immer wieder vor, dass er nicht mehr weiß, wo er wichtige Sachen abgelegt hat. Er ist nicht mehr so umgänglich wie früher und reagiert schnell gereizt. Eigentlich war er immer aufgeschlossen und interessiert, doch jetzt fragt er immerzu das Gleiche und sitzt oft teilnahmslos da. Er weiß sich nicht mehr zu beschäftigen und scheint sogar das Interesse für die Enkelkinder zu verlieren. Komplizierten Unterhaltungen kann er schon länger nicht mehr folgen. Irgendwann kommt die befürchtete Zeit, in der der alte Mann nicht einmal mehr vom Supermarkt nach Hause findet und selbst seine Verwandten nicht mehr erkennt. Sogar bei alltäglichen Aufgaben benötigt er nun Hilfe, beim Waschen, Anziehen und Essen, auch beim Toilettengang. Innerhalb weniger Jahre hat ein vorher unbeeinträchtigter Mann einen Großteil seiner kognitiven und intellektuellen Fähigkeiten verloren.

Schilderungen solcher Persönlichkeitsveränderungen, die nach lebenslang ungestörtem Geisteszustand auftreten und schleichend fortschreiten, findet man bereits in antiken Schriften. Alois Alzheimer beschrieb 1906 pathologisch genau die häufigste Demenzform, die später nach ihm benannte Alzheimersche Demenz (AD). Sein Verdienst liegt vor allem in der exakten Beschreibung verschiedener Fälle unter anderem den der Auguste D. und der darauf aufbauenden Definition der AD als eigenständiges Krankheitsbild.

Ursprünglich bezog sich der Begriff Alzheimer-Krankheit ausschließlich auf eine Demenz, die vor dem 65. Lebensjahr beginnt und durch die morphologische Trias pathologische Fibrillenveränderung, amyloide Plaques und Zellatrophie gekennzeichnet ist (Alzheimer 1906). Seit den 70er Jahren wurden einige Formen der senilen Demenz, die weder anhand klinischer Merkmale noch anhand pathologisch-anatomischer Untersuchungen Unterschiede zur Alzheimer-Demenz aufwiesen, dieser

zugeordnet (Tomlinson, Blessed et al. 1970). Aber das, was man nun unter dem Begriff Alzheimer-Demenz (AD) versteht, ist sehr wahrscheinlich keine einheitliche Krankheitsentität. Unter diesem Begriff werden degenerative Erkrankungen des zentralen Nervensystems subsummiert, die die pathomorphologische Trias zeigen und klinisch durch einen schleichenden Verlust des Gedächtnisses, von intellektuellen und höheren kortikalen Fähigkeiten, durch Orientierungsstörungen, Urteilsschwäche und Persönlichkeitsveränderungen charakterisiert sind.

Heute wird diese Vereinheitlichung von vielen Autoren nicht mehr unterstützt und man differenziert wieder verschiedene Unterformen nach pathogenetischen und auch klinischen Gesichtspunkten, zum Beispiel eine familiäre Alzheimer-Demenz von einer nicht familiären Alzheimer-Demenz, oder nach dem Alter bei Erkrankung die präsenile Demenz vom Alzheimer-Typ, die vor dem 65. Lebensjahr beginnt von der senilen Demenz vom Alzheimer-Typ, die später beginnt. Die Unterschiede werden aber auch auf molekularer und subzellulärer Ebene deutlich (Gottfries 1985). Vielleicht ist es durch eine genauere Definition von Krankheitsbildern oder Erkrankungsformen in der Zukunft möglich, individueller zu diagnostizieren und zu therapieren.

1.1.2. EPIDEMIOLOGIE UND RISIKOFAKTOREN

Dementiellen Erkrankungen kann eine Vielzahl von Ursachen zugrunde liegen, neben primär degenerativen Prozessen internistische oder neurologische Erkrankungen. Epidemiologischen Studien zufolge, liegt ungefähr bei der Hälfte aller dementiellen Erkrankungen eine Demenz vom Alzheimer-Typ vor (Bachmann, Wolf et al. 1992). Die Prävalenz dementieller Erkrankungen wird auf 2% der über 65jährigen geschätzt, verdoppelt sich ungefähr alle 5 Jahre und erreicht in der Gruppe der über 85jährigen 30% (Hofman, Rocca et al. 1991).

AD kann zwar zu jedem Zeitpunkt im erwachsenen Lebensalter auftreten, doch ist die Mehrheit der Patienten bei Erkrankungsbeginn in der 6. Lebensdekade. Aufgrund der strengen Altersabhängigkeit und der sich verändernden Altersstruktur zu Gunsten der älteren Bevölkerung wird mit einem Anstieg der Prävalenz bezogen auf die Gesamtbevölkerung gerechnet. Alter gehört zu einem der beiden wichtigsten Risikofaktoren

(Hendrie 1998).

Eine positive Familienanamnese stellt einen zweiten wichtigen Faktor dar. So haben Verwandte ersten Grades von Patienten mit AD ein signifikant erhöhtes Risiko, an AD zu erkranken. Bei frühem Krankheitsbeginn lassen sich häufiger Familienangehörige mit AD finden (Li, Silverman et al. 1995). Neben Beschreibungen von autosomal dominanten Erbgängen gibt es Zwillingsstudien und Beobachtungen von familiärer Häufung ohne klaren Erbgang, die auf mehr als einen genetischen Faktor hinweisen (Heyman, Wilkinson et al. 1983; Nee, Eldrige et al. 1987).

Wichtige genetische Risikofaktoren sind Veränderungen im Amyloid-Precursor-Protein (APP)-Gen auf Chromosom 21, die die Expressionsrate, Prozessierungswege und Löslichkeit des β -Amyloids ($A\beta$) beeinflussen, Mutationen in den Presenilin-Genen (Yasuda, Hirono et al. 1999) und vor allem für die sporadischen Formen der AD das $\epsilon 4$ Allel des Apolipoproteins E (ApoE). 40-65% aller Patienten mit AD besitzen zumindest ein $\epsilon 4$ Allel im Vergleich zu einer Rate von 25% in der Normalbevölkerung, doch weder ist der Besitz eines $\epsilon 4$ Allels notwendig noch hinreichend, um AD zu entwickeln (Tilley, Morgan et al. 1999). ApoE ist in den Transport von Cholesterin involviert und kann die Löslichkeit oder Funktion von Proteinen beeinflussen, indem es z.B. an $A\beta$ und Zytoskelett-Proteine bindet. Es korreliert mit erhöhtem Plasma-LDL-Cholesterin und erhöht das Risiko für Atherosklerose und die vaskuläre Demenz.

Weitere Erkrankungsrisiken konnten statistisch nicht als Entstehungsfaktoren für AD gesichert werden. Zum Beispiel wurde für Frauen ein größeres Erkrankungsrisiko festgestellt, das aber erst im hohen Lebensalter deutlich hervortritt (Andersen, Launer et al. 1999) und vermutlich mit einem späteren Erkrankungsbeginn für Frauen und einer höheren Lebenserwartung (Ott, Breteler et al. 1998) auch nach der Diagnosestellung zusammenhängt (Bachmann, Wolf et al. 1992; Jagger, Andersen et al. 2000). Andere Faktoren, z.B. eine geringe Ausbildung (Letenneur, Launer et al. 2000), geographische Unterschiede (Fratiglioni, De Ronchi et al. 1999) und Umwelteinflüsse (Schwermetallbelastung, Viren und Prionen) haben sich epidemiologisch nicht bestätigt.

1.1.3. DIAGNOSE

AD ist eine langsam progrediente Erkrankung, deren Symptome stadienabhängig variieren. Frühdiagnosen sind schwer zu stellen aufgrund des schleichenden Verlaufs der Erkrankung, dem Fehlen von frühen diagnostischen und biologischen Markern und der schwierigen Differentialdiagnosen Depression und leichte kognitive Störung zu Beginn der Erkrankung.

Um diesen Schwierigkeiten gerecht zu werden, wurden stadienabhängige Diagnosekriterien von der Arbeitsgruppe des National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) und der Alzheimer's Disease and Related Diseases Association (ADRDA) formuliert (McKhann, Drachman et al. 1984). Es wird eine mögliche (possible) von einer wahrscheinlichen (probably) und einer sicheren (definite) Erkrankung unterschieden. Die Diagnose „wahrscheinliche Alzheimer-Demenz“ basiert auf einer durch klinische und neuropsychologische Kriterien definierten Demenz, dem Alter des Patienten (über 40 Jahre), Defiziten in 2 oder mehr kognitiven Bereichen, progrediente Verschlechterung von Gedächtnis und anderen kognitiven Funktionen, Fehlen von Bewusstseinsstörungen und dem Ausschluss anderer Ursachen. Bei Anwendung dieser Kriterien lässt sich die Diagnose in über 85% der Patienten autoptisch bestätigen. Die Diagnose „mögliche Alzheimer-Erkrankung“ wird bei unüblichen Verläufen und bei Zweiterkrankungen, die eine Demenz erklären könnten, aber nicht für die Ursache gehalten werden, gestellt. Die definitive Diagnose kann erst post mortem nach histopathologischer Untersuchung des Gehirns gestellt werden.

1.1.4. KLINIK

Das Kardinalsymptom der AD ist die schleichend zunehmende Gedächtnisstörung (La Rue, Watson et al. 1992). Erst später treten weitere Funktionseinbußen deutlicher hervor. Es können beinahe alle höheren kortikalen Funktionen betroffen sein (Adams, Victor et al. 1997), deren Defizite sich in unterschiedlichem Ausmaß und zeitlichem Ablauf darstellen. Störungen der räumlichen Orientierung sind bei AD

charakteristisch und lassen sich zum Beispiel beim Kopieren einfacher geometrischer Figuren demonstrieren.

Motorische und andere neurologische Dysfunktionen werden mit der Dauer der Erkrankung immer häufiger, sodass in der Endphase 50% der Patienten Symptome eines diskreten Parkinsonismus mit Akinese, Rigor und Tremor aufweisen (Pearce 1974) und durch Aufhebung der posturalen Reflexe bettlägerig werden.

AD-spezifische Veränderungen des Verhaltens können erste Symptome darstellen, zum Beispiel einen Verlust an Spontaneität und eine Veränderung der Persönlichkeit (Petry, Cummings et al. 1988). Auch kommt es zu Beginn häufig (20%, (Reding, Haycox et al. 1985)) zu einem depressiven Bild mit Interesselosigkeit, Antriebsstörungen und Leistungseinbußen, Symptome, welche die dementielle Symptomatik überlagern und verdecken können. Im Verlauf der Erkrankung können andere Verhaltensauffälligkeiten in Form von Agitation, Aggressivität, Apathie und körperlicher Vernachlässigung auftreten. Zudem können sich Schlafstörungen mit Aufhebung eines normalen Tag-Nacht-Rhythmus, Angststörungen und paranoide Wahnvorstellungen mit meist visuellen Halluzinationen entwickeln (Deutsch, Bylsma et al. 1991; Borson and Raskind 1997; Devanand, Jacobs et al. 1997) und die Pflege durch Angehörige sehr erschweren oder unmöglich machen.

Die Alzheimer-Krankheit geht mit einer verminderten Lebenserwartung einher, bei Diagnosestellung ist durchschnittlich ein Verlauf über 4 Jahre zu erwarten, nach dem retrospektiv festgestellten Beginn der Erkrankung ein Verlauf über 7 bis 8 Jahre (Häfner 1990). Häufigste Todesursachen sind Pneumonien oder Harnwegsinfektionen und andere Komplikationen der Urininkontinenz und Bettlägerigkeit.

1.1.5. THERAPIE

Die medikamentöse Behandlung der kognitiven Symptome basiert heute noch zu einem großen Teil auf der „cholinergen Mangelhypothese“. Um die cholinerge Funktion zu verbessern, werden vor allem Acetylcholinesterase-Inhibitoren verabreicht, aber auch Acetylcholin-Rezeptor-Agonisten und Nootropika, von denen angenommen wird, dass sie unspezifisch die Aktivität cholinergischer Neurone erhöhen (Tune and

Sunderland 1998). Die Substanzen verbessern die globalen kognitiven Fähigkeiten, besonders die Aufmerksamkeit (Nordberg 1996; Lawrence and Sahakian 1998), während sich die auffallendsten Symptome im Bereich Lernen und Gedächtnis schlechter positiv beeinflussen lassen. Beste Ergebnisse erlangt man bei frühzeitiger Therapie. Doch nach wie vor sind die Studien widersprüchlich und man kann allenfalls eine Verlangsamung des Fortschreitens erwarten.

Verhaltensstörungen werden mit dieser Therapie zum Teil auch günstig beeinflusst, doch müssen meist zusätzliche Medikamente, die für primäre psychiatrische Symptome entwickelt wurden, eingesetzt werden (Devanand 1997; Kumar, Durai et al. 1998). Umgekehrt beobachtet man bei der Therapie mit Antidepressiva und Neuroleptika zusätzlich zu der Modulation des Verhaltens eine Verbesserung der kognitiven Funktionen. Dieses wurde besonders bei der Therapie mit Medikamenten, die in das serotonerge System eingreifen, beobachtet (Nordberg 1996; Borson and Raskind 1997; Kumar, Durai et al. 1998; Ritchie, Touchon et al. 1998). Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer beeinflussen sowohl den Umgang mit der Krankheit als auch Aggressivität, Angststörungen, depressive Verstimmungen und motorische Unruhe günstig und können signifikante Verbesserungen der Emotionsmodulationsfähigkeit induzieren (Bergman, Brane et al. 1983; Nyth and Gottfries 1990).

Rehabilitation und psychosoziale Therapie begleiten die pharmakologische Therapie. Ihr Ziel ist es, vor allem den Umgang mit der Krankheit für Patient und Pflegeperson zu erleichtern und die Pflegebedürftigkeit hinauszuzögern.

In neueren Therapieansätzen wird versucht, die Transmittersubstitution auf andere Transmittersysteme als das cholinerge auszudehnen (Mohr, Mendis et al. 1994; Dringenberg, Diavolitsis et al. 2000), in die Bildung von Amyloid einzugreifen, antiinflammatorisch zu therapieren, den oxidativen Stress zu reduzieren, oder mit Hilfe von Wachstumsfaktoren den Nervenzellverlust aufzuhalten (Gottfries 1994; Nordberg 1996). Um eine gestörte intrazelluläre Kalzium-Homöostase positiv zu beeinflussen, wurden Therapieversuche mit Kalzium-Antagonisten durchgeführt. Der Kalziumkanalblocker Nimodipin zeigte in

Untersuchungen bei Menschen und Kaninchen Verbesserung von Gedächtnis- und Lernleistungen (Deyo, Straube et al. 1989). In einer randomisierten, doppelblinden, placebo-kontrollierten Multicenterstudie mit 227 Alzheimer-Patienten erzielten die Patienten, die 90mg Nimodipin am Tag erhalten haben, signifikant bessere Ergebnisse in einem Wortlisterinnerungs-Test im Vergleich zur Placebogruppe (Tollefson 1990).

1.2. Allgemeine pathophysiologische Aspekte

1.2.1. PATHOLOGIE DES M. ALZHEIMER

Die von Alois Alzheimer beschriebenen morphologischen Veränderungen, Gehirnatrophie, Nervenzellschwund, Neurofibrillenbündel und senile Plaques, finden sich in unterschiedlichem Ausmaß in allem Gehirnen von Patienten mit AD. Sie definieren die endgültige histopathologische Diagnose. Ein Neurofibrillenbündel ist ein helicales Doppelfilament, das als unlösliche, agyrophile, intrazelluläre Ablagerung imponiert (Wisniewski, Narang et al. 1976). Die agyrophilen Fibrillen enthalten hyperphosphorylierte Neurofilamentproteine, mikrotubuli-assoziierte Proteine (Tau-Protein, MAP-Protein) und das Stressprotein Ubiquitin (Joachim, Morris et al. 1987; Lennox, Lowe et al. 1988). Sie sind Ausdruck einer Zytoskelettstörung (Wisniewski, Iqbal et al. 1989). Die Fibrillen lagern sich in den Perikarien und Dendriten von Nervenzellen ab und kommen isoliert oder in Kombination mit den senilen Plaques vor (Kidd, Allsop et al. 1985). Senile Plaques bestehen aus einer zentralen Ablagerung β -Amyloids (Amyloid-Core) und einer Corona aus dystrophen Neuriten, aktivierter Mikroglia und Astrozyten (Arai, Lee et al. 1990). Die Plaques enthalten zusätzlich Akut-Phasen-Proteine und Apolipoprotein E (Apo E).

1.2.2. NEUROCHEMISCHE VERÄNDERUNGEN BEI M. ALZHEIMER

Neben den pathomorphologischen Befunden, ist für die Neurochemie vor allem die Degeneration der ascendierenden Projektionsbahnen von Bedeutung: die Degeneration des cholinergen Systems aus dem Nucleus

basalis Meynert (Candy, Perry et al. 1983), des noradrenergen Systems aus dem Locus coeruleus (Bondareff, Mountjoy et al. 1982) und des serotonergen Systems aus den Nuclei raphe (Curcio and Kemper 1984). Dadurch kommt es zu einer Abnahme vieler Neurotransmitter, insbesondere von ACh (Davies 1978), Noradrenalin (Perry, Tomlinson et al. 1981) und Serotonin (Arai, Kosaka et al. 1984), aber auch von Dopamin (Storga, Vrecko et al. 1996). Die Hypothese des cholinergen Defizits ist Ergebnis der älteren Untersuchungen. Mitte der 70er Jahre wurde in mehreren unabhängigen Studien ein Aktivitätsverlust der Cholin-Acetyltransferase in Hirnarealen von Alzheimer-Patienten beobachtet (Davies 1978). Später wurde der Zusammenhang zwischen den Zellverlusten im Nucleus basalis Meynert und einem Mangel an Acetylcholin aufgedeckt. Gleichzeitig zeigten klinische Untersuchungen, dass eine Blockierung der cholinergen Transmission Gedächtnisstörungen bei gesunden jüngeren und älteren Probanden verursacht (Kopelman 1986). So korrelieren Veränderungen im cholinergen System bei AD auch am besten mit den kognitiven Funktionen (Bierer, Haroutunian et al. 1995). Die anderen Neurotransmittersysteme, deren Veränderungen bei AD beschrieben werden, korrelieren eher mit den nicht-kognitiven Symptomen, wie Störungen der Affektivität (v.a. Depressionen), Angststörungen und psychomotorischen Störungen. Besonders das serotonerge System spielt hier eine wichtige Rolle (Meltzer, Smith et al. 1998).

Die ascendierenden Systeme sind allerdings nicht so einheitlich betroffen, dass die Alzheimer-Erkrankung zu den Systematrophien gehören würde, zu denen zum Beispiel auch der Morbus Parkinson gezählt wird. Trotzdem wird sowohl für die cholinerge als auch für die serotonerge Dysfunktion ein selektiver Prozess angenommen, weil zum einen der Neuronenverlust in den ascendierenden cholinergen und serotonergen Systemen über die allgemeine neuronale Atrophie hinausgeht und zum anderen die Neurotransmitter Noradrenalin und Glutamat zu einem geringeren Ausmaß betroffen sind (Nordberg 1992; Meltzer, Smith et al. 1998).

Auch die geringen Erfolge in der Substitutionstherapie sprechen gegen eine solch vereinfachte Sichtweise eines isolierten

Acetylcholinmangels. Neben der Bedeutung von Transmittersystemen geben neuere Untersuchungen zusätzlich Hinweise auf eine gestörte Signaltransduktion. Von Bedeutung ist hier zum Beispiel die Rezeptor-G-Protein-Kopplung (Weinstein, Magnuson et al. 1996; Jope, Song et al. 1997) und die Phosphatidylinositol-Hydrolyse (Haug 1996) sowie die intrazelluläre Kalzium-Homöostase, das heißt die Regulation und Aufrechterhaltung einer gleichmäßigen intrazellulären Kalziumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) (Khachaturian 1989).

2. Die Hypothesen dieser Dissertation

2.1. Eine serotonerge Hypothese und der 5-HT_{2a}-Rezeptor

2.1.1. FUNKTIONEN DES SEROTONERGEN SYSTEMS

Die Zellkörper der serotonergen Neurone des Gehirns befinden sich mittelliniennah im dorsalen Hirnstamm. Obwohl die absolute Zellzahl gering ist (mehrere 1000 Zellkörper), werden ausgehend von diesen Zellkörpern große Teile des Gehirns und des Rückenmarks innerviert (Azmitia and Whitaker-Azmitia 1991). Die Funktion des serotonergen Systems ist noch wenig geklärt, aber zu den Hauptfunktionen scheinen die Regulation der Affektivität, Aufmerksamkeit und des Antriebs, die Schlafregulation und die Modulation motorischer Funktionen zu gehören (Hoyer, Clarke et al. 1994).

Serotonin moduliert Lern- und Gedächtnisleistungen

Dem serotonergen System wird unter anderem auch im Bereich Lernen und Gedächtnis eine wichtige Rolle eingeräumt. Es konnte aber sowohl eine Verbesserung als auch eine Verschlechterung von Gedächtnisfunktionen durch serotonerge Aktivität festgestellt werden und die Mechanismen sind bis heute nahezu unbekannt.

Die vorherrschende Hypothese geht von einer Beeinflussung kognitiver Fähigkeiten durch eine Modulation cholinergischer Transmission durch das serotonerge System aus (Wong, Reynolds et al. 1996; Heider, Schliebs et al. 1997). Mehrere Untersuchungen weisen Serotoninrezeptoren auf cholinergen Nervenendigungen nach und zeigen, dass Serotonin (5-HT) die Acetylcholin (ACh) - Freisetzung aus synaptischen Endigungen modulieren kann. Serotonin kann abhängig vom 5-HT-Rezeptor antagonistisch aber auch agonistisch auf das cholinerge System wirken (Feuerstein, Gleichauf et al. 1996; Muramatsu, Tomaki-Ohashi et al. 1988).

Untersuchungen zur direkten Wirkung des serotonergen Systems auf die Lernfähigkeit und auf Gedächtnisfunktionen zeigen uneinheitliche Ergebnisse. Zum Beispiel können selektive Deafferenzierungen serotonerger Axone das Lernen und das Gedächtnis bei Ratten verbessern (Altman, Normile et al. 1990), während bei bestehendem cholinergen

Defizit durch Unterbrechung der serotonergen Transmission das Lernen noch verschlechtert, bzw. bei kombiniertem cholinergen und serotonergen Defizit durch Transplantation serotonerger Neurone das Lernen verbessert werden kann (Nilsson, Strecker et al. 1988; Richter-Levin and Segal 1989; Richter-Levin and Segal 1989). Die Unterschiede in den Ergebnissen sind vermutlich zum einen durch spezies-spezifische Unterschiede erklärbar und andererseits in der undifferenzierten Untersuchung des serotonergen Systems begründet. Vermutlich ist die Wirkung des serotonergen Systems abhängig vom untersuchten 5-HT-Rezeptorsubtyp.

Man unterscheidet mittlerweile eine große Anzahl von Rezeptorsubtypen: 7 Hauptgruppen mit mehreren Untergruppen. Die Unterteilung erfolgt nach dem Mechanismus der Signaltransduktion, nach der molekularen Struktur und pharmakologischen Eigenschaften.

Wegen der Relevanz in dieser Arbeit wird nun der 5-HT_{2a}-Rezeptor genauer vorgestellt.

Funktionen des 5-HT_{2a}-Rezeptors

Der 5-HT_{2a} Rezeptor ist sehr weit verbreitet sowohl in peripheren Geweben als auch im zentralen Nervensystem (ZNS). Peripher ermöglicht er vor allem Kontraktionen der vaskulären und nicht-vaskulären glatten Muskulatur. Außerdem führt seine Aktivierung zur Plättchenaggregation und gesteigerten Kapillarpermeabilität (Hoyer, Clarke et al. 1994). Sowohl peripher als auch im ZNS weisen Untersuchungen darauf hin, dass durch eine Stimulierung des 5-HT_{2a}-Rezeptors die Ausschüttung einer Reihe anderer Neurotransmitter und Hormone moduliert werden kann. Dazu gehört die Ausschüttung von Acetylcholin (Muramatsu, Tomaki-Ohashi et al. 1988), Adrenalin (Feniuk, Hare et al. 1998), Dopamin (Muramatsu, Tomaki-Ohashi et al. 1988), exzitatorischen Aminosäuren wie Glutamat (Maura, Roccatagliata et al. 1988), Vasopressin, Cortison, Luteinisierungshormon und Prolactin (Hoyer, Clarke et al. 1994).

Im ZNS ist der Rezeptor vor allem im präfrontalen Cortex, weniger im Hippocampus und den Basalganglien zu finden. Im Cortex von Ratten befindet sich der 5-HT_{2a}-Rezeptor besonders postsynaptisch auf nicht serotonergen Neuronen (Butler, Pranzatelli et al. 1990). Dort führt er vor allem in der kortikalen Lamina V über Glutamatneurone zu exzitatorischen

postsynaptischen Potentialen (EPSP's) (Aghajanian and Marek 1999).) Einige Ergebnisse lassen auf eine wichtige Rolle in der Regulation der extrapyramidalen Motorik schließen. So soll der Antagonismus an 5-HT_{2a}-Rezeptoren bei atypischen Neuroleptika eventuell durch eine Erhöhung der Dopaminausschüttung im Striatum die Wahrscheinlichkeit für extrapyramidale Nebenwirkungen reduzieren (Moore, Tye et al. 1992).

Das 5-HT_{2a}-Rezeptorgen befindet sich auf Chromosom 13q14 -q21. Das humane Gen, das der Ratte, der Maus und des Hamsters sind kloniert worden. Bei jeder Spezies besteht der Rezeptor aus 471 Aminosäuren. Im Gegensatz zu den 5-HT₁-Rezeptorgen besitzen 5-HT₂-Rezeptorgene Introns und Exons (Martin and Humphrey 1993).

Der 5-HT_{2a}-Rezeptor gehört wie die meisten anderen 5-HT-Rezeptoren zu den 7-Helix-Transmembranrezeptoren, die an ein G-Protein gekoppelt sind. Die Stimulierung des Rezeptors führt zu einer Produktion von Inositoltrisphosphat (IP₃), kann aber auch eine Aktivierung der Phospholipase A₂ mit nachfolgender Freisetzung von Arachidonsäure nach sich ziehen (Berg, Maayani et al. 1998).

2.1.2. VERÄNDERUNGEN DES SEROTONERGEN SYSTEMS BEI DER ALZHEIMER-DEMENZ

Obwohl eine cholinerge Dysfunktion in AD gut dokumentiert ist, haben Therapien, die das cholinerge System allein modulieren, bisher enttäuschende Resultate geliefert. Eine Ursache könnte darin liegen, dass auch andere Transmittersysteme betroffen sind (Bierer, Haroutunian et al. 1995). In postmortalen Studien gibt es eindeutige Hinweise für Veränderungen im serotonergen System.

Die Nuclei raphae im Hirnstamm sind bevorzugte Stellen für die Formation und Ablagerung von neurofibrillären Bündeln und für einen Neuronenverlust (Curcio and Kemper 1984). Ein Verlust an Serotonin und 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA, als Indikator für die metabolische Aktivität) konnte in mehreren Studien sowohl im Hirngewebe als auch im Liquor cerebrospinalis nachgewiesen werden (Reinikainen, Soininen et al. 1990). Eine signifikante Reduktion von 5-HT_{2a}- und 5-HT_{1a}-Rezeptoren und des Serotonintransporters als Marker für die postsynaptische beziehungsweise präsynaptische Zellmembran wurde von einigen

Arbeitsgruppen sowohl hippocampal als auch frontal und temporal nachgewiesen (Cross, Crow et al. 1984; D'Amato, Zweig et al. 1987; Chen, Alder et al. 1996).

Diese pathologischen Veränderungen lassen sich im Cortex und Hippocampus zu einem früheren Zeitpunkt nachweisen als die Veränderungen im Hirnstamm (Mann, Yates et al. 1984). Eine primäre kortikale Degeneration mit sekundärer retrograder Degeneration erscheint aufgrund dieser zeitlichen Abfolge der pathologischen Veränderungen wahrscheinlich. Da die Störung des serotonergen Systems die anderer Neurotransmittersysteme wie des GABA-ergen oder adrenergen aufsteigenden Systems im Ausmaß übertrifft, ist die serotonerge Dysfunktion in AD aber vermutlich nicht allein die Folge einer generalisierten kortikalen Degeneration (Cross 1990; Nordberg 1992).

Prä- und postsynaptische Veränderungen konnten mit Verhaltensauffälligkeiten in AD assoziiert werden. Bei Alzheimer-Patienten, die zusätzlich an depressiven Störungen litten, wurde ein deutlicheres Ausmaß an serotonerger Dysfunktion beschrieben (Chen, Alder et al. 1996). Ob die reduzierte Zellanzahl im serotonergen System und die Defizite in der Neurotransmission mit der häufigen Koexistenz von Depression und Demenz assoziiert sind, bleibt allerdings ungeklärt. Auch die anderen nicht-kognitiven Symptome sind mit einem Verlust von serotonergen Rezeptoren verbunden. Zum Beispiel steht Aggressivität mit einem erhöhten Verlust von 5-HT und 5-HT₂-Rezeptoren in Verbindung (Palmer 1996). Psychotische Symptome wurden assoziiert mit einer signifikanten Reduktion von 5-HT und einer erhöhten Dichte an senilen Plaques im Prosubiculum (Zubenko, Moosy et al. 1991). Defizite im serotonergen System wurden demnach vor allem in AD-Patienten beobachtet, die depressive oder aggressive Symptome zeigten.

Zur Therapie von kognitiven Störungen und Verhaltensauffälligkeiten wurden Medikamente vorgeschlagen, die in das serotonerge System eingreifen (Borson and Raskind 1997). Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer beeinflussen vor allem den allgemeinen Umgang mit der Krankheit günstig und können Aggressivität und Irritabilität reduzieren (Bergman, Brane et al. 1983). Eine andere Studie konnte selektiv

bei AD-Patienten eine signifikante Verbesserung der Emotionsmodulationsfähigkeit und die Reduzierung von Angststörungen, depressiven Störungen und motorischer Unruhe induzieren, während kein Effekt bei Patienten mit Multiinfarktdemenz festzustellen war (Nyth and Gottfries 1990). Andererseits berichtet die Arbeitsgruppe um Lawlor et al. von einer Verstärkung von depressiven Störungen bei Applikation des direkten Serotoninagonisten meta-Chlorophenylpiperazin (Lawlor, Sunderland et al. 1991).

Zusammenfassend gibt es somit Hinweise für Störungen im serotonergen System, auch wenn die Pathophysiologie und die klinische Relevanz noch unzureichend aufgedeckt ist. Die Interaktion von 5-HT mit ACh scheint nicht unwichtig zu sein für die Ausbildung von Gedächtnisstörungen. Postmortale Bindungsstudien und Medikamentenstudien weisen auf eine wichtige Rolle des serotonergen Systems bei der Entstehung von Verhaltensstörungen bei AD hin. Die kortikal betonte Neuropathologie in AD spricht für die sekundäre retrograde Degeneration von aszendierenden serotonergen Hirnstammneuronen aus dem Nucleus raphe dorsalis. Eine wichtige Frage lautet demnach: warum gehen kortikale Nervenzellen unter, die Projektionsziele vor allem des acetylcholinergen und serotonergen Transmittersystems sind?

2.1.3. MÖGLICHE URSACHEN FÜR EINEN KORTIKALEN NERVENZELLUNTERGANG UND FUNKTION DES 5-HT_{2A}-REZEPTORS BEI AD

β-Amyloid-Processing

Ein postsynaptischer Vermittler des kortikalen serotonergen Signals ist der 5-HT_{2a}-Rezeptor. Der 5-HT_{2a}-Rezeptor spielt neben anderen Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Regulation des β-Amyloid-Precursor-Protein (βAPP)-Processings (Nitsch, Deng et al. 1996). Ein Spaltprodukt des βAPP ist das Hauptprodukt der senilen Plaques, das β-Amyloid (Aβ). Die Rolle dieses 38-43 Aminosäuren (AS) langen Peptids ist in der Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung noch wenig geklärt, aber eine Reihe von Untersuchungen deuten daraufhin, dass Aβ und APP kausal in der Pathogenese involviert sind. Zum Beispiel sind Punktmutationen im βAPP-Gen auf Chromosom 21 mit einer familiären Form der AD assoziiert und die meisten Patienten mit Down-Syndrom (Trisomie 21) entwickeln in

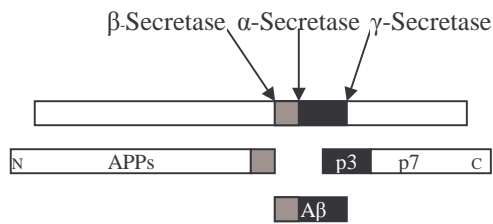


Abb. 1 Processing des β APP durch die verschiedenen Secretasen

Tomaselli et al. 1993; Pike, Burdick et al. 1993; Fu, Luo et al. 1998).

β APP zeigt die strukturellen Eigenschaften eines Transmembranpeptids, bei dem die A β -Sequenz teilweise in die Membran eingebettet ist. β APP unterliegt posttranslationalen Modifikationen durch bisher unspezifizierte Proteasen, die α -, β - und γ -Secretase genannt werden (Abb.1). Die α -Secretase spaltet das β APP in ein kleineres Fragment und ein größeres N-terminales Produkt, das APPs heißt, sezerniert wird und neuroprotektive Wirkungen hat. Neurotoxisch ist das Produkt, das nach β - und γ -Secretasen-Einwirkung übrigbleibt, das 38-42 AS lange β -Amyloid (A β). Besonders eine anhaltende Ca²⁺-Erhöhung durch einen Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellulärraum oder über defekte Ryanodin-Rezeptoren aus dem ER führt zu einer verstärkten Bildung von A β , während eine kurzfristige Erhöhung über den IP3-abhängigen Weg die Bildung des neuroprotektiven sAPP-Fragments fördert (Querfurth and Selkoe 1994). So können Zelloberflächenrezeptoren, wie muscarinische ACh-Rezeptoren, 5-HT2a- und 5-HT2c-Rezeptoren, Glutamaterezeptoren, Bradykinin- und Vasopressin-Rezeptoren über G-Protein-Kopplung und Wachstumsfaktoren, Interleukin-1 und Thrombin über einen Tyrosinkinase-Weg die Sekretion von APPs erhöhen (Nitsch, Wurtman et al. 1996) und gleichzeitig die Formation von A β verhindern (Hung, Haass et al. 1993). Der alternative Signalweg mit Bildung von PLA₂ soll für die 5-HT2a-Rezeptor-vermittelte Erhöhung der APPs-Sekretion von entscheidender Bedeutung sein (Nitsch, Deng et al. 1996).

Störung der serotonergen Transmission

Zusätzlich zum kortikalen Verlust von 5-HT2a-Rezeptoren im Verlauf der AD könnte eine gestörte serotonerge Transmission zu einer

der 5. Lebensdekade AD. Die Mutationen sind assoziiert mit einer erhöhten A β -Produktion. Experimentell konnte eine direkte neurotoxische Wirkung des A β nachgewiesen werden (Yanker, Dawes et al. 1989; Busciglio, Lorenzo et al. 1992; Mattson,

Verminderung der Funktion des 5-HT_{2a}-Rezeptors führen und den Processierungsweg hemmen, der zur Bildung von APPs führt. Mehrere Arbeitsgruppen stellten eine Störung des Phosphatidylinositol-Hydrolyse-Wegs bei AD fest. Diese Störung in Form einer Entkopplung der jeweils nachgeschalteten Einheiten in der Signalkaskade zeigte sich auf verschiedenen Ebenen unter anderem in einer Rezeptor/G-Protein-Entkopplung, einer Störung der Rezeptor/G-Protein-Aktivierung von PLC und der Funktion des IP₃ (Cowburn, Fowler et al. 1996).

Zum Beispiel konnten einige Arbeitsgruppen Störungen der Aktivierung der PLC durch den Rezeptor/G-Protein-Komplex in postmortal gewonnenem Hirngewebe von AD nach Stimulierung mit verschiedenen Neurotransmittern und G-Protein-Aktivatoren feststellen (Greenwood, Powers et al. 1995; Jope, Song et al. 1997). Diese Veränderungen zeigten sich sowohl nach Stimulation mit Carbachol, Glutamat, Histamin und Serotonin als auch nach direkter G-Protein-Aktivierung mit GTP γ S oder Aluminiumfluorid (Crews, Kurian et al. 1994; Greenwood, Powers et al. 1995; Jope 1996; Weinstein, Magnuson et al. 1996). Damit wird eine generell gestörte Kopplung des intermediären Gq-Proteins an die Phospholipase C wahrscheinlicher als ein spezifischer Defekt in der Rezeptor/G-Protein-Kopplung. Für die serotonerge Transmission über 5-HT_{2a}-Rezeptoren wurde diese Störung noch nicht beschrieben, aber bei vergleichbarer Transmission sowohl des M₁-Rezeptors als auch des 5-HT_{2a}-Rezeptors über ein Gq-Protein, scheint diese Veränderung für die Funktion des 5-HT_{2a}-Rezeptors in Patienten mit AD nicht unwichtig sein.

Zudem wurde eine Verminderung von IP₃-Rezeptoren in postmortal gewonnenen Hippocampus, Cerebellum und Cortex von AD-Patienten festgestellt (Garlind 1995). Eine andere Arbeitsgruppe konnte dies bestätigen und zeigte eine Korrelation dieser Veränderung im Gyrus temporalis superior mit dem Ausmaß der histomorphologischen Pathologien (Haug 1996).

5-HT_{2a}-Rezeptor Mutationen

Zwei relevante Polymorphismen liegen innerhalb des 5-HT_{2a}-Rezeptor-Gens auf Chromosom 13. Ein stiller Polymorphismus wurde an Position 102 identifiziert, der in einem Basenaustausch von Thymin zu

Cytosin besteht. Obwohl er nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des Rezeptorproteins führt, ist dieser Polymorphismus mit visuellen und auditorischen Halluzinationen in Patienten mit M. Alzheimer assoziiert und zeigt hier sogar eine deutlichere Assoziation als bei der Schizophrenie (Holmes, Arranz et al. 1998). Als Ursache für diesen positiven Befund wird ein Bindungsungleichgewicht mit einem bis heute unbekanntem funktionellen Polymorphismus vermutet, der in einer regulatorischen Region des Gens liegt (Arranz, Collier et al. 1996).

In der C-terminalen Region wurde ein seltener Polymorphismus gefunden, der mit einem Histidin zu Tyrosin-Austausch an Position 452 einhergeht und mit einer Allelfrequenz des Tyrosin-Allels von 9,3% auftritt (Erdmann, Shimron-Abarbanell et al. 1996). Die Untersuchungen von Ozaki et al. zeigen, dass hier eine Rezeptor-regulierende Einheit betroffen ist und dass somit die primäre Aminosäuresequenz wichtig für die Funktion des Rezeptors ist (Ozaki, Manji et al. 1997). Weil die Punktmutation sich innerhalb der intrazellulären Domäne befindet, ist es nicht zu erwarten, dass der Aminosäureaustausch eine Änderung der Affinität des Rezeptors zu seinen Agonisten zur Folge hat, wie es zum Beispiel für die Ala242Ser Speziesvariation beschrieben ist (Johnson, Loncharich et al. 1993; Almaula, Ebersole et al. 1996). Man vermutete, dass sich die Mutation in einer veränderten G-Protein-Interaktion und Desensitivierungsempfindlichkeit auswirken würde und untersuchte die funktionelle Veränderung der Ca^{2+} -Mobilisierung aus dem endoplasmatischen Reticulum nach 5-HT-Stimulierung. Zellen mit einem ^{452}Tyr -Allel zeigen sowohl eine signifikant längere Latenzzeit, kleinere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Amplituden und eine längere Halbwertszeit nach Stimulation mit 5-HT als die His/His Homozygoten (Ozaki, Manji et al. 1997). Somit scheint sich die ^{452}Tyr Form des Rezeptors in einem dauerhaft desensitivierten Zustand zu befinden, in dem auch die Reaktion auf homologe oder heterologe Desensitivierung und auf eine Steigerung der Serotoninkonzentration vermindert ist.

Diese Mutation im 5-HT_{2a}-Rezeptor könnte bei einem Teil der Patienten eine weitere Ursache darstellen für eine serotonerge Transmissionsstörung, die unter anderem ein gestörtes Processing des βAPP nach sich ziehen könnte. Eine Assoziation mit dem Verlauf oder der

Entwicklung einer Alzheimer-Erkrankung wurde bei diesem Polymorphismus noch nicht untersucht.

Weitere Ursachen für einen kortikalen Nervenzelluntergang werden in der Kalzium-Hypothese der neurodegenerativen Erkrankungen zusammengefasst.

2.2. Die „Kalzium-Hypothese“

2.2.1. PHYSIOLOGIE DER INTRAZELLULÄREN KALZIUM-HOMÖOSTASE

Kalzium (Ca^{2+}) ist der wichtigste second messenger der Zelle. Durch dieses Kation werden entscheidende zelluläre Prozesse reguliert. Dazu gehören Muskelkontraktion, Sekretion, neuronale Erregbarkeit, Zellproliferation und Zelltod (Kennedy 1989; Berridge 1995). Für die zuverlässige Ausführung dieser Aufgaben ist die Regulation der intrazellulären freien Kalziumionenkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) entscheidend. Die freie Ruhekonzentration ist sehr niedrig und liegt bei 10-100nmol/l. Nach Stimulation der Zelle steigt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf 500-1000nmol/l an, sodass Sensoren, vor allem Ca^{2+} -bindende Proteine (z.B. Calmodulin oder Troponin C) aktiviert und über weitere Aktivierungs- und Phosphorylierungskaskaden die Zellfunktionen gesteuert werden (Berridge 1993; Clapham 1995).

Die konstante Ruhekonzentration entsteht durch ein Gleichgewicht zwischen Ca^{2+} -Einstrom und -Freisetzung in das Zytosol und Ca^{2+} -Rücktransport in den Extrazellulärraum oder in die intrazellulären Speicherorganellen. Für den Einstrom aus dem extrazellulären Raum sind membranäre Kalzium-Kanäle bedeutsam, die entweder auf Spannungsänderungen (voltage operated calcium channel, VOCC), auf eine Änderung der Kalziumionenkonzentration im endoplasmatischen Reticulum (ER) (store operated calcium channel, SOCC) oder auf die Bindung eines spezifischen Agonisten (receptor operated calcium channel, ROCC) reagieren. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann aber auch durch eine Öffnung intrazellulärer Kanäle, die die intrazellulären Kalzium-Speicher regulieren, erhöht werden. Hierzu gehören der Inositoltrisphosphat (IP3)-Rezeptor und der Ryanodin-Rezeptor (RyR) (Simpson, Challiss et al. 1995). Ca^{2+} -Pumpen sorgen für

eine Reduktion der freien Kalziumionenkonzentration nach der Stimulation. Sie befördern Ca^{2+} entweder über $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und Ca^{2+} -ATPasen der Plasmamembran (plasma membrane calcium ATPase, PMCA) aus der Zelle heraus oder über Ca^{2+} -ATPasen des ER (sarco/endoplasmatic reticulum calcium ATPase, SERCA) in die intrazellulären Speicher (Carafoli 1994).

Eine wichtige Funktion für die Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist der Phosphatidylinositol-Hydrolyse-Weg (Simpson, Challiss et al. 1995). Bei diesem Signaltransduktionsweg führt die Phospholipase C katalysierte Hydrolyse von Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PIP_2) zur Bildung der intrazellulären 2nd messenger Diacylglycerol (DAG) und IP3. DAG aktiviert Proteinkinase C, während IP3 durch die Bindung an spezifische IP3-Rezeptoren der Speicherorganellen, vor allem an die des glatten endoplasmatischen Reticulums, eine Freisetzung von Ca^{2+} bewirkt (Berridge and Irvine 1984). Bei dieser Kaskade sind vor allem 3 Kalziumströme von Bedeutung, die zu einem in nicht erregbaren Zellen zweiphasischen Kalzium-Signal beitragen (Braiman, Goldstein et al. 2000) (Abb.2). Die IP3-abhängige Kalziumionenfreisetzung (IP3-induced calcium release, IICR) und die durch den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg verstärkte Kalziumionenfreisetzung (calcium induced calcium release, CICR) führen zu einem schnellen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach der Stimulation mit einem Agonisten. Der „kapazitative“ Kalziumioneneinstrom über die Zellmembran (capacitative calcium entry, CCE), der zum Auffüllen der intrazellulären Speicher beiträgt, zeigt sich vor allem in einem nachfolgenden anhaltenden Ca^{2+} -Anstieg (Berridge 1993; Clapham 1995 (Putney, Broad et al. 2001).

Die Bindung von IP3 an den IP3-Rezeptor, die zu der Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Reticulum führt, wird durch eine komplexe und wenig verstandene Interaktion zwischen dem Rezeptor, IP3 und Ca^{2+} reguliert (Jean and Klee 1986). Die IP3-abhängige Ca^{2+} Freisetzung ist schnell und (Muallem, Pandol et al. 1989) baut sich durch die Summation von einzelnen Kalziumströmen auf, die jeweils durch die Bindung eines IP3-Moleküls an den endoplasmatischen IP3-Rezeptor entstehen (Meyer and Stryer 1990). Die IP3-abhängige Ca^{2+} Freisetzung

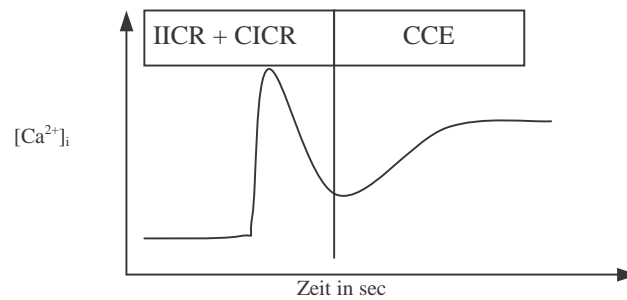


Abb. 2 schematischer Verlauf eines IP₃-abhängigen 2-phasigen Kalzium-Signals. Der steile initiale Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) wird im wesentlichen durch die IP₃-abhängige Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Reticulum bestimmt (IP₃ induced Kalzium release, IICR) und der durch Ca^{2+} selbst ausgelösten Kalziumionenfreesetzung (Kalzium induced Kalzium release, CICR). Die zweite Phase, der nachfolgende langsamere Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration wird vor allem durch den kapazitiven Kalziumioneneinstrom (CCE) aus dem Extrazellulärraum erzeugt.

erhält dadurch einen scheinbar kontinuierlichen Charakter.

Die Generierung des Kalzium-Signals wird unterstützt durch die Ca^{2+} induzierte Kalziumionen-Freisetzung (CICR). Dieses Phänomen wurde zunächst nur in erregbaren Zellen beschrieben, in denen der Ryanodin-Rezeptor (RyR) einen CICR-Kanal darstellt, der nach einer Depolarisation und dem spannungsabhängigen Einstrom von Ca^{2+} durch Ca^{2+} selbst aktiviert wird (Marrion and Adams 1992). In nicht-erregbaren Zellen wird vermutet, dass der IP₃-Rezeptor die Funktion des CICR-Kanals ausüben kann. Bei niedrigen $[Ca^{2+}]_i$ zu Beginn des Ca^{2+} -Anstiegs ist die Fähigkeit von IP₃, Ca^{2+} freizusetzen erhöht (Finch, Turner et al. 1991). Zusätzlich wurden auch in nicht-erregbaren Zellen, unter anderem in Lymphozyten, Ryanodin-Rezeptoren gefunden, die einen IP₃ insensitiven Pool bilden und zu einer Ca^{2+} -induzierten Kalziumionenfreesetzung beitragen könnten (Hakamata, Nishimura et al. 1994; Sei, Gallagher et al. 1999). Dieser positive Rückkopplungsmechanismus trägt zum schnellen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ bei.

Die Kalzium-Speicher werden nach einem Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum durch die Ca^{2+} -ATPasen des endoplasmatischen Reticulums wieder aufgefüllt. Der Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum wird direkt von den Ca^{2+} -Speichern moduliert und kapazitiver Kalziumioneneinstrom (CCE) genannt (Putney, Broad et al.

2001). Kapazitiv bedeutet in diesem Zusammenhang, dass der Füllungszustand der Speicher den Influx an Ca^{2+} steuert (Chow and Jondal 1990). Verschiedene Regulationsmechanismen wurden vorgeschlagen, unter denen heute ein bislang noch nicht definierter Kalzium Influx Faktor (CIF) (Csutora, Su et al. 1999) oder eine direkte mechanische Interaktion des ERs mit der Zellmembran favorisiert werden (Putney, Broad et al. 2001). Der Mechanismus des kapazitiven Kalziumioneneinstroms und der dadurch ausgelösten transienten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist bis heute nicht näher charakterisiert. Man weiß aber, dass der kapazitiven Kalziumioneneinstrom in verschiedenen Zelltypen eine wichtige Rolle spielt und dass er zu einer transienten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beiträgt, wie sie nach Stimulation von Zellen mit IP₃-induzierenden Agonisten beobachtet wird (Putney, Broad et al. 2001). Der Ca^{2+} -Einstrom wurde deskriptiv I_{crac} (Strom (I) calcium release activated) genannt (Hoth and Penner 1992). Zweifach et al. konnte in einer Arbeit zeigen, dass für den Ca^{2+} -Einstrom nicht nur die luminalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im ER wichtig ist, sondern dass er zudem spannungsabhängig reguliert wird (Zweifach and Lewis 1996) auch in nicht-erregbaren Zellen wie den Lymphozyten (Densmore, Haverstick et al. 1996).

2.2.2. KALZIUM-HYPOTHESE DER NEURODEGENERATIVEN ERKRANKUNGEN

Die Plastizität der Neuroarchitektur wird reguliert durch Mechanismen, die ein funktionelles Gleichgewicht aufrechterhalten zwischen Wachstum, Regeneration und Degeneration. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ spielt die zentrale Rolle in der Modulation dieses Gleichgewichts in die eine oder andere Richtung. Zelluläre Mechanismen, die die Aufrechterhaltung einer gleichmäßigen intrazellulären Kalziumionenkonzentration regulieren (Homöostase der $[\text{Ca}^{2+}]_i$), sollen so die zentrale Rolle spielen bei der Alterung des Gehirns und der Neuropathologie der AD. Die neuronale Dysfunktion, dendritische Degeneration und der Verlust an Synapsen während der AD stellt eine Dysregulation von normalen Prozessen dar, die Voraussetzung sind für die Entwicklung und Funktion eines „normalen“ Gehirns (Khachaturian 1989).

Eine kurzfristigen Ca^{2+} -Überladung des Zytosols spielt vor allem bei akuten Schäden während eines Hirninfarkts, Hirntraumas oder im

epileptischen Anfall eine Rolle. Die neuronalen Populationen, die besonders vulnerabel sind, besitzen eine hohe Dichte an Glutamaterezeptoren. Eine Überstimulierung dieser Rezeptoren führt über eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ zu einer Dendritenschrumpfung, Veränderungen im Antigen-Angebot mit vermehrter Bildung von Antikörpern gegen Tau- und Ubiquitin-Proteine, zu Änderungen des Zytoskeletts mit einer Akkumulation von Filamenten und zu biochemischen Auffälligkeiten, die eine veränderte elektrophoretische Mobilität des Tau-Proteins und eine Calpain-abhängige Spectrin-Proteolyse beinhalten (Rothmann and Olney 1986). Diese Veränderungen findet man auch in ähnlicher Weise in den neurofibrillären Bündeln von Patienten mit AD (MacDermott and Dale 1987). Sie zeigen die Ähnlichkeit zwischen den Erkrankungen Hirninfarkt, Hirntrauma, Epilepsie und AD in den pathologischen Auswirkungen.

Eine dauerhafte diskrete Erhöhung der freien intrazellulären Kalziumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) soll nach der klassischen Kalzium-Hypothese der neurodegenerativen Erkrankungen die gleichen Auswirkungen auf Apoptose, Regeneration und Plastizität haben wie die kurzfristige starke Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ bei akuten Ereignissen (Khachaturian 1989).

Zu den möglichen Folgen einer gestörten Kalzium-Homöostase nach der Kalzium-Hypothese gehört eine gestörte Mitochondrien-Funktion mit einer Aktivierung von Enzym-Kaskaden, eine Akkumulation von Ca^{2+} und eine Störung der Redoxsysteme mit der Bildung von freien Radikalen (Mattson 1994). Zusätzlich hat die Regulation der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER direkte Bedeutung beim Apoptose-Vorgang. Endoplasmatische Ca^{2+} -ATPase-Inhibitoren wie Thapsigargin induzieren Apoptose in vielen Zelltypen und zu Beginn der Apoptose kann eine Erhöhung der Typ3 IP3-Rezeptoren in Lymphozyten nachgewiesen werden (Guo, Furukawa et al. 1996; Guo, Sopher et al. 1997). Eine gestörte Kalzium-Homöostase könnte außerdem eine spezifische Erhöhung des A β -Peptides und Phosphorylierungen des Tau-Proteins durch eine Aktivitätsänderung Kalzium-abhängiger Proteasen und Proteinkinasen verursachen (Querfurth and Selkoe 1994). Somit wären die pathologischen Hauptmerkmale der AD (Apoptose, Plaques und Fibrillen mit hyperphosphorylierten

Neurofilamentproteinen) als Folge einer alterierten Kalzium-Homöostase vorstellbar.

2.2.3. VERÄNDERUNGEN DER KALZIUM-HOMÖOSTASE BEI DER ALZHEIMER-DEMENZ

Die ersten Untersuchungen zur Kalzium-Regulation an zentralen oder peripheren Zellen konnten die Hypothese einer allgemeinen Störung der Kalzium-Homöostase nicht bestätigen. Während zu der Ruhekonzentration (basale $[Ca^{2+}]_i$) unterschiedliche Ergebnisse veröffentlicht wurden, konnten im Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach Mitogen-Stimulation keine Unterschiede zur Kontrollgruppe entdeckt werden (Eckert, Förstl et al. 1993; Bondy, Klages et al. 1994; Hartmann, Eckert et al. 1994) (Tab.1). Untersuchungsergebnisse, bei denen in peripheren mononukleären Zellen von Alzheimer-Patienten die $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit PHA erhöht war, konnten durch andere Gruppen bei gleichem Versuchsaufbau nicht reproduziert werden (Adunsky, Diver-Haber et al. 1995). Erst als man kinetische Größen bei der Auswertung berücksichtigte, zeigte sich eine Störung in Form eines verzögerten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ mit einem späteren Erreichen der maximalen $[Ca^{2+}]_i$ (Bondy, Hofmann et al. 1995; Eckert, Förstl et al. 1998).

In diesen Untersuchungen zeigte sich auch eine sehr spezifische Störung der Kalzium-Homöostase, die mit den β -Amyloid-Plaques in Verbindung steht. Durch eine Vorinkubation mit β -Amyloid kann man in Lymphozyten das PHA-induzierte Kalzium-Signal verstärken. In Lymphozyten von AD-Patienten fällt diese Verstärkung signifikant geringer aus (Eckert, Förstl et al. 1993; Bondy, Hofmann et al. 1995). Eine verminderte Wirkung konnte auch für den Kalium-Kanal-Blocker Tetraethylammoniumchlorid (TEA) festgestellt werden. Während die Zugabe von TEA in Kontrollzellen über eine Depolarisation zu einem Kalzium-Signal führt, zeigen Zellen von AD-Patienten einen reduzierten Kalzium-Anstieg nach TEA-Zugabe (Etcheberrigaray, Ito et al. 1993) und auch nach zusätzlicher PHA-Stimulation (Bondy, Hofmann et al. 1996). Diese verminderte Sensitivität deutet auf eine Kalium-Kanal-Dysfunktion oder einen Kalium-Kanal-Mangel in AD hin (Etcheberrigaray, Ito et al. 1993). Interessanterweise kann in Fibroblasten von Kontrollen eine ähnliche

Zelltyp	Stimulans (Dosis µg/ml)	[Ca ²⁺] _i basal	[Ca ²⁺] _i	Zeit bis [Ca ²⁺] _i max	Sensitivität auf	Quelle
PBMC	PHA (100)	▲	▲			(Adunsky, 1991; Adunsky, 1995)
LC	PHA (100)	▲	—			(Hartmann, 1994)
LC	PHA (25) PHA (100)	—	—	▲ ▲		(Bondy, 1994; Bondy, 1995)
LC	PHA (15) Aβ + PHA	—	—	▲	▼	(Eckert, 1993; Bondy, 1995; Eckert, 1997)
LC	TEA+PHA				▼	(Bondy, 1996)
EOAD: T-LC	PHA (25)	—	▲			(Sulger, 1999)
LOAD: LB	αIgM Aβ Aβ + αIgM	▲	▲ ▲		—	(Ibarreta, 1997)

Tab. 1 Übersicht bezüglich der Untersuchungen zur Kalzium-Homöostase an Lymphozyten (LC), Lymphoblasten (LB) und peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC). (▲ erhöht, ▼ erniedrigt, — kein Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe)

Kalium-Kanal-Dysfunktion durch eine Inkubation mit Aβ ausgelöst werden (Etcheberrigaray, Ito et al. 1994).

Somit könnte Aβ durch eine Interaktion mit TEA-sensitiven K⁺-Kanälen zu der reduzierten TEA-Sensitivität in AD beitragen. Der Mechanismus dieser Interaktion ist unbekannt. Die Arbeit von Bhagavan et al. gibt Hinweise darauf, dass ein Aktivitätsverlust einer Phosphokinase (PKCα) ein wichtiger Zwischenschritt sein kann (Bhagavan, Ibarreta et al. 1998). Andere mögliche Auswirkungen von Aβ auf die Kalzium-Homöostase werden im nächsten Abschnitt beschrieben.

Neben der Kalium-Kanal-Dysfunktion findet man weitere Veränderungen auf subzellulärer Ebene bei AD. Zum Beispiel konnte man bei dem Ryanodin-Rezeptor (RyR), der entscheidend zur Ca²⁺-induzierter Kalziumionenfreisetzung beiträgt, stadienabhängig eine Erhöhung (geringe Neurofibrillenpathologie) oder Erniedrigung (stärkere pathologische Befunde) der RyR-Dichte in postmortal gewonnenem Hirngewebe nachweisen (Kelliher, Fastbom et al. 1999).

2.2.4. MÖGLICHE URSACHEN EINER STÖRUNG DER KALZIUM-HOMÖOSTASE

 β -Amyloid

Eine direkte neurotoxische Wirkung des unlöslichen aggregierten β -Amyloids, des Hauptprodukts der amyloiden Plaques wurde mehrfach beobachtet. β -Amyloid führte zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Neurone auf metabolische und exzitotoxische Noxen und könnte zur neuronalen Degeneration bei Alzheimer-Patienten beitragen (Yanker, Dawes et al. 1989; Busciglio, Lorenzo et al. 1992; Mattson, Tomaselli et al. 1993; Pike, Burdick et al. 1993; Fu, Luo et al. 1998). Die Ergebnisse stimmen mit der Pathologie bei AD überein, bei der nur die senilen Plaques, die die kongophile aggregierte A β -Form enthalten, mit der neuronalen Degeneration assoziiert sind. Es gibt Hinweise darauf, dass die Neurotoxizität durch eine Störung der Kalzium-Homöostase hervorgerufen wird (Eckert, Hartmann et al. 1993; Mattson, Barger et al. 1993; Sanderson, Butler et al. 1997).

β -Amyloid kann schon in niedrigen Dosen eine Erhöhung der basalen $[Ca^{2+}]_i$ und eine Verstärkung des Stimulus-induzierten Ca^{2+} -Einstroms bewirken (Mattson, Tomaselli et al. 1993). Diese Erhöhung der Membran-Leitfähigkeit für Ca^{2+} könnte A β durch die Bildung eines selektiven Kationen-Kanals verursachen. Dieses ist in vitro zu beobachten, wenn β -Amyloid in eine Lipiddoppelmembran eingebracht wird. Der entstandene Kationen-Kanal zeigte eine Transportfunktion für Ca^{2+} (Arispe, Pollard et al. 1993; Arispe, Rojas et al. 1993; Pollard, Rojas et al. 1993). Durch eine Ablagerung auf der Zelloberfläche könnte A β aber auch die Funktion von Membranproteinen verändern, die an der Regulation der Kalzium-Homöostase beteiligt sind, wie zum Beispiel der Na^+/Ca^{2+} -Austauscher (Wu, Derrico et al. 1997), ATPasen (Mark, Hensley et al. 1995) und L-VOCC's (Silei, Fabrizi et al. 1999). Sowohl Antioxidantien und Nervenwachstumsfaktoren (Mattson, Tomaselli et al. 1993), als auch Kalzium-Antagonisten (Weiss, Pike et al. 1994) und Kalziumfreies Versuchsmedium (Mattson, Tomaselli et al. 1993) konnten diese Veränderungen in der Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ verhindern.

Preseniline

Ursache für eine Störung der Kalzium-Homöostase bei der familiären Form der Alzheimer Erkrankung können Mutationen auf den Chromosomen 1 und 14 sein, die mit der Hälfte aller familiären Fälle der Alzheimer-Krankheit assoziiert sind. Die zwei von den Mutationen betroffenen Gene wurden Presenilin-1 (PS-1 auf Chromosom 14) und Presenilin-2 (PS-2 auf Chromosom 1) genannt. PS-1 ist vor allem mit den sehr frühen Formen, die zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr beginnen, assoziiert, während die mit PS-2 assoziierte Form bezüglich des Erkrankungsalters von 50-65 Jahren und dem Verlauf eher der sporadischen Form ähnelt. Bis heute sind über 50 Mutationen des PS-1-Gens und 2 Mutationen des PS-2-Gens entdeckt worden, die in fast allen Fällen autosomal dominant vererbt werden und eine sehr hohe Penetranz aufweisen. PS-1 und PS-2 sind auf der Aminosäureebene zu 67% homolog. PS-1 kodiert für ein Protein, das S182 genannt wird, das Genprodukt von PS-2 heißt STM2. S182 und STM2 sind 6- oder 8-Transmembranproteine, deren C-Terminus, N-Terminus und Schleifendomäne sich auf der zytosolischen Seite von Membranen befinden (Mattson, Guo et al. 1998).

Man vermutet physiologische Funktionen in den Bereichen Apoptose und Differenzierung, Protein-Processing, Vesikel- und Proteintransport, Signaltransduktion und $[Ca^{2+}]_i$ - Regulation im ER. Die meisten Hypothesen basieren auf Untersuchungsergebnissen zur Struktur, Lokalisation und posttranslationaler Modifikation der Preseniline (Mattson, Guo et al. 1998). Das Expressions-Profil stützt besonders die Hypothese einer direkten Wirkung auf die Kalzium-Homöostase. Innerhalb der Zelle ist PS-1 vor allem dem endoplasmatischen Reticulum zugeordnet, das als Kalziumionenspeicher eine große Rolle in der Kalzium-Homöostase spielt (Guo, Furukawa et al. 1996). Ob unter physiologischen Bedingungen Presenilin-1 die $[Ca^{2+}]_i$ moduliert, ist fraglich, bisher wurden nur bei mutiertem Presenilin Auswirkungen auf die Kalzium-Homöostase beobachtet.

Alterationen der Kalzium-Homöostase konnten in Fibroblasten (Ito, Oka et al. 1994) und kultivierten Zellen (Guo, Furukawa et al. 1996) von Patienten mit familiärem Alzheimer gezeigt werden, die eine Presenilin-Mutation aufwiesen. Die Arbeitsgruppe um Leissring et al. beobachtete eine

spezifische Erhöhung der IP3-abhängige Kalziumionenfreisetzung und betonte, dass die Potenzierung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation nicht für eine Mutation spezifisch ist, sondern eine generelle Konsequenz vieler Presenilin-Mutationen darstellt (Leissring, Paul et al. 1999). So konnte sie auch in Zellen mit einer der beiden PS-2-Mutationen die gleichen Veränderungen feststellen (Leissring, Parker et al. 1999). Vor allem konnten sie die Hypothese unterstützen, dass eine erhöhte Sensitivität der IP3-induzierten Kalziumionenfreisetzung zu der Alteration in der Kalzium-Homöostase führt. Allerdings ist auch das Kalzium-Signal nach Depolarisation erhöht (Barrow, Empson et al. 2000). Spätere Untersuchungen zeigen, dass zusätzlich eine Störung des kapazitiven Kalziumioneneinstroms besteht (Leissring, Akbari et al. 2000; Yoo, Cheng et al. 2000), der vermutlich durch eine Überladung des ER mit Ca^{2+} zustande kommt (Leissring, Akbari et al. 2000). Eine verkürzte Phase des nachfolgenden Ca^{2+} -Einstroms zeigen auch schon Arbeiten von Guo 1996 (Guo, Furukawa et al. 1996). Es ist möglich, dass Zellen mit Mutationen in den Presenilin-Genen durch diese Störung der Kalzium-Homöostase eine erhöhte Vulnerabilität auf lokale metabolische Störungen zeigen. Dazu gehört die Reaktion auf Hypoxie, Glucosedepprivation (Mattson, Zhu et al. 2000) und exzitatorische Stimuli (Guo, Sebastian et al. 1999) mit einer verstärkten intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung, einer gesteigerten intrazellulären freien Radikalbildung und einer mitochondrialen Dysfunktion in Presenilin-Mutanten.

Zu beachten ist, dass die Hemmung des CCE's eine aktive Funktion zu sein scheint, Mutationen in Presenilin-Genen also „gain-of-function“ Mutationen zu sein scheinen, denn Yoo et al. konnten zeigen, dass eine an Presenilin verarmte Zelle einen gesteigerten kapazitiven Kalziumioneneinstrom aufweist (Yoo, Cheng et al. 2000). Auch andere Untersuchungen geben Hinweise auf die Bedeutsamkeit einer normalen Presenilin-Funktion für die Kalzium-Homöostase. Bouras et al. vermuten eine erhöhte neuronale Vulnerabilität für degenerative Prozesse bei einem Mangel an Presenilin-1. Sie beschrieben in sporadischen AD-Patienten eine signifikant erniedrigte Immunoreaktivität für PS-1 in Neuronen mit Neurofibrillen verglichen mit Neuronen ohne diese pathologischen

Veränderungen (Bouras, Giannakopoulos et al. 1996). In einer zweiten Untersuchung zeigte sich eine signifikant erniedrigte Presenilinkonzentration in Zellen von Patienten mit sporadischem AD (Giannakopoulos, Bouras et al. 1997). Dies scheint eine interessante Verbindung zwischen sporadischen AD-Fällen und familiären Formen mit Presenilin-Mutationen zu sein und auch in Patienten mit sporadischen AD könnte eine Funktionsänderung von Presenilinen zu einer Störung der Kalzium-Homöostase beitragen.

3. Ziele der Dissertation

Das Ziel dieser Dissertation ist die Untersuchung des serotonergen Systems als weiteres bedeutendes Transmittersystem in der Pathophysiologie der Alzheimerschen Demenz sowie die Untersuchung der Kalzium-Homöostase als wichtigstes intrazelluläres System der Signaltransduktion. Eingriffe in beide Systeme wurden bereits als neue Therapieoptionen bei Demenzpatienten vorgeschlagen und werden den neuen Erkenntnissen gerecht, nach denen Serotonin im Bereich Lernen, Gedächtnis und nicht kognitiven Symptomen bei AD eine bedeutende Rolle spielt und nach denen man spezifische Störungen auf subzellulärer Ebene im Bereich der Kalzium-Homöostase entdeckt hat.

Es werden Lymphozyten von Patienten mit M. Alzheimer, von Patienten mit anderen kognitiven Störungen und von Kontrollen mit Serotonin stimuliert und die Kinetik des dadurch ausgelösten intrazellulären Kalzium-Signals aufgezeichnet.

Zu den Zielen dieser Untersuchung gehört:

1. die Etablierung eines validen peripheren Modells für die in-vivo-Untersuchung des serotonergen Systems und Eingrenzung der möglichen transmittierenden 5-HT-Rezeptoren
2. herauszufinden, welche Veränderung überwiegt: die Dysfunktion in der serotonergen Transmission oder die gestörte Kalzium-Homöostase mit gesteigerter Kalziumionenfreisetzung nach serotonerger Stimulation und Erhöhung der freien intrazellulären Kalziumionenkonzentration
3. eine Entdeckung eines möglichen frühen diagnostischen und biologischen Markers

Im zweiten Teil wird der funktionelle His452Tyr-Polymorphismus im Exon3 des 5-HT_{2a}-Rezeptorgens der Patienten und Kontrollen untersucht und mit den Veränderungen der Kalzium-Homöostase und der serotonergen Signaltransduktion assoziiert. Die Ziele dieser Assoziation bestehen in

1. der Entdeckung eines weiteren genetischen Risikofaktors
2. der Identifizierung eines ätiologischen Faktors für die Veränderungen in der serotonergen Transmission
3. der Möglichkeit eventuelle Untergruppen identifizieren und individueller therapieren zu können.

4. Material und Methoden

4.1. Patienten und Probanden

4.1.1. PATIENTEN

Es nahmen 57 Patienten an den Untersuchungen zur intrazellulären Kalzium-Homöostase und der Polymorphismusbestimmung des 5-HT_{2a}-Rezeptorgens teil, die aus dem Patientenkollektiv der Demenzsprechstunde der gerontopsychiatrischen Forschungsstation (D4 der Psychiatrischen Klinik der LMU München) über einen Zeitraum eines halben Jahres rekrutiert wurden.

Voraussetzungen für die Aufnahme in die Studie erfüllten Patienten, die den ersten Kontakt zu einer psychiatrischen Einrichtung aufnahmen und/oder vor dem Therapiebeginn mit Nootropika und Acetylcholinesterasehemmern standen. Ausgeschlossen aus der Studie wurden Patienten, die Medikamente einnahmen, die in die intrazelluläre Kalzium-Homöostase (Kalzium-Antagonisten, Lithium), in das serotonerge System (selektive serotonerge Reuptake Inhibitoren, tricyclische oder tetracyclische Antidepressiva, Monoaminoxidase-Inhibitoren), oder das Immunsystem (systemische Glucocorticoide, Immunmodulatoren, Immunsuppressiva) eingreifen.

Die Patienten und/oder die gesetzlichen Betreuer wurden über das Ausmaß, die Risiken und den Zweck der Untersuchung ausführlich aufgeklärt und erteilten ihr Einverständnis in einer schriftlichen oder mündlichen Erklärung.

Die Untersuchung startete direkt bei Erstkontakt des Patienten mit der Demenzsprechstunde. So wurden die Versuche zunächst durchgeführt und ausgewertet ohne die abschließende Diagnose des einzelnen Patienten zu kennen. Durch die gerontopsychiatrische Forschungsstation wurden die Patienten nach einer ausführlichen Anamnese, körperlichen Untersuchung, apparativen Untersuchungen und neuropsychologischer Testung diagnostiziert. Nach Abschluss des experimentellen Teils der Studie wurden diese Diagnosen bekannt gegeben. Die Patienten konnten daraufhin in insgesamt 3 verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Tab.2).

Gruppe	Anzahl	Alter	Alter bei Erkrankung	Geschlecht	
				m	w
gesunde Kontrollen	30	64,8±9		11	19
1. Alzheimer	22	70,2±7	66 ± 7	10	12
2. andere kognitive Störungen	30	64,6±10	60 ± 10	19	11
2a SKS	15	62,3±12	58 ± 12	8	7
2b LKS	7	69,4±2	63 ± 4	6	1
2c VD	8	64,5±11	61 ± 11	5	3
3. Depressive Störung	5	61,4±8	59±14	1	4

Tab. 2 Demographische Charakteristika der verschiedenen Testgruppen: gesunde Kontrollen und die 3 Patientengruppen: 1. Alzheimer-Demenz (AD), 2. andere kognitive Störungen (aKS) mit den Untergruppen 2a subjektive kognitive Störungen (SKS), 2b leichte kognitive Störungen (LKS) und 2c vaskuläre Demenzen (VD) und 3. Depression. Alter bei Testung und bei Erkrankungsmanifestation (in Jahren; Mittelwert ± Standardabweichung) und Geschlecht (m = Anzahl der Männer, w = Anzahl der Frauen).

Gruppe 1 „Alzheimer-Demenz“ (AD):

22 Patienten erfüllten die Diagnosekriterien von der Arbeitsgruppe des National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) und der Alzheimer's Disease and Related Diseases Association (ADRDA) (McKhann, Drachman et al. 1984). Die Diagnose „wahrscheinliche Alzheimer-Demenz“ erhielten Patienten, die Defizite in 2 oder mehr kognitiven Bereichen hatten, eine progressive Verschlechterung des Gedächtnisses und anderen kognitiven Funktionen zeigten und bei denen Bewusstseinsstörungen ausgeschlossen werden konnten. Zusätzlich wurden apparative Untersuchungen durchgeführt, um andere Ursachen einer Demenz auszuschließen.

Gruppe 2 „andere kognitive Störungen“ (aKS):

Zur statistischen Analyse wurden 3 Untergruppen zur Gruppe 2 zusammengefasst (n=30).

Gruppe 2a „subjektive kognitive Störungen“ (SKS):

Bei 15 Patienten wurden die Symptome als subjektiv kognitive Störungen (SKS) eingestuft, bei denen die beklagten kognitiven Defizite nicht durch neuropsychologische Testung objektivierbar sind. Diese Störung entspricht dem Stadium 1 oder 2 auf der Global deterioration scale

(GDS) nach Reisberg (Reisberg, Ferris et al. 1982).

Gruppe 2b „leichte kognitive Störungen“ (LKS):

7 Patienten zeigten leichte kognitive Störungen (LKS), die definiert sind als ein frühes Verwirrheitsstadium mit objektivierbaren Merkfähigkeitsstörungen, örtlichen Orientierungsstörungen, Konzentrationsstörungen, Wortfindungs- und Benennstörungen oder Defiziten in der Bildung von neuen Gedächtnisinhalten. Hinweise auf diese Defizite ergeben sich nur in einer ausführlichen Anamnese, gehen aber über eine „altersentsprechende“ Vergesslichkeit hinaus (GDS=3).

Gruppe 2c „vaskuläre Demenzen“ (VD):

Zerebrovaskuläre Demenzen und Multiinfarktdemenzen sind mit den Demenzmischformen mit vaskulärer Komponente in dieser Gruppe zusammengefasst (n=8).

Entscheidend für die Zuteilung zu dieser Gruppe sind nach den Kriterien des National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINDS) und der Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences (AIRES) (Roman, Tatemichi et al. 1993) Nachweise von vaskulären Schäden mit bildgebenden Verfahren und der Zusammenhang dieser Befunde mit den psychopathologischen Symptomen.

Gruppe 3 „Depression“:

Bei 5 Patienten konnten die dementiellen Symptome als depressives Syndrom eingestuft werden, bei dem zusätzlich eindeutig kognitive Einbußen bestehen.

4.1.2. KONTROLLPERSONEN

Die gesunde Kontrollgruppe besteht aus 30 Probanden, die aus dem Großraum München durch mündliche Werbung und Aushänge in München für die Studie gewonnen werden konnten. Ein Drittel der Probanden konnte im gleichen Zeitraum wie die Patienten in die Studie aufgenommen werden. Zwei Drittel der Kontrollen wurden in den folgenden 2 Jahren rekrutiert.

Die Probanden wurden über das Ausmaß, die Risiken und den Zweck der Untersuchung ausführlich aufgeklärt und erteilten ihr Einverständnis in

einer mündlichen und/ oder schriftlichen Erklärung.

Die Ausschlusskriterien waren identisch mit denen der Patientengruppen (Kalziumkanal-Antagonisten, Antidepressiva, Immunmodulatoren, systemische Cortisontherapie). Zusätzlich sollte die eigene psychiatrische Anamnese und Familienanamnese besonders bezüglich dementiellen Erkrankungen unauffällig sein.

Die Probanden wurden ausführlich mit einem vorgefertigten Bogen anamnestiziert und es wurde eine Blutentnahme für laborchemische Untersuchungen durchgeführt. Die psychiatrische Anamnese und Familienanamnese war außer bei 3 Probanden unauffällig. Eine Probandin hatte sich einer einmaligen stationären Behandlung einer Angststörung unterzogen. Einem Probanden fiel eine Suizidhäufung in der Familie auf, ein anderer berichtete von einer depressiven Störung der Mutter. 19 Probanden waren frei von somatisch internistischen Erkrankungen. 11 Probanden berichteten von Erkrankungen im Bereich des kardiovaskulären Systems, 11 von 14 Probanden mit positiver Medikamentenanamnese nahmen antihypertensive Medikamente ein. 5 Probanden berichteten von endokrinologischen oder Stoffwechselerkrankungen und behandelten diese medikamentös. Bei den orientierenden laborchemischen Untersuchungen zeigten sich bezüglich der Elektrolyte, der Nieren- und Leberparameter, der Schilddrüsenwerte und des Blutbildes keine Auffälligkeiten. Bei 4 Probanden wurde ein leicht erhöhtes Gesamtcholesterin gemessen.

4.2. Kalzium-Messungen

4.2.1. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Die Blutentnahme in 3 CPDA-Monovetten (citrate-phosphate-dextrose-adenine; Sarstedt) erfolgte morgens zwischen 10.00 und 13.00 Uhr durch Venenpunktion der V. cubitalis. Die Lymphozyten wurden immer direkt anschließend durch Dichtezentrifugation mit Ficoll-Lösung (Biochrom KG) isoliert. Das Vollblut aus drei 7,5 ml - Monovetten wurde hierzu mit RPMI (Biochrom

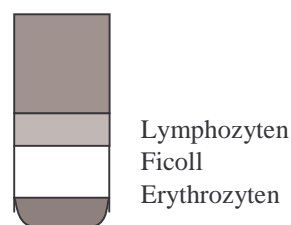


Abb. 3 schematische Darstellung eines Falcon-Röhrchens mit mit Vollblut überschichteter Ficoll-Lsg. nach Dichtezentrifugation

KG), dem zuvor BSA (bovines Serumalbumin, Fraktion V, Roth) in einer Konzentration von 1g/l zugesetzt wurde, im Verhältnis 1:3 verdünnt. Der Überschichtung der Ficoll-Lösung (15 ml) mit verdünntem Vollblut (40 ml), folgte eine Zentrifugation über 45 Minuten bei 25°C und 400g. Anschließend wurden die Lymphozyten, deren Schicht sich oberhalb der Ficoll-Lösung befindet, vorsichtig abpipettiert (Abb.3).

4.2.2. KALZIUM-MESSUNGEN AM LS 50 B

Die Bestimmung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) beruht auf der Messung des Wellenlängenspektrums des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 AM, dessen Spektrum sich bei seiner Bindung an freie Kalziumionen verschiebt (Grynkiewicz, Poenie et al. 1986).

Zur Färbung der Lymphozyten mit Fura-2 AM wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit RPMI in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in RPMI resuspendiert und für 40 min bei 37 °C mit Fura-2 (Sigma) in der Endkonzentration von $3 \mu\text{mol/l}$ inkubiert. Die Zellen wurden anschließend einmal gewaschen, in HBSS-Puffer resuspendiert und auf die Zellkonzentration von 1×10^7 Zellen/ml mit dem Zellzähler (Beckman Coulter) eingestellt. Vor der Messung sicherte eine Inkubation von 20 Minuten bei 25°C das Auffüllen der intrazellulären Kalziumionenspeicher.

Die Messung erfolgte am Luminiszenz Spektrometer von Perkin

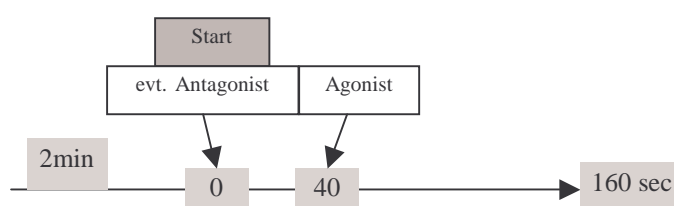


Abb. 4 Zeitverlauf der Kalzium-Messung:

Nach 2 min Vorinkubation wird bei 0 sec die Aufzeichnung gestartet und bei 40 sec die Stimulation mit dem Agonisten durchgeführt. Insgesamt wird über einen Zeitraum von 160 sec aufgezeichnet.

Elmer (LS 50B). Die Fluoreszenz Intensität wurde nach folgender Gleichung zu der $[Ca^{2+}]_i$ in Beziehung gesetzt

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F},$$

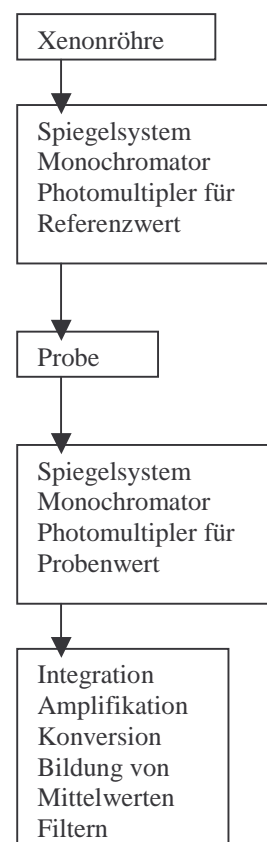
bei der K_d die Dissoziationskonstante für die Ca^{2+} -Bindung an Fura-2 ist (Sie beträgt 224 nmol/l bei pH 7,4 und 37°C.) und F die Fluoreszenz Intensität der Probe an den jeweiligen Meßpunkten. F_{max} und F_{min} erhält man nach Kalibrierung mit 0,5 mmol/l Digitonin- (Sigma) und 100 mmol/l EGTA-Lösung (Merck).

Die Zellsuspension wurde zunächst 2 min bei 37°C inkubiert, dann begann die Messung (Abb. 4). Bei einigen Versuchen wurde am Ende der 2-minütigen Inkubation vor dem Start der Datenaufzeichnung ein 5-HT-Antagonist zugegeben. Nach weiterer Inkubationszeit von 40 sec wurde mit Serotonin (Sigma) oder α Methyl-Serotonin (Tocris) in Konzentrationen von 10 μ mol/l stimuliert.

4.2.3. STRAHLENGANG

Fura-2 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch an Ca^{2+} -Ionen bindet und Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittiert, je nachdem, ob Kalzium gebunden ist oder nicht (340 bzw. 380nm). Mit dem Luminiszenz Spektrometer LS50B kann man Intensitäten von Licht mit unterschiedlicher Wellenlänge getrennt bestimmen. Aus dem Verhältnis der Intensitäten bei 340nm und 380nm Wellenlänge und unter Einbeziehung der maximalen (nach Zugabe von Digitonin) und minimalen (nach Zugabe von EGTA) Kalziumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) können die absoluten $[Ca^{2+}]_i$ berechnet werden.

Der LS50B kann die Fluoreszenz von Proben im zeitabhängigen Ablauf (Time drive) messen und aufzeichnen. Die Anregungsquelle ist eine spezielle Xenon-Röhre. Der Strahlengang ist in Abb. 5 abgebildet.



**Abb. 5 Messaufbau
des LS 50B,
Strahlengang**

Antagonist gegen 5-HT-Rezeptortyp	Name	Firma	Endkonzentration
5-HT1A	Piperazin	Tocris	1µmol/l
5-HT1B	GR55562	Tocris	0,1µmol/l
5-HT2	Risperidon	Janssen Biotech	0,1µmol/l; 1µmol/l
5-HT2A/C 5-HT2C	Ketanserin RS102221	Tocris Tocris	0,001-1µmol/l 0,1µmol/l; 1µmol/l
5-HT3	Tropisetron	RBI	1µmol/l
5-HT4	RS39604	Tocris	1µmol/l

Tab. 3 Antagonisten für die verschiedenen 5-HT-Rezeptorsubtypen

4.2.4. DIE 5-HT-REZEPTORANTAGONISTEN

Zur pharmakologischen Bestimmung des Rezeptorsubtyps wurde versucht, das Serotonin-induzierte Kalzium-Signal mit Antagonisten zu blockieren (Tab.3). Diese Substanzen wurden kurz vor dem Messstart zur Zellsuspension gegeben. Nach 40 sec wurde die Blockierungsfähigkeit durch Stimulation der Zellen mit 5-HT getestet .

4.2.5. STATISTISCHE ANALYSE

Die aufgezeichneten Kalziumkurven ließen sich grundsätzlich in vier Kurvenabschnitte einteilen (Basislinie, initialer Anstieg, leichter Abfall, flacher zweiter Anstieg) (Abb. 6). Die Kurven wurden durch die Bestimmung von 4 Werten ausgewertet, die jeweils die 4 Abschnitte des normalen Kurvenverlaufs charakterisieren. **Der Basalwert** charakterisiert den ersten Abschnitt und entspricht der mittleren $[Ca^{2+}]_i$ der ersten 40 sec. Für den 2. Abschnitt wird das **initiale Maximum** (Max_{ini}) bestimmt, die maximale $[Ca^{2+}]_i$ des initialen Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ nach 5-HT-Stimulation. Der 3. Abschnitt, der sich durch einen leichten Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ auszeichnet, wird durch das **Minimum** (Min) gekennzeichnet, das der kleinsten $[Ca^{2+}]_i$ nach dem initialen Maximum entspricht. Der Mittelwert der letzten 10 sec ergibt das **finale Maximum** (Max_{fin}) und charakterisiert den letzten Abschnitt des flachen Anstiegs der Kalziumionenkonzentration (Abb. 6). Die Subtraktion des Basalwerts von den absoluten Werten (Max_{ini} , Min, Max_{fin}) ergibt die Differenzwerte **Max_{ini}**, **Min** und **Max_{fin}**.

Zusätzlich wurden die Zeiten gemessen bis zum Erreichen des initialen Maximums (t_{\max}) und des Minimums (t_{\min}).

Zur statistischen Analyse wurde das Statistik-Programm SPSS 9.05 verwendet. Zur Testung der Null-Hypothese, dass es keinen Mittelwertunterschied der einzelnen Variablen zwischen den unterschiedlichen Patientengruppen und der Kontrollgruppe gibt, wurde die einfaktorische Varianzanalyse (Analysis of variance, ANOVA) angewendet. Die Varianzanalyse bedient sich dem Vergleich der Gruppenvarianzen, die aus den Gruppenmittelwerten geschätzt werden. Die Homogenität der Varianzen als Voraussetzung zur Anwendung dieses Tests wurde mit dem Levene-Test überprüft. Um die Unterschiede bestimmten Gruppen zuordnen zu können, wurden bei signifikantem Ergebnis in der Varianzanalyse zusätzliche statistische Tests durchgeführt. Bei nicht signifikantem Levene's Test (Levene's test: $p > 0,1$) wurde der Bonferroni-Test, konnte die Varianzgleichheit nicht angenommen werden (Levene's test: $p \leq 0,1$) wurde der Tamhane-T2 angewendet, für den eine Varianzgleichheit nicht vorgeschrieben ist.

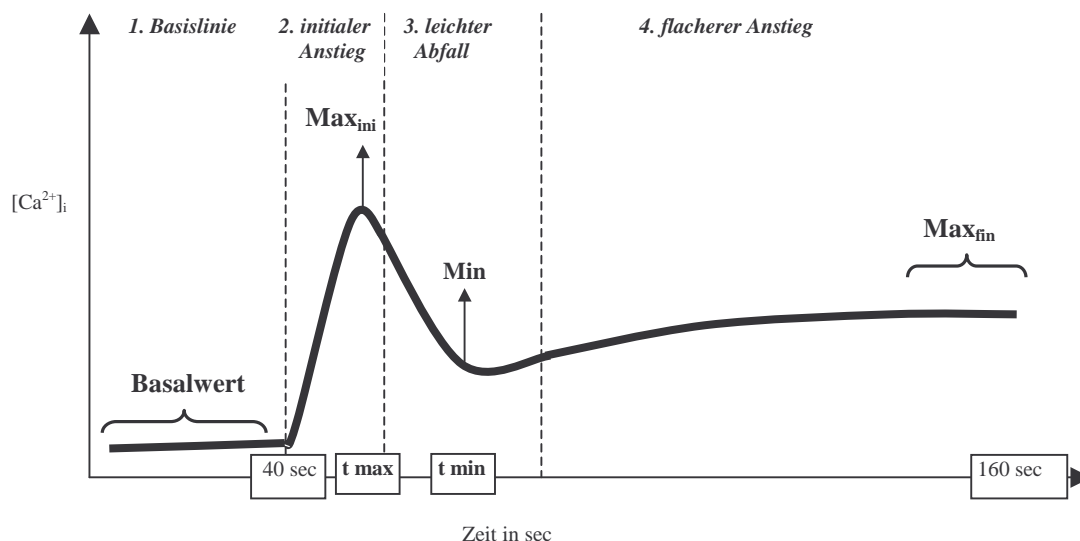


Abb. 6 Schematischer Kurvenverlauf mit den 4 Kurvenabschnitten (1. Basislinie, 2. initialer Anstieg, 3. leichter Abfall, 4. flacherer Anstieg) in Kursiv und den 4 charakterisierenden Werten (Basalwert, initiales Maximum (Max_{ini}), Minimum (Min), finales Maximum (Max_{fin})) in Fettdruck.

4.3. Bestimmung des His452Tyr-Polymorphismus des 5-HT_{2a}-Rezeptor-Gens

4.3.1. MATERIALGEWINNUNG

Die genetischen Untersuchungen wurden bei insgesamt 19 Kontrollen und 29 Patienten durchgeführt. Die Blutabnahme in EDTA-Monovetten (Sarstaedt) zur Gewinnung von Frischblut wurde zusammen mit der Blutabnahme zur Gewinnung der Lymphozyten für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ durchgeführt.

DNA-Präparation aus Vollblut

Die DNA-Isolation wurde mit dem Qiagen Blood & Cell Culture DNA Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieser Kit basiert auf einem Anionenaustauscher-System, das pH-abhängig und abhängig von der Osmolarität selektiv chromosomale DNA bindet. Bei hohem Salzgehalt des Puffers wird die chromosomale DNA wieder abgegeben.

Zunächst wurden die Zellmembranen durch die Zugabe eines Zellen lysierenden Puffers (1,28mol/l Sucrose, 40mmol/l Tris-Cl, pH 7,5, 20mmol/l MgCl₂, 4% Titron X-100) zerstört und die lysierten Zellen 2 mal gewaschen (4°C, 15 min, 1300g). Die Zellkerne wurden in einem Lysis-Puffer (800mmol/l Guanidine-HCl, 30mmol/l Tris-Cl, pH 8,0, 30mmol/l EDTA, 5% Tween-20, 0,5% Triton X-100) resuspendiert und nach Zugabe von Proteinase K 45min bei 50°C inkubiert. Die DNA wurde so von der Kernmembran und den DNA-bindenden Proteinen befreit. Nachdem das Austauscher-System mit einem speziellen Puffer (750mmol/l NaCl, 50mmol/l MOPS, pH 7,0, 15% Isopropanol, 0,15% Triton X-100) equilibriert wurde, wurde die DNA-Suspension in das System eingefüllt. Danach wurden zwei mal mit Wasch-Puffer (1mmol/l NaCl, 50mmol/l MOPS, pH 7,0, 15% Isopropanol) Rückstände ausgewaschen, sodass nur noch gereinigte DNA im System gebunden war. Mit dem auf 50°C vorgewärmten Elutions-Puffer (1,25mol/l NaCl, 50mmol/l Tris-Cl, pH 8,5, 15% Isopropanol) wurde die genomische DNA eluiert. Anschließend wurde sie mit 70% Ethanol gewaschen und das Pellet 10 min luftgetrocknet. Nach Resuspension in Tris(10mmol/l)-EDTA(0,1mmol/l) wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (Absorption bei 260nm) und die DNA-Konzentration auf 50ng/ml mit Tris(10mmol/l)-EDTA(0,1mmol/l)

verdünnt. Die DNA wurde bei -20°C gelagert (long time storage).

4.3.2. PCR-RESTRIKTIONS-LÄNGENPOLYMORPHISMUS

Nach den Untersuchungsprotokollen von schon vorher publizierten Arbeiten wurde die Polymerase-Chain-Reaction (PCR) und die Restriktionsanalyse zur Bestimmung des His452Tyr-Polymorphismus durchgeführt (Preuss, Koller et al. 2000) (Erdmann, Shimron-Abarbanell et al. 1996). Der His452Tyr Polymorphismus des 5-HT_{2a}-Rezeptorgens ist ein funktioneller bialleler Polymorphismus am Genort 13q14 – 13q21. Es handelt sich um eine Punktmutation mit einem Basenaustausch von Cytosin nach Thymin an Position 1354, der zu einem Aminosäureaustausch von Histidin nach Tyrosin an Position 452 führt.

Die Detektion des Polymorphismus erfolgt durch PCR und der Restriktion des PCR-Produkts mit der bakteriellen Endonuklease Bbv 1.

PCR

Die PCR ist ein enzymatisches Verfahren zur Amplifikation von definierten DNA-Bereichen. Das Grundprinzip besteht in der Duplikation einer DNA-Sequenz, die der physiologischen enzymatischen Replikation analog ist. Sie besteht aus

1. der Aufspaltung der Doppelhelix in 2 Einzelstränge (Denaturierung)
2. Anlagerung der Primer (Annealing)
3. der Addition von Nucleotiden durch DNA-Polymerasen in 5'→3' Richtung (Elongation) (Abb.7).

Diese Duplikation wird zyklisch wiederholt, sodass es bei jeder Wiederholung ungefähr zur Verdopplung der DNA-Menge kommt. Der Versuchsansatz enthielt die Primer

Primer F: 5' – CAA AGT AAG ATG CCA AGA CA – 3'

Primer R: 5' – GGC ATA CAG ATA TGA TCG TTG G – 3'

in einer Endkonzentration von $0,8\mu\text{mol/l}$ (TibMolBiol), Nucleotide (dNTP) in einer Konzentration von $200\mu\text{mol/l}$ (Pharmacia), 1,25 Units Taq Polymerase (Polymerase AmplitaqGold, Perkin Elmer), KCl 50mmol/l , Tris-HCl 10mmol/l (pH 8,3), MgCl_2 $1,5\text{mmol/l}$, Gelatine 0,001 % und 50ng genomische DNA (Tab. 4).

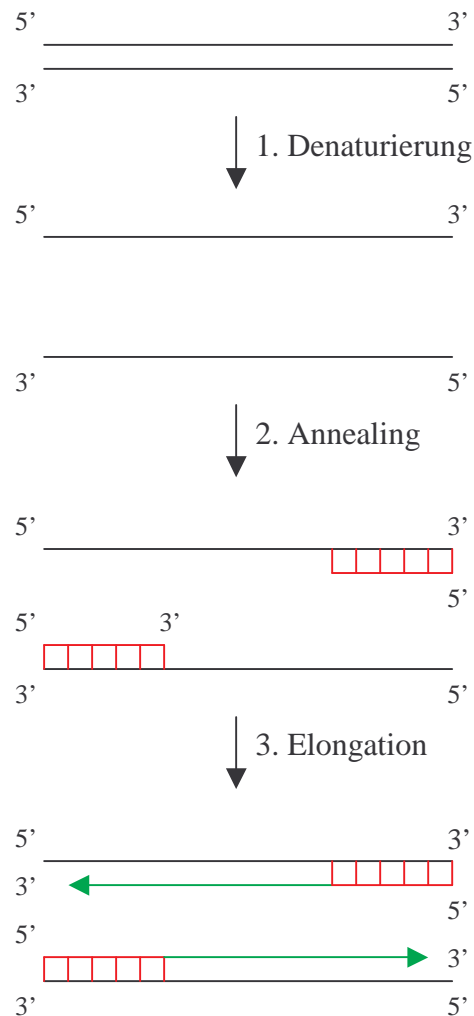


Abb. 7 Schematischer Ablauf einer PCR mit Denaturierung, Anlagerung der Primer (Annealing) und DNA-Synthese (Elongation)

Zunächst wurde die Taq-Polymerase durch eine 10-minütige Inkubation bei 95°C hitzeaktiviert. Darauf folgten 30 Zyklen jeweils mit der Denaturierung der DNA bei 95°C, der Anlagerung der Primer (Annealing) an die DNA-Stränge bei 58°C und der Elongation der DNA-Stränge durch die Taq-Polymerase bei 72°C. Zur Vervollständigung der begonnenen Stränge wurde abschließend 4min bei 72°C inkubiert (Tab. 4).

Spaltung des PCR-Produkts mit Restriktionsendonucleasen:

Zur Detektion der Punktmutation wurde die Restriktion der amplifizierten DNA mit dem bakteriellen Enzym Bbv 1 (New England Biolabs) durchgeführt. Bbv 1 ist eine Restriktionsendonuclease des Bakteriums *Bacillus brevis*, die Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäuren durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung spezifisch innerhalb der

Versuchsansatz	Konzentration	Firma, Bezeichnung
Primer F und R dNTP PCR-Puffer Taq Gold gDNA	0,8µmol/l 200µmol/l 1x 1,25Units 50ng	TibMolBiol Pharmacia Perkin Elmer Polymerase AmpliTaq Gold, Perkin Elmer
PCR-Bedingungen	Temperatur	Vorgang
Inkubationsdauer		
10 min	95°C	Hitzeaktivierung der Taq
30 sec 30 sec 30x 30 sec	95°C 58°C 72°C	Denaturierung der DNA Annealing der Primer Elongation des DNA-Stranges d. Taq
4 min	72°C	Vervollständigung der begonnenen Stränge

Tab. 4 Versuchansatz und PCR-Bedingungen bei der Bestimmung des His452Tyr-Polymorphismus



In einem Endvolumen von 30µl wurden 15µl des PCR Produktes mit 20 Units BbvI und einem Puffer bestehend aus 5mmol/l NaCl, 1mmol/l Tris-HCl, 1mmol/l MgCl₂, 0,1mmol/l Dithiothreitol (pH 7.9 bei 25°C) für 18h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzymes (20 min bei 65°C).

Es entstehen beim Wildtyp (His-Allel) 2 DNA-Fragmente mit 180 bzw. 68 Basenpaaren, bei der Mutante (⁴⁵²Tyr-Allel) entfällt die Erkennungssequenz des Enzyms und das PCR-Produkt bleibt ungeschnitten (248bp). Der Restriktionsansatz wird danach für die Agarosegelelektrophorese verwendet.

Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Moleküle wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Agarose ist die Matrix, in der DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen bei Anlegung einer Gleichspannung zur Anode wandern.

Eine 2%ige Agaroselösung in TBE-Puffer (Tris/Base 89mmol/l, Borsäure 89mmol/l, EDTA 2mmol/l, pH 8) wird aufgeköcht, ihr wird Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1µg/ml zugesetzt und sie wird nach dem Abkühlen auf 50°C luftblasenfrei in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wird der Kamm vorsichtig

herausgezogen. Der Gelträger wird in eine Pufferkammer eingesetzt und mit TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben (ca. 15 µl) werden mit 2 µl-Auftragepuffer (Sucrose 40%, Bromphenolblau 0,25%) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Weiterhin wird ein Längenstandard (Molecular Weight Marker XIII, Fa. Roche Molecular Biochemica) bestehend aus DNA-Banden definierter Größe mit aufgetragen. Danach wird eine Gleichspannung von 80 Volt für 60 min angelegt.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wird eine Video-Photodokumentation mittels UV-Durchlicht (Eagle Eye Still Video System, Stratagene) vorgenommen.

5. Ergebnisse

5.1. Das 5-HT induzierte Kalzium-Signal in humanen Lymphozyten

5.1.1. MORPHOLOGIE DES AUFGEZEICHNETEN KALZIUM-SIGNALS

Die Basislinie

Zeichnet man die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in humanen Lymphozyten über die Zeit auf ohne das System zum Beispiel durch einen Agonisten zu manipulieren, erhält man eine Kurve, aus der man einen konstanten Mittelwert ablesen kann. Dieser Mittelwert ist Ausdruck einer Ruhekonzentration, die durch ein Gleichgewicht zwischen Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum bzw. Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Reticulum (ER) und Ca^{2+} -Ausstrom in den Extrazellulärraum bzw. Ca^{2+} -Rücktransport in das ER aktiv aufrechterhalten wird (Abb. 8, erste 35 sec).

Stimulierung der Zellen mit serotonerge Agonisten

Zur Stimulierung der Zellen wurden zwei unterschiedliche Agonisten verwendet, Serotonin (5-HT) und α Methyl-Serotonin (α Me-5-HT), ein selektiver Serotoninagonist für 5-HT_{2a}-Rezeptoren, der eine höhere metabolische Stabilität aufweist. Bei allen Versuchen wurde zunächst über 40sec die $[Ca^{2+}]_i$ als Basiskurve aufgezeichnet, bevor die Agonisten in einer Konzentration von 10 μ mol/l zugegeben wurden. Es zeigte sich bei humanen Lymphozyten auf die Stimulierung mit 5-HT bzw. α Me-5-HT ein steiler

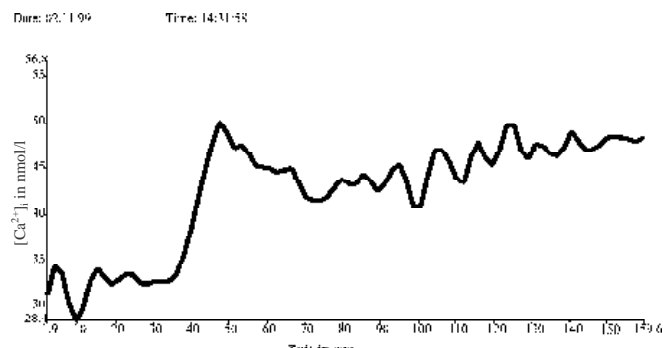


Abb. 8 Morphologie des Kalzium-Signals nach serotonerger Stimulation. Lymphozyten einer 59-jährigen Probandin wurden nach Inkubation über ca. 40 sec bei 37°C mit Serotonin (5-HT) in einer Konzentration von 10 μ mol/l stimuliert. Man erkennt einen zweiphasigen Verlauf mit einem zunächst steilen Anstieg und anschließender flacher Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration nach Stimulation mit 5-HT.

Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ um ca. 20 nmol/l innerhalb von 10 Sekunden (Abb.8).

Dieser Anstieg ist Ausdruck einer Phospholipase C katalysierten Hydrolyse von PIP_2 , die zur Bildung von IP_3 führt. IP_3 bewirkt durch die Bindung an spezifische IP_3 -Rezeptoren des glatten endoplasmatischen Reticulums eine Freisetzung von Ca^{2+} (Berridge and Irvine 1984).

Biphasischer Verlauf der Kalziumkurven nach serotonerger Stimulation

Auf diesen steilen Anstieg folgte ein kurzer Abfall und ein nachfolgender zweiter Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$), der wesentlich flacher ausfiel als der initiale Anstieg (Abb.8). In nicht erregbaren Zellen ist dieses zweiphasische Kalzium-Signal typisch für eine IP_3 -induzierte Kaskade (Braiman, Goldstein et al. 2000). Der zweite Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ wird vor allem über einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum erreicht und trägt zum Auffüllen der intrazellulären Speicher bei. (Berridge 1993; Clapham 1995). Innerhalb des Beobachtungszeitraums von 2min blieb eine Reduktion der $[Ca^{2+}]_i$ auf die Basislinie aus.

5.1.2. DOSIS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG DES AGONISTEN 5-HT

Vor der weiteren Durchführung der Untersuchung wurden die Effekte unterschiedlicher 5-HT-Konzentrationen untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Konzentrationsabhängigkeit besteht und die Sättigung zwischen 5-10 μ mol/l zu beobachten ist (Abb.9). Die Stimulationen in den weiteren

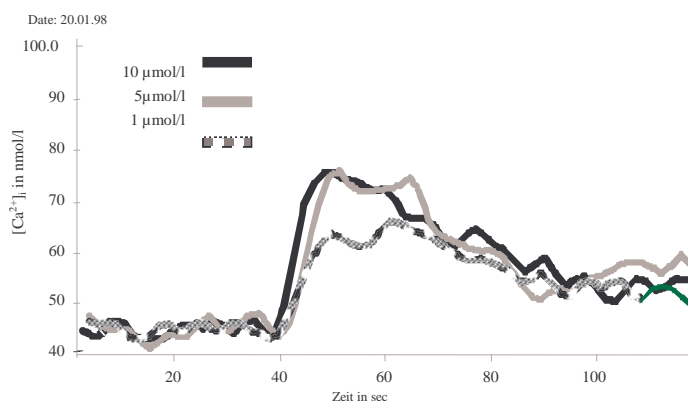


Abb. 9 Konzentrationsabhängigkeit des Kalzium-Signals nach serotonerger Stimulation. Lymphozyten eines 45jährigen Probanden wurden nach ca. 40 sec mit Serotonin (5-HT) in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Es wird eine Konzentrationsabhängigkeit des serotonergen Signals deutlich, die Sättigung liegt zwischen 5 und 10 μ mol/l.

Untersuchungen wurden mit Serotonin und α Me-5-HT in der Konzentration von $10\mu\text{mol/l}$ durchgeführt. Diese Konzentration entspricht der 5-HT-Konzentration zur Stimulation von Thrombozyten in der Literatur (Muraoka, Kamei et al. 1998; Tomiyoshi, Kamei et al. 1999).

5.1.3. EINTEILUNG DER KALZIUMKURVEN IN 4 ABSCHNITTE UND AUSWERTUNG

Der Kurvenverlauf des Kalzium-Signals nach 5-HT bzw. α Me-5-HT-Stimulation ließ sich in insgesamt 4 Abschnitte aufteilen (vgl. Abb.6).

Zur Auswertung dieses Kurvenverlaufs wurden 4 Werte bestimmt, die die 4 Abschnitte des normalen Kurvenverlaufs charakterisieren. Dem ersten Abschnitt, der Basislinie wurde der Basalwert zugeordnet, dem die mittlere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der ersten 40 sec entspricht. Das initiale Maximum (Max_{ini}) ist die initiale maximale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ direkt nach 5-HT-Stimulation und kennzeichnet den 2. Abschnitt. Der 3. Abschnitt, der sich durch einen leichten Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auszeichnet, wurde durch das Minimum gekennzeichnet, das der kleinsten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach dem initialen Maximum entspricht. In den letzten 10 sec jeder Aufzeichnung wurde die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gemittelt. Dieser Mittelwert ergab das finale Maximum (Max_{fin}) und charakterisierte den letzten Abschnitt des flachen Ca^{2+} -Konzentrationsanstiegs. Von den absoluten Werten (Max_{ini} , Min , Max_{fin}) wurde jeweils der Basalwert subtrahiert. So erhält man die Differenzwerte Max_{ini} , Min und Max_{fin} . Zur kinetischen Auswertung wurden die Zeiten bis zum Erreichen des Maximums (t_{max}) und des Minimums (t_{min}) bestimmt. Man erhält somit 6 Variablen: 2 Mittelwerte von Ca^{2+} -Konzentrationen in nmol/l über die Zeit (Basalwert, finales Maximum), zwei Ca^{2+} -Konzentrationen zu bestimmten Zeiten in nmol/l (initiales Maximum, Minimum) und zwei Zeiten in sec (Zeit bis zum Erreichen des initialen Maximums und des Minimums).

5.1.4. DER 5-HT_{2A}-REZEPTOR AUF HUMANEN LYMPHOZYTEN

Zur Bestimmung der Rezeptoren aus der 5-HT-Rezeptorfamilie, mittels derer der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induziert wird, wurden die Lymphozyten vor der Stimulation mit 5-HT für 40 sec mit verschiedenen spezifischen Antagonisten inkubiert. Bei diesen Versuchen wurde nur mit 5-HT ($10\mu\text{mol/l}$) stimuliert, da α Me-5-HT durch seine Selektivität für 5-HT₂-Rezeptoren als Agonist nicht geeignet ist.

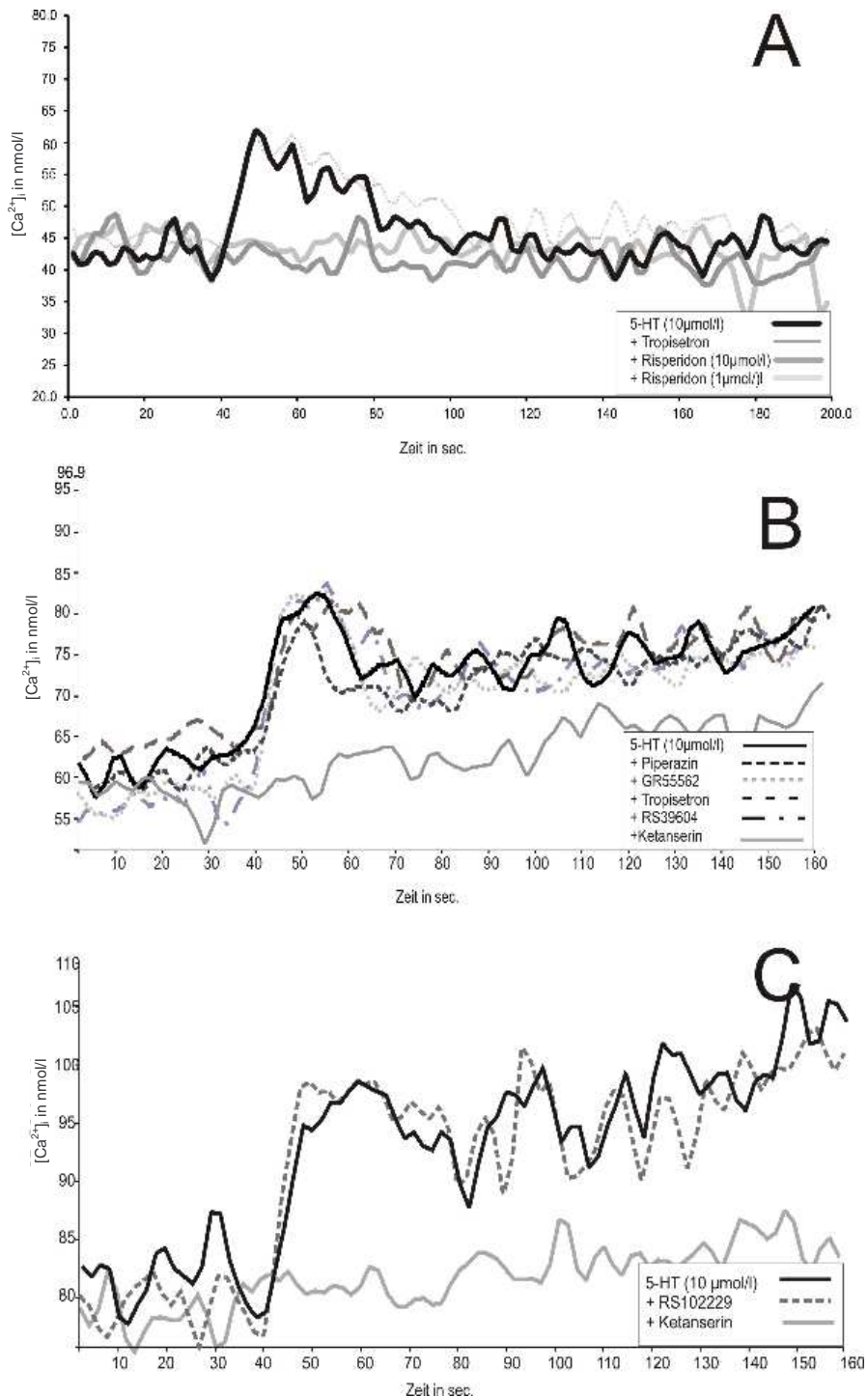


Abb. 10 Charakterisierung des Rezeptors, der das 5-H- induzierte Kalzium-Signal in Lymphozyten vermittelt, als 5-HT₂-Rezeptor

Die Lymphozyten wurden nach Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM mit 5-HT (10µmol/l) stimuliert. Die selektiven 5-HT-Rezeptor-Antagonisten wurden vor dem Start der Messung zugegeben. Der 5-HT₂-Antagonist Risperidon (A, 24-jährige gesunde Probandin) und der 5-HT_{2a}-Antagonist Ketanserin (B, 74-jährige Patientin und C, 73-jähriger gesunder Proband) konnten das Serotonin induzierte Kalzium-Signal in den gezeigten 3 einzelnen unabhängigen Versuchen blockieren, während die Inkubation mit Piperazin (5-HT_{1a}-Antagonist, 1µmol/l), GR55562 (5-HT_{1b/D}-Antagonist, 0,1µmol/l), Tropicsetron (5-HT₃-Antagonist, 1µmol/l) RS39604 (5-HT₄-Antagonist, 1µmol/l)(B) und RS102221 (5-HT_{2c}-Antagonist, 1µmol/l) keine Auswirkungen auf das 5-HT-induzierte Kalzium-Signal hatten (C).

Die Inkubation mit dem 5-HT_{1b/D}-Antagonist GR55562 in einer Endkonzentration von 0,1µmol/l und mit Piperazin (5-HT_{1a}-Antagonist), Tropisetron (5-HT₃-Antagonist) und RS39604 (5-HT₄-Antagonist) jeweils in Endkonzentrationen von 1µmol/l bewirkte keine wesentliche Veränderung des Kalzium-Signals im Vergleich zum 5-HT-induzierten Kalzium-Signal ohne vorherige Inkubation mit einem Antagonisten (Abb.10A+B). Allein die Zugabe von Risperidon in der Endkonzentration von 1µmol/l und 10µmol/l führte zu einer vollständigen Unterdrückung des Kalzium-Signals (Abb.10A). Risperidon ist ein unspezifischer 5-HT₂-Rezeptor-Antagonist. Um genauere Aussagen über die Subtypisierung des vermittelnden 5-HT-Rezeptors zu erhalten, wurde in folgenden Versuchen nun mit Ketanserin, einem selektiven 5-HT_{2a}-Rezeptor-Antagonist, und RS102229, einem 5-HT_{2c}-Antagonist, inkubiert. Es zeigte sich eine vollständige Antagonisierung des Kalzium-Signals durch Ketanserin, während die Zugabe von RS102229 ohne Wirkung blieb (Abb.10C). Auch in weiteren 4 Versuchen mit humanen Lymphozyten wurde stets eine vollständige Blockierung des Kalzium-Signals durch den 5-HT_{2a}-Antagonisten Ketanserin beobachtet (Abb.11).

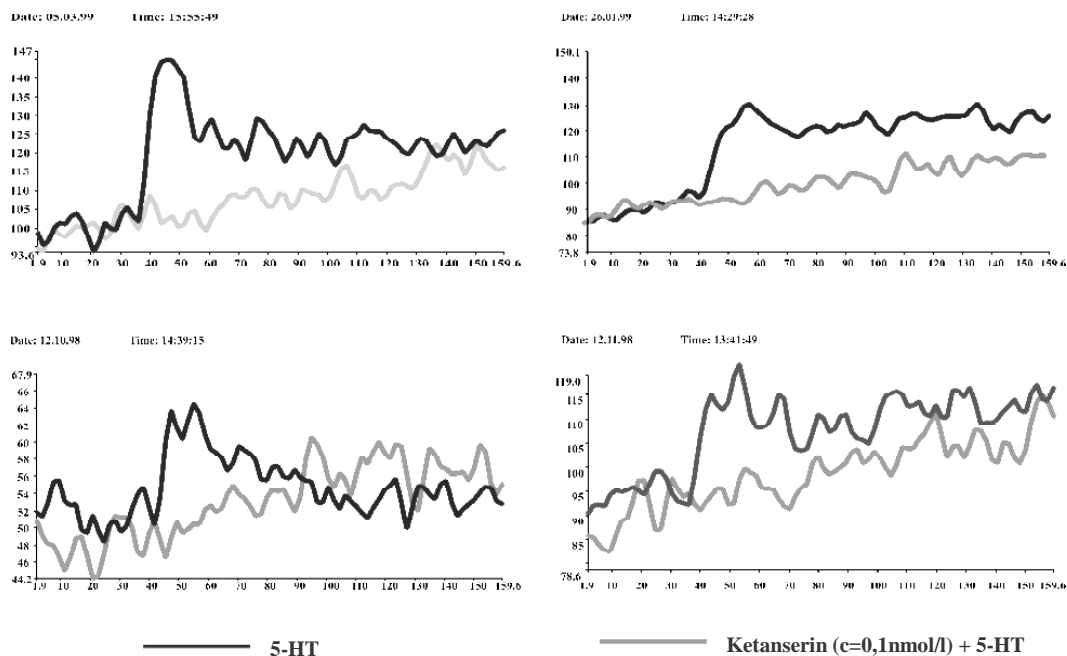
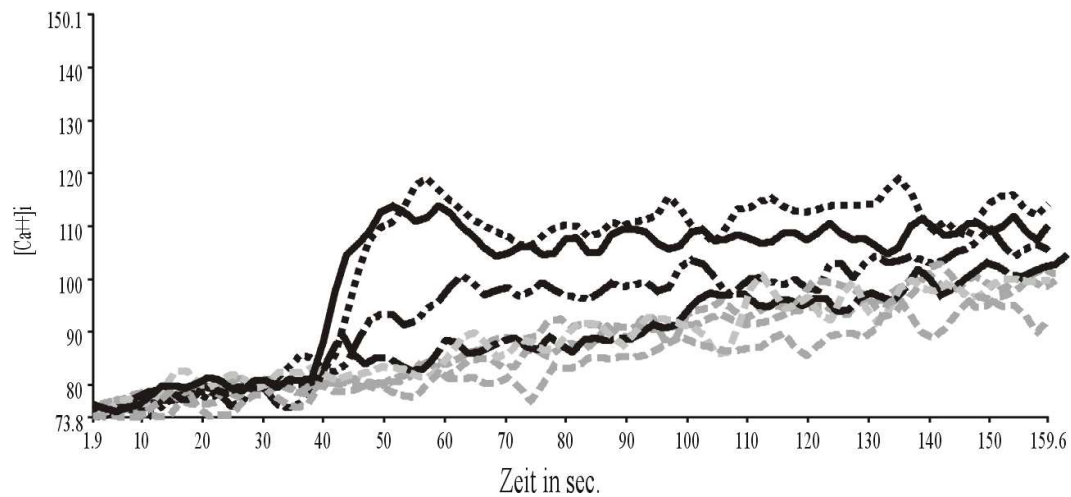


Abb. 11 Kalziumkurven von weiteren 4 Probanden nach Stimulierung mit 5-HT (schwarze Kurven). Bei dem jeweils zweiten Versuch wurde vor der Stimulierung mit 5-HT für insgesamt 40 sec mit dem 5-HT_{2a}-Rezeptorantagonisten inkubiert (graue Kurven). Bei allen Probanden zeigte sich eine vollständige Blockierung des 5-HT-induzierten Kalzium-Signals durch Ketanserin.

[Ketanserin] in nmol/l	ohne	1	6	12,5	25	50	100	1000
Anstieg ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) in nmol/l	34	34	26	10	0	0	0	0
Hemmung in %		0	24	71	100	100	100	100
Legende								



Dosis-Wirkungsbeziehung in logarithmischer Darstellung

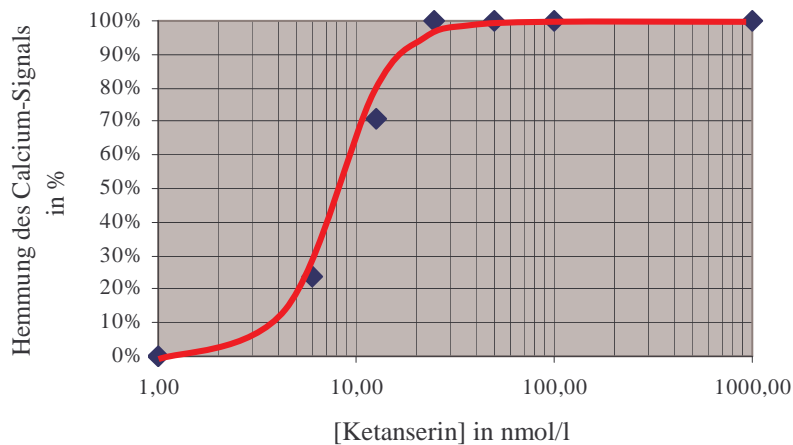


Abb. 12 5-HT-induziertes Kalzium-Signal bei einem 45-jährigen gesunden Probanden und Dosis-Wirkungsbeziehung mit Ketanserin. Nach einer Vorinkubation von 2 min bei 37°C wurde die Messung gestartet und bei 40 sec die Stimulation mit 5-HT (10 μ mol/l) durchgeführt. Der dabei zu beobachtende Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ um 34nmol/l stellte den Referenzwert für die prozentuale Hemmung durch Ketanserin dar. Ketanserin wurde in den entsprechenden Konzentrationen direkt vor Messbeginn der Zellsuspension zugegeben. ($[Ca^{2+}]_i$ = Netto Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ über der Basislinie). Bei logarithmischer Auftragung ergibt sich eine typische sigmoide Kurvenform.

Dosis-Wirkungsbeziehung

Lymphozyten eines 45jährigen Probanden wurden mit Ketanserin in Konzentrationen zwischen 1 und 1000nmol/l inkubiert. Eine Ketanserin-Konzentration zwischen 6nmol/l und 12,5nmol/l führte zu einer dosis-abhängigen Reduzierung des 5-HT-induzierten Kalzium-Signals (Abb.12). Bereits bei einer Konzentration von 25nmol/l wurde das Kalzium-Signal vollständig blockiert. Die logarithmische Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung ergibt einen typischen sigmoiden Kurvenverlauf (Abb.12, unten). Diese Ergebnisse lassen auf das Vorhandensein von 5-HT_{2a} Rezeptoren auf Lymphozyten schließen und zeigen, dass ihr funktioneller Status durch die Messung des Kalzium-Signals untersucht werden kann.

5.2. Das Serotonin-induzierte Kalzium-Signal bei gerontopsychiatrischen Patienten und gesunden Kontrollen

5.2.1. PATIENTEN UND KONTROLLEN

Die Patienten

Es nahmen insgesamt 87 Patienten und Probanden an den Untersuchungen zur intrazellulären Kalzium-Homöostase teil. Die Untersuchungen wurden zunächst durchgeführt und ausgewertet ohne die Diagnose des einzelnen Patienten zu kennen. Nach Abschluss des experimentellen Teils der Studie wurden die Diagnosen bekannt gegeben, die nach Diagnosekriterien der Arbeitsgruppe des National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) und der Alzheimer's Disease and Related Diseases Association (ADRDA) (McKhann, Drachman et al. 1984), der Global deterioration scale (GDS) nach

Gruppe	Anzahl
Kontrollen	30
Patienten	57
1. Alzheimer (AD)	22
2. andere kognitive Störungen (aKS)	30
2a. SKS	15
2b. LKS	7
2c. VD	8
3. Depressive Störung (DS)	5
Total	87

Tab. 5 Anzahl der Personen in den verschiedenen Diagnose-Gruppen: Kontrollen (gK) und Patienten mit M. Alzheimer (AD), mit anderen kognitiven Störungen (aKS, darunter Patienten mit subjektiv kognitiven Störungen (SKS), leichten kognitiven Störungen (LKS) und vaskulärer Demenzen (VD)) und mit depressiven Störungen.

Reisberg (Reisberg, Ferris et al. 1982) und des National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINDS) und der Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences (AIREN) (Roman, Tatemichi et al. 1993) gestellt wurden.

Diagnosegruppen

Die Patienten konnten daraufhin in insgesamt 3 verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Tab.5). 22 Patienten wurden der ersten Gruppe „wahrscheinliche Alzheimer-Demenz“ (AD) zugeordnet. Die Gruppe 2 „andere kognitive Störungen“ (aKS) ist eine Zusammenführung von 3 Patientengruppen und umfasst insgesamt 30 Patienten. In diese Gruppe wurden Patienten mit subjektiv kognitiven Störungen (SKS), leichten kognitiven Störungen (LKS) und vaskulären Demenzen (VD) eingeordnet (Untergruppen 2a-2c). Bei 5 Patienten wurden die kognitiven Einbußen als Symptome eines depressiven Syndroms eingestuft (Gruppe 3).

Anamneseergebnisse der 30 Probanden			
psychiatrische Anamnese	leer n=29	Angststörung, einmalige Behandlung n=1	
psychiatrische Familienanamnese	leer n=28	Suizidhäufung n=1	Depression n=1
somatische Anamnese	leer n=19	kardiovaskulär art. Hypertonie (n=7) Myocardinfarkt (n=1) Aortenklappenstenose (n=1) KHK (n=2)	endokrinologisch Diabetes mellitus 2 (n=1) Hypothyreose (n=1) Hypercholesterinämie (n=3)
Medikamente	keine n=16	Antihypertensiva ACE-Hemmer (n=7) β-Blocker (n=4) andere Medikamente Nitrate (n=1) Hydrochlorothiazid (n=1) Lipidsenker (n=3) ASS 100 (n=3) Magnesium (n=1)	endokrine Medikamente Antidiabetika (n=1) Thyroxin (n=1) Östrogene (n=2)
Alkoholkonsum	kein n=9	<40g/Tag n=21	>40g/Tag n=0
Nikotinkonsum	kein n=26	<1P./Woche n=2	>1P./Woche n=2

Tab. 6 Anamneseergebnisse in der Kontrollgruppe (n=30): Neben der psychiatrischen Anamnese und Familienanamnese wurde eine ausführliche somatische und Medikamentenanamnese erhoben. Eine zusätzlich bei allen Kontrollen durchgeführte laborchemische Untersuchung zeigte bezüglich der Elektrolyte, der Nieren- und Leberparameter, der Schilddrüsenwerte und des Blutbildes keine Auffälligkeiten.

Anamnestische Daten der Kontrollen

Die gesunde Kontrollgruppe (gK) besteht aus 30 Probanden. Die ausführliche Anamnese mit einem vorgefertigten Bogen ergab bei bis auf 3 Probanden eine unauffällige psychiatrische Anamnese und Familienanamnese (Tab.6). Kein Proband berichtete von dementiellen Erkrankungen in der Familie. Erkrankungen des kardiovaskulären Systems waren Hauptgründe für eine positive somatische Anamnese. 11 von 14 Patienten mit positiver Medikamentenanamnese nahmen antihypertensive Medikamente ein, kein Proband nahm Kalziumantagonisten ein.

Vergleich der Patienten- und Kontrollgruppe anhand ihrer demographischen Daten

Die demographischen Daten der untersuchten Gruppen, dargestellt in Tab.7, zeigen, dass das Durchschnittsalter der Alzheimergruppe mit 70,2 Jahren (Standardabweichung 7,4 Jahre) höher liegt als das der gesunden

Gruppe	Anzahl	Alter	Geschlecht		MMS
			m	w	
Kontrollen (gK)	30	64,2±9,4	11	19	
Patienten					
1. Alzheimer (AD)	22	70,2±7,4	10	12	21,2±4,6
2. andere kognitive Störungen (aKS)	30	64,6±10,2	19	11	26,9±3,5
2a. SKS	15	62,3±11,6	8	7	27,9±2,5
2b. LKS	7	69,4 ± 1,8	6	1	27,1±1,2
2c. VD	8	64,5±11,2	5	3	25,0±5,3
3. Depressive Störung (DS)	5	61,4±7,77	1	4	27,8±1,9
Total	87	65,9±10,0	41	48	25,0±4,7
ANOVA (A), Kruskal-Wallis-Test (K), T-Test (T)		A F=3,199 d.f.=2 p>0,05	K p>0,05		T(aKS, AD) t=5,201, d.f.=56 p<0,005

Tab. 7 Demographische Charakteristika der verschiedenen Testgruppen: Alter (in Jahren; Mittelwert ± Standardabweichung) und Geschlecht (m=Anzahl der Männer, w=Anzahl der Frauen). Die Altersverteilung unterscheidet sich nicht zwischen der Alzheimergruppe, der Gruppe der „anderen kognitiven Störungen“ und den gesunden Kontrollen ($p>0,05$). Die Geschlechterverteilung unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen.

Kontrollgruppe (64,2 Jahre, Standardabweichung 9,4) und das der Gruppe der „anderen kognitiven Störungen“ (aKS-Gruppe: 64,6±10 Jahre). Es war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen bezüglich des Alters nachweisbar (ANOVA: $p > 0,05$).

Das Verhältnis von Frauen zu Männern war in der Alzheimer-Gruppe und der Kontrollgruppe zugunsten der Frauen verschoben, die aKS-Gruppe zeigte einen höheren Männeranteil, statistisch zeigte sich kein Unterschied (Kruskal-Wallis-Test: $p > 0,1$).

Bei den Patienten wurde im Rahmen der diagnostischen Einordnung ein mini-mental-state (MMS) durchgeführt. Die Alzheimer-Patienten erreichten mit einer Durchschnittspunktzahl von 21,2 Punkten statistisch signifikant schlechtere Werte als die Patienten der aKS-Gruppe (26,9 Punkte, T-Test: $t=5,201$; d.f.=2, $p < 0,005$). Normalwerte für gesunde ältere Personen sind 24 bis 30 Punkte.

5.2.2. VERGLEICH DER KALZIUMIONENKONZENTRATION ZU 4 DEFINIERTEN ZEITEN DES KALZIUM-SIGNALS: BASALWERT, INITIALES MAXIMUM, MINIMUM, FINALES MAXIMUM

Die Auswertung der Kurven erfolgte durch den Vergleich der intrazellulären Kalziumionenkonzentration zu definierten Zeiten, deren Mittelwerte und Standardabweichungen in Tabelle 4 dargestellt sind.

Der Basalwert

Der Basalwert, der sich aus der mittleren $[Ca^{2+}]_i$ der ersten 40 sec ergibt, lag bei Patienten und Probanden zwischen 30-100nmol/l. Während die basale $[Ca^{2+}]_i$ der Kontrollgruppe (gK) im unteren Bereich zu finden ist, zeigte die Alzheimergruppe (AD) und die Gruppe der „anderen kognitiven Störungen“ (aKS) einen höheren Basalwert. Der Basalwert der aKS-Gruppe unterschied sich signifikant von dem der Kontrollgruppe (Bonferroni: 5-HT: 95%CI (-36,30 - -2,50); $p < 0,03$; α Me-5-HT: 95%CI (-36,92 - -3,23); $p < 0,03$), zwischen der Alzheimer-Gruppe und den Kontrollen erreichten die Unterschiede keine statistische Signifikanz (Tab.8).

Das initiale Maximum

Die Lymphozyten der Patienten und Probanden aus einer Lymphozytenpräparation wurden bis auf wenige Ausnahmen jeweils mit 5-HT (n=82) und α Me-5-HT (n=79) stimuliert. Das Maximum des initialen

Gruppe	Anzahl		Basalwert		Max _{ini}		Min		Max _{fin}	
	5-HT	αMe-	5-HT	αMe-5-HT	5-HT	αMe-5-HT	5-HT	αMe-5-HT	5-HT	αMe-5-HT
gesunde Kontrollen	30	28	58,1±24,9	57,8±25,7	13,0±5,7	13,0±5,4	5,9±4,8	5,6±5,1	13,1±4,2	12,9±4,7
Alzheimer	22	22	73,6±25,8	74,8±25,7	19,4±9,7	19,8±9,3	9,3±4,7	9,5±6,7	19,5±7,7	19,5±8,8
andere kognitive Störungen	30	29	77,5±29,1	77,9±26,4	15,2±7,6	15,3 ±8,5	6,9±5,1	8,1±4,5	17,8±4,9	17,0±5,3
SKS	15	15	81,9±35,7	79,6±32,0	14,2±7,9	14,6±7,2	6,6±6,0	8,2±3,6	17,8±4,5	18,3±5,7
LKS	7	6	74,0±19,4	73,3±10,8	15,3±5,7	11,8±6,7	7,9±3,5	5,8±6,1	19,1±5,4	14,5±5,2
VD	8	8	72,5±23,4	78,1±25,3	17,1±8,9	18,7±11,1	6,7±5,0	10,0±4,9	16,5±5,8	16,4±4,6
Tota	82	79	69,1±27,2	69,5±26,6	15,6±7,9	15,6±8,3	7,3±5,4	7,3±5,6	16,4±6,2	16,1±6,8
ANOVA		F=	4,3	7,6	4,5	5,0	2,9	4,2	9,6	7,0
		d.f.	2	2	2	2	2	2	2	2
		p	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	n.s.	n.s.	<0,01	<0,01
Bonferroni (B)/ T2-Tamhane (T)			B	B	T	T			T	T
gK und AD (Sig.)			n.s.	n.s.	<0,03	<0,03			<0,01	<0,01
gK und aKS (Sig.)			<0,03	<0,03	n.s.	n.s.			<0,01	<0,01
aKS und AD (Sig.)			n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			n.s.	n.s.

Tab. 8: Die 4 charakteristischen $[Ca^{2+}]_i$ -Werte nach 5-HT und αMe-5-HT - Stimulation (Differenz zwischen Mittelwerten und Basalwerten ± Standardabweichung in nmol/l. Bei der statistischen Auswertung wurde bei Varianzungleichheit (Levene's-Test, $p = 0,10$) statt des Bonferroni-Tests der T2-Tamhane-Test eingesetzt.) Der Basalwert zeigt zwischen Kontrollen (gK) und der Gruppe mit „anderen kognitiven Störungen“ (aKS, mit den Untergruppen subjektive kognitive Störung = SKS, leichte kognitive Störung = LKS, vaskuläre Demenz = VD) signifikante Unterschiede (Basalwert (gK vs. aKS): Bonferroni: 5-HT: 95%CI (-36,30 - -2,50), $p < 0,03$; αMe-5-HT: 95%CI (-36,92 - -3,23), $p < 0,03$). Das initiale Maximum (Max_{ini}) unterscheidet sich statistisch signifikant zwischen Kontrollen und Alzheimer-Patienten (Max_{ini} (gK vs. AD): T2 Tamhane: 5-HT: 95%CI (-12,21 - -0,54), $p < 0,03$; αMe-5-HT: 95%CI (-12,42 - -1,21), $p < 0,03$). Das finale Maximum (Max_{fin}) zeigt zwischen Alzheimer-Patienten und Kontrollen und zwischen der aKS-Gruppe und der Kontrollgruppe signifikante Unterschiede (Max_{fin} (gK vs. AD): T2 Tamhane: 5-HT: 95%CI (-11,02 - -1,87), $p < 0,03$; αMe-5-HT: 95%CI (-11,86 - -1,33), $p < 0,03$; (gK vs. aKS): T2 Tamhane: 5-HT: 95%CI (-7,58 - -1,75), $p < 0,03$; αMe-5-HT: 95%CI (-7,43 - -0,86), $p < 0,03$).

Anstiegs der intrazellulären Kalziumionenkonzentration (Max_{ini}) wurde ungefähr 5-10 sec nach serotonerger Stimulation erreicht. Zur Auswertung wurde die Differenz zwischen dem absoluten initialen Maximum und dem Basalwert gebildet (Max_{ini}). Unabhängig davon, ob mit 5-HT oder mit der selektiveren und metabolisch stabileren Substanz αMe-5-HT stimuliert wurde, war das initiale Maximum abzüglich des Basalwertes (Max_{ini}) in der Alzheimer-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe (T2 Tamhane: 5-HT: 95%CI (-12,21-0,54), $p < 0,03$; αMe-5-HT: 95%CI (-12,42 - -1,21), $p < 0,03$, Tab.8). Die um den Basalwert korrigierten initialen Maximalwerte der aKS-Gruppe zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu den Alzheimer-Patienten keine signifikanten Unterschiede (Abb.13).

Das Minimum

Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration reduzierte sich nach dem initialen Maximum bei allen Gruppen um ca. 50%. Die um den Basalwert

korrigierten Minimalwerte (Min) unterschieden sich allerdings nicht signifikant voneinander und zeigten nur eine Tendenz für höhere Werte in der Patientengruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abb.13).

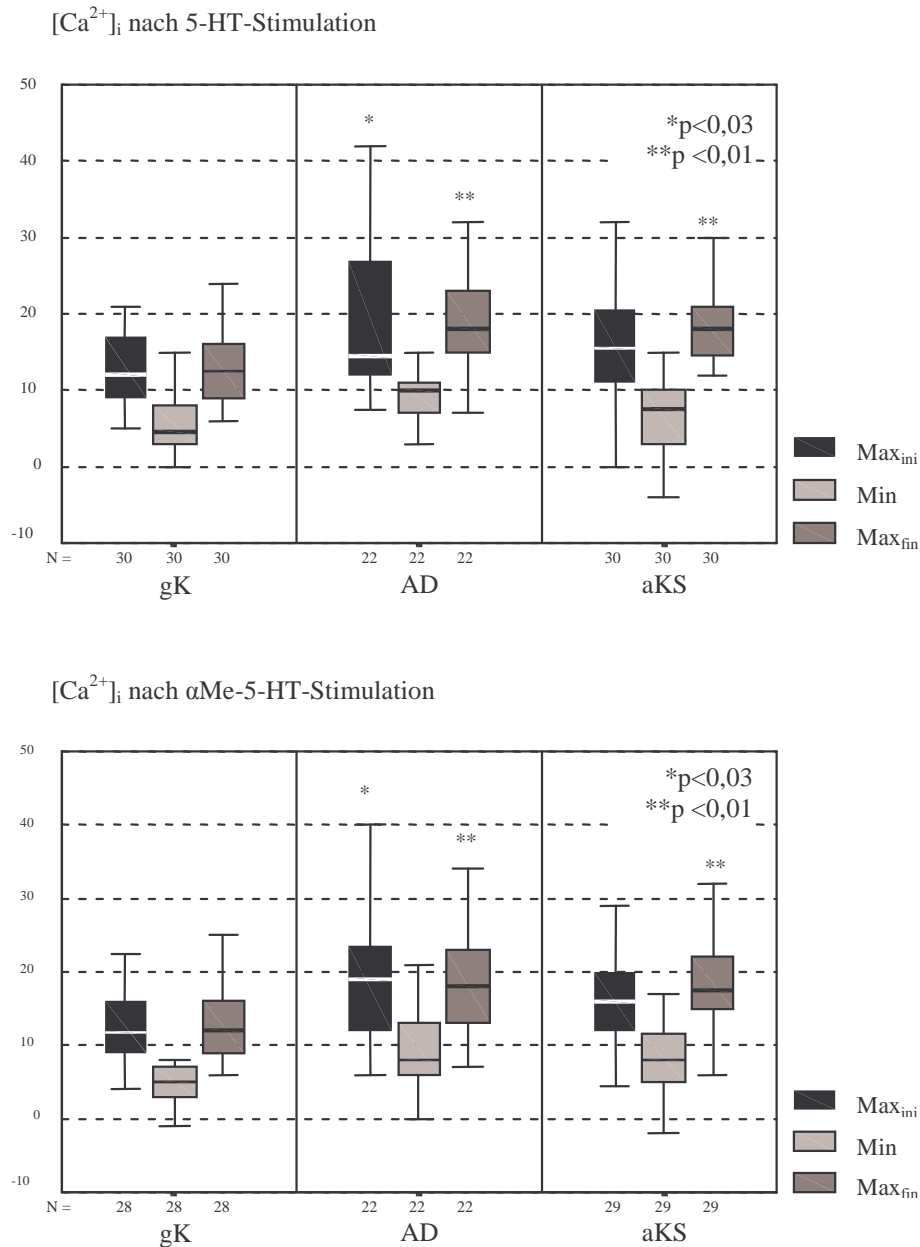


Abb. 13 Max_{ini} , Min und Max_{fin} nach Stimulation mit 5-HT und $\alpha Me-5-HT$ einer Lymphozytenpräparation der Patienten und Probanden: Sowohl das Max_{ini} als auch das Max_{fin} unterschieden sich bei der Alzheimer-Gruppe (AD, 5-HT: $n=22$, $\alpha Me-5-HT$: $n=22$) signifikant von der Kontrollgruppe (gK, 5-HT: $n=30$, $\alpha Me-5-HT$: $n=28$). Dagegen hatte die Gruppe mit anderen kognitiven Störungen (aKS, 5-HT: $n=30$, $\alpha Me-5-HT$: $n=29$) nur ein signifikant erhöhtes Max_{fin} . Im Ergebnis zeigt sich kein Unterschied zwischen den serotonergen Stimulationssubstanzen 5-HT und $\alpha Me-5-HT$.

Das finale Maximum

Die Differenz zwischen dem finalen Maximum (Max_{fin}), das die mittlere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der letzten 10 Sekunden der Messung angibt, und dem Basalwert (Max_{fin}), war sowohl bei den Alzheimer-Patienten als auch in der aKS-Gruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (gK vs. AD: T2 Tamhane: 5-HT: 95%CI (-11,02 - -1,87), $p < 0,03$; $\alpha\text{Me-5-HT}$: 95%CI (-11,86 - -1,33), $p < 0,03$; gK vs. aKS: T2 Tamhane: 5-HT: 95%CI (-7,58 - -1,75), $p < 0,03$; $\alpha\text{Me-5-HT}$: 95%CI (-7,43 - -0,86), $p < 0,03$, Tab.8). Dieser Effekt war wiederum unabhängig davon, ob mit 5-HT oder $\alpha\text{Me-5-HT}$ stimuliert wurde (Abb.13).

5.2.3. VERGLEICH DER KINETIK

Nicht nur die Höhe der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unterschied sich zu den definierten Zeiten zwischen Patienten und Kontrollen, sondern auch bei der kinetischen Auswertung des Kalzium-Signals konnten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt werden (Tab.9).

Sowohl bei der Stimulation mit 5-HT als auch bei $\alpha\text{Me-5-HT}$ -Stimulation gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zeit bis

Gruppe	Anzahl		t_{max}		t_{min}		t_{min}	
	5-HT	$\alpha\text{Me-}$	5-HT	$\alpha\text{Me-5-HT}$	5-HT	$\alpha\text{Me-5-HT}$	5-HT	$\alpha\text{Me-5-HT}$
gesunde Kontrollen	30	28	47,5 \pm 2,8	49,4 \pm 3,1	78,1 \pm 12,7	89,5 \pm 18,9	30,6 \pm 13,3	40,1 \pm 19,9
Alzheimer	22	22	50,0 \pm 4,0	51,0 \pm 4,6	69,1 \pm 10,4	70,7 \pm 8,4	19,2 \pm 8,9	19,6 \pm 7,1
andere kognitive Störungen	29	27	50,6 \pm 7,4	51,0 \pm 4,8	71,0 \pm 14,4	75,5 \pm 12,4	20,3 \pm 13,0	23,7 \pm 13,8
SKS	14	14	49,9 \pm 6,5	51,9 \pm 4,5	73,9 \pm 17,2	78,1 \pm 15,3	24,1 \pm 16,3	23,7 \pm 17,2
LKS	7	5	54,7 \pm 11,5	49,6 \pm 3,6	72,1 \pm 13,2	70,0 \pm 6,2	17,4 \pm 9,4	20,4 \pm 6,9
VD	8	8	48,1 \pm 2,0	50,1 \pm 6,1	63,9 \pm 5,8	74,5 \pm 8,0	15,7 \pm 5,5	26,4 \pm 9,2
Total	81	77	49,3 \pm 5,3	50,4 \pm 4,2	73,2 \pm 13,2	79,5 \pm 16,4	23,9 \pm 9,3	28,7 \pm 17,5
ANOVA	F=					11,5	7,2	13,0
	d.f.		n.s	n..s	n.s.	2	2	2
	p=					<0,001	<0,001	<0,001
Bonferroni (B)/ T2-Tamhane (T)						T	B	T
gK und AD (p=)						<0,001	<0,01	<0,001
gK und aKS (p=)						n.s.	n.s.	<0,01
aKS und AD (p=)						n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 9 Charakterisierung der Kinetik durch 2 wichtige Zeitpunkte: Zeit (in sec) bis zum initialen Maximum (t_{max}) und Zeit bis zum Erreichen des Minimums (t_{min}). Die Differenz von t_{max} und t_{min} ergibt t_{min} . Die Alzheimergruppe (AD) erreichte das Minimum nach dem initialen Maximum signifikant früher als die Kontrollgruppe (gK). Die aKS-Gruppe zeigte nur nach $\alpha\text{Me-5-HT}$ -Stimulation ein signifikant kleineres t_{min} (t_{min} : gK vs. AD: $\alpha\text{Me-5-HT}$: Tamhane T2: 95%CI (8,77- 28,81), $p < 0,001$; t_{min} : gK vs. AD: 5-HT: Bonferroni: 95%CI (2,69 - 20,0), $p < 0,01$; $\alpha\text{Me-5-HT}$: Tamhane T2: 95%CI (10,26- 30,69), $p < 0,001$; t_{min} : gK vs. aKS: $\alpha\text{Me-5-HT}$: Tamhane T2: 95%CI (3,95- 28,91), $p < 0,01$).

zum Erreichen des initialen Maximums (t_{max}).

Wenn man die Zeiten bis zum Minimum (t_{min}) vergleicht, zeigten sich signifikante Unterschiede (Tab.9). Die Alzheimer-Gruppe erreichte das Minimum bei Stimulation mit α Me-5-HT signifikant früher als die Kontrollgruppe (Tamhane T2: 95%CI (8,77- 28,81), $p < 0,001$). Bei der Stimulation mit 5-HT wird eine Signifikanz allerdings nur erreicht, wenn das Zeitintervall t_{min} zwischen initialem Maximum und Minimum verglichen wird (Bonferroni: 95%CI (2,69 – 20,0), $p < 0,01$; für α Me-5-HT: Tamhane T2: 95%CI (10,26- 30,69), $p < 0,001$, Abb.14). Dieses Ergebnis impliziert, dass das Kalzium-Signal bei AD tendenziell später seinen maximalen Wert erreichte. Auch die Patienten mit den aKS erreichten das Minimum früher. Bei der Stimulation mit α Me-5-HT wurde bezüglich t_{min} ein signifikanter Unterschied zwischen der Patientengruppe „aKS“ und Kontrollen festgestellt (Tamhane T2: 95%CI (3,95- 28,91), $p < 0,01$).

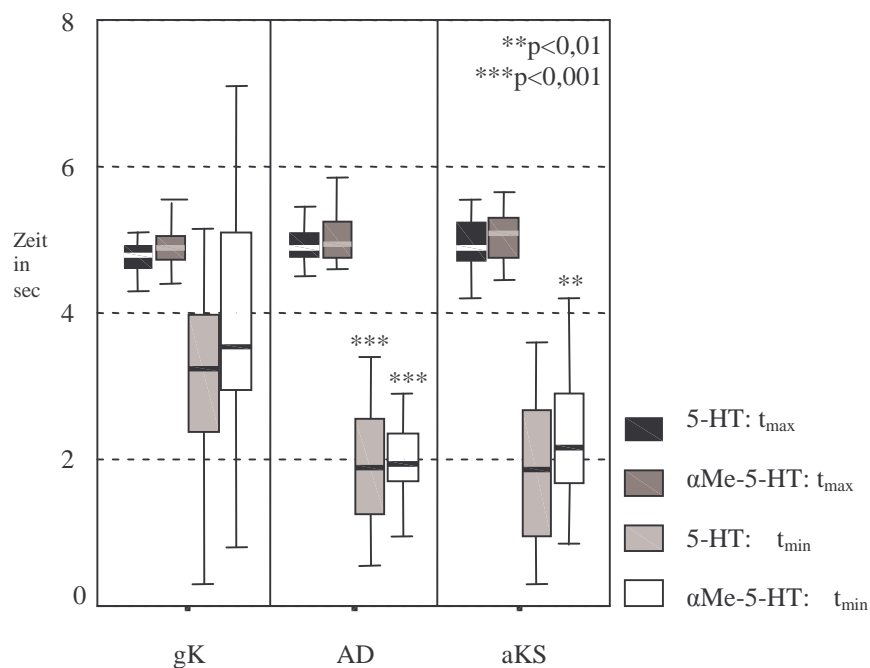


Abb. 14 Darstellung der kinetischen Werte im Boxplot: Zeit (in sec) bis zum initialen Maximum (t_{max}) und t_{min} , das der Zeitdifferenz zwischen t_{max} und der Zeit bis zum Erreichen des Minimums (t_{min}) entspricht. Die Zeitdifferenz t_{min} war in der Alzheimergruppe signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe. Die aKS-Gruppe zeigte nur nach α Me-5-HT-Stimulation ein signifikant kleineres t_{min} (t_{min} : gK vs. AD: 5-HT: Bonferroni: 95%CI (2,69 – 20,0), $p < 0,01$; α Me-5-HT: Tamhane T2: 95%CI (10,26- 30,69), $p < 0,001$; t_{min} : gK vs. aKS: α Me-5-HT: Tamhane T2: 95%CI (3,95- 28,91), $p < 0,01$). Bei dem Vergleich der Zeiten bis zum Erreichen des initialen Maximums (t_{max}) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

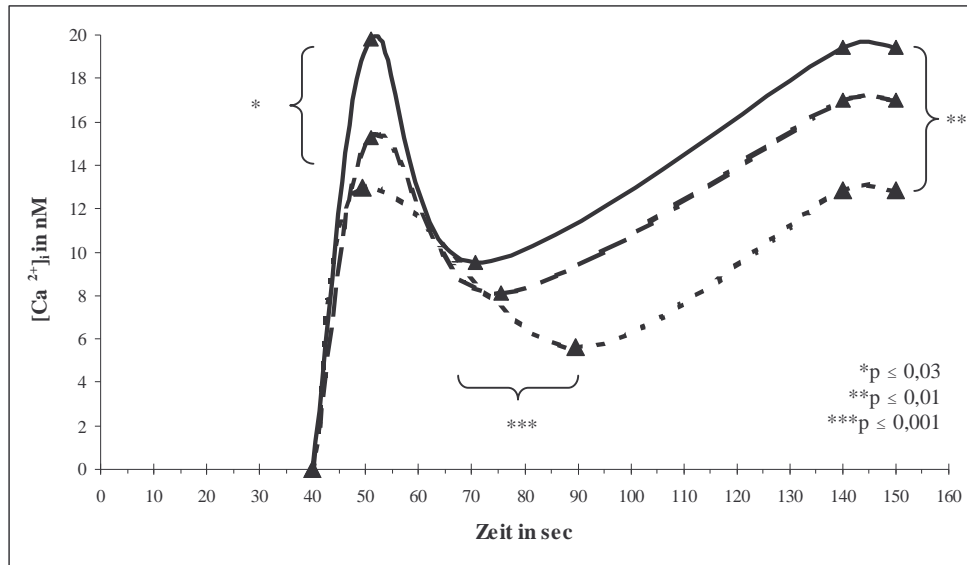


Abb. 15 Schematischer Kurvenverlauf nach Stimulation mit α Me-5-HT bei den verschiedenen Gruppen (AD = durchgezogene Linie, aKS = gestrichelte Linie, gK = gepunktete Linie). Die Kurven wurden aus den charakteristischen (Mittel-)Werten mit den zugehörigen Zeiten erstellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Kurven durch Korrigieren der Werte um den Basalwert übereinandergelegt. Die Alzheimergruppe zeigt einen signifikant höheren initialen Anstieg, erreicht schneller den Minimalwert und hat einen signifikant höheren Endwert (Klammern und Sternchen gelten für den Vergleich des α Me-5-HT-induzierten Anstiegs der intrazellulären Kalziumionenkonzentration zwischen gesunden Kontrollen und Alzheimer-Patienten.).

5.2.4. ZUSAMMENFASSUNG

Das Kalzium-Signal in Lymphozyten von Alzheimer-Patienten zeichnet sich im Vergleich zu den gesunden Kontrollen dadurch aus, dass im Mittel der initiale Anstieg größer ist, nachfolgend das Minimum früher erreicht wird und die $[Ca^{2+}]_i$ am Ende der Messung wiederum erhöht ist. Diese Veränderungen gelten mit Ausnahme des initialen Maximums, das in der Höhe mehr dem Wert der gesunden Kontrollen gleicht, auch für die aKS-Gruppe (Abb.15).

5.3. Der His452Tyr-Polymorphismus des 5-HT2a-Rezeptor-Gen:

Eine veränderte Rezeptorfunktion könnte das Serotonin-induzierte Kalzium-Signal bei Alzheimer-Patienten beeinflussen. Der vermittelnde 5-HT-Rezeptor des Kalzium-Signals auf humanen Lymphozyten ist der 5-HT2a-Rezeptor (siehe Abb. 10 und 11). Neben den vielen möglichen Faktoren, die zu einer Rezeptorfunktionsveränderung führen können, ist der funktionelle Polymorphismus His452Tyr des 5-HT2a-Rezeptorgens interessant, da für diesen Polymorphismus eine Assoziation mit einer veränderten intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung aus dem endoplasmatischen Reticulum beschrieben wurde (Ozaki, Manji et al. 1997).

5.3.1. PATIENTEN UND KONTROLLEN

Um den 5-HT2a-Rezeptor-Genotyp der Patienten und Kontrollen mit den Ergebnissen der Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu assoziieren, wurde bei einer Untergruppe von insgesamt 29 Patienten (15 Alzheimer-Patienten und 14 aus der aKS-Gruppe) und 19 Kontrollen der His452Tyr - Polymorphismus untersucht (Tab.10). Bei der Erhebung der Familienanamnese berichtete keine Kontrollperson von dementiellen oder anderen psychiatrischen Erkrankungen in der Familie. Die Auswahl der Patienten und Kontrollen erfolgte abhängig von deren Bereitschaft zur Teilnahme an genetischen Untersuchungen.

Gruppe mit Genotyp	Anzahl d. Personen	Anzahl der Allele	Allel-Frequenz
Kontrollen	19	38	
Tyr/Tyr	0	Tyr: 4 His: 34	Tyr: 0,11 His: 0,89
His/Tyr	4		
His/His	15		
Patienten	29	58	
Tyr/Tyr	0	Tyr: 5 His: 53	Tyr: 0,09 His: 0,91
His/Tyr	5		
His/His	24		

Tab. 10 Genotypverteilung und Allelfrequenzen bei Kontrollen und Patienten

5.3.2. VERTEILUNG DER ALLEL-FREQUENZEN BEI PATIENTEN UND KONTROLLEN

Neun der 48 untersuchten Personen wiesen das seltenere ⁴⁵²Tyr-Allel auf, davon gehörten fünf der Patienten-Gruppe (n=29) und vier der Kontrollgruppe (n=19) an (Tab.10).

Wenn man trotz der geringen Fallzahl die Allelfrequenz berechnet, ergibt sich eine Frequenz für das ⁴⁵²Tyr-Allel von $f = 0,11$ bei der Kontrollgruppe und $f = 0,09$ bei den Patienten (Tab.6). Für das häufigere His-Allel lässt sich dementsprechend eine Frequenz von $f = 0,89$ in der Kontrollgruppe und $f = 0,91$ in der Patientengruppe errechnen. Die Ergebnisse entsprechen den zuvor publizierten Daten in der Literatur (Erdmann, Shimron-Abarbanell et al. 1996). Aufgrund der geringen Fallzahl wurden keine statistischen Unterschiede in der Allelfrequenz und der Genverteilung zwischen Patienten und Kontrollen berechnet.

Tab. 11 Vergleich des 5-HT-induzierten Kalzium-Signals bei Patienten und Kontrollen mit den Genotypen His/His und His/Tyr: Basalwert (basal), initiales Maximum (Max_{ini}), Zeit bis zum initialen Maximum (t_{max}), Minimum (Min), Zeit bis zum Minimum (t_{min}) und finales Maximum (Max_{fin}), Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung. Nur in der Patientengruppe fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen im initialen Maximum und im nachfolgenden Minimum mit einem signifikant höheren Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach 5-HT bzw. α Me5-HT-Stimulation bei Patienten mit dem Tyr-Allel (t-Test: 5-HT: Max_{ini} $t = -2,429$; d.f. 26; $p < 0,03$; α Me5-HT: Max_{ini} $t = -2,356$; d.f.=27; $p < 0,03$; Min: $t = -2,718$; d.f.=24; $p < 0,03$ Im statistischen Vergleich der anderen Werte fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

Kontrollen	His/His	His/Tyr	Patienten	His/His	His/Tyr
basal			basal		
5-HT	67,7 \pm 23,8	65,3 \pm 41,4	5-HT	76,4 \pm 31,5	105,0 \pm 22,7
α Me-5-HT	66,2 \pm 23,5	69,8 \pm 47,3	α Me-5-HT	75,4 \pm 29,3	97,0 \pm 18,9
Max_{ini}			Max_{ini}		
5-HT	11,8 \pm 4,8	12,6 \pm 6,8	5-HT	15,6 \pm 8,5	27,8 \pm 14,0
α Me-5-HT	11,8 \pm 4,2	12,3 \pm 7,0	α Me-5-HT	15,5 \pm 7,3	24,6 \pm 10,4
t_{max}			t_{max}		
5-HT	46,4 \pm 2,8	47,3 \pm 0,9	5-HT	50,7 \pm 5,8	48,3 \pm 2,8
α Me-5-HT	48,9 \pm 3,1	48,6 \pm 2,9	α Me-5-HT	51,7 \pm 5,1	51,5 \pm 2,5
Min			Min		
5-HT	4,2 \pm 3,2	5,8 \pm 2,5	5-HT	8,0 \pm 5,9	8,5 \pm 7,3
α Me-5-HT	3,8 \pm 2,3	3,0 \pm 3,7	α Me-5-HT	7,3 \pm 3,0	12,6 \pm 6,9
t_{min}			t_{min}		
5-HT	32,1 \pm 12,5	32,0 \pm 15,8	5-HT	21,8 \pm 13,6	16,3 \pm 6,6
α Me-5-HT	45,9 \pm 22,7	35,3 \pm 17,3	α Me-5-HT	21,6 \pm 12,3	15,6 \pm 4,6
Max_{fin}			Max_{fin}		
5-HT	11,1 \pm 3,6	13,3 \pm 5,0	5-HT	18,5 \pm 6,2	18,0 \pm 7,4
α Me-5-HT	10,1 \pm 3,5	13,8 \pm 4,9	α Me-5-HT	18,5 \pm 6,3	19,8 \pm 6,5

5.3.3. ASSOZIATION DES DURCH 5-HT AUSGELÖSTEN KALZIUM-SIGNALS MIT DEM 5-HT-REZEPTOR-GENOTYP

Statistischer Vergleich der Mittelwerte

Die mittlere intrazelluläre Kalziumionenkonzentration zu den definierten Zeiten (Basalwert, initiales Maximum, Minimum, finales Maximum) und die Kinetik des Kalzium-Signals (Zeit bis zum initialen Maximum, Zeit bis zum Minimum) wurden innerhalb der Patienten- bzw. Probandengruppe zwischen den Personen mit dem His/His-Genotyp und dem His/Tyr-Genotyp verglichen. Zu den Punkten gehören der, das, die, das, die und das (Tab.11).

Während bei den gesunden Kontrollen keine Unterschiede zwischen den Genotypen festzustellen waren, fielen bei den Patienten statistisch zu erfassende Unterschiede auf. Patienten mit dem His/Tyr-Genotyp zeigten jeweils abzüglich des Basalwerts sowohl ein signifikant höheres initiales Maximum (Max_{ini}) als auch ein signifikant höheres Minimum (Min) als Patienten mit dem His/His-Genotyp (jeweils t-Test, $p < 0,03$) (Abb.16). Die Unterschiede beim Minimum zeigten aber nur eine Signifikanz bei der Stimulation mit dem chemisch stabileren und selektiveren 5-HT-Agonisten α Me5-HT, während nach der Stimulation mit 5-HT diese Unterschiede nur

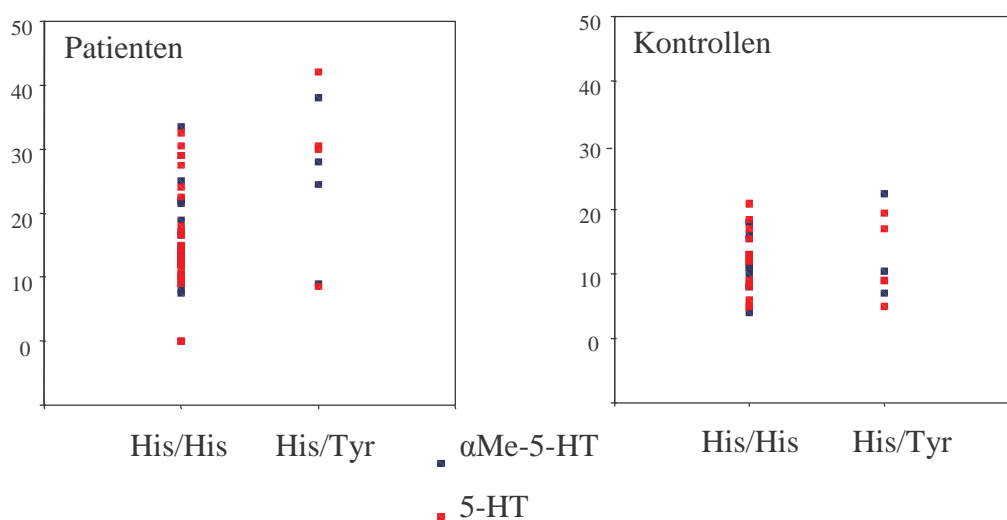


Abb. 16 Darstellung der Höhe des initialen Maximums ($[Ca^{2+}]_i$ in nmol/l) bei Patienten und Kontrollen mit dem His/His-Genotyp bzw. His/Tyr-Genotyp. Während bei den Kontrollen kein Unterschied zwischen den Genotypen festzustellen war, war bei den Patienten mit dem His/Tyr-Genotyp das initiale Maximum signifikant höher als das der Patienten mit dem His/His-Genotyp (t-Test: 5-HT: Max_{ini} : $t = -2,429$; d.f. 26; $p < 0,03$; α Me5-HT: Max_{ini} : $t = -2,356$; d.f. = 27; $p < 0,03$).

in der Tendenz nachzuvollziehen waren. Der Basalwert, die Kinetik (Zeit bis zum Erreichen des initialen Maximums (t_{\max}) und des Minimums (t_{\min})) und das finale Maximum (Max_{fin}) unterschieden sich in ihren Mittelwerten auch in der Patientengruppe nicht zwischen den Genotypen His/His und His/Tyr.

Morphologie des Kalzium-Signals der Patienten und Probanden

Aufgrund der geringen Fallzahlen sind zum Einzelfallvergleich die Kurven der Patienten (n=5) und Probanden (n=4) mit dem ⁴⁵²Tyr-Allel in Abbildung 17 dargestellt. Bis auf eine Patientin (84 J., MMS = 26) zeigten alle Patienten mit dem ⁴⁵²Tyr-Allel einen deutlichen raschen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach serotonerger Stimulation um durchschnittlich 25 nmol/l (Abb.17A-E). Bei den Kontrollen mit dem ⁴⁵²Tyr-Allel fiel der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ geringer aus (ca. 15nmol/l) und die Kurven zeigten keinen typischen Kurvenverlauf. Es fehlte ein deutliches Minimum und ein zweiter anhaltender Anstieg (Abb.17F-I). Vielmehr scheint die serotonerge Stimulation die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration der Kontrollen nicht nachhaltig zu beeinflussen. Die nicht abgebildeten Kurven der Patienten (n=24) und Probanden (n=15) mit dem His/His-Genotyp glichen am ehesten den Kurven der Kontrollen mit dem His/Tyr-Genotyp.

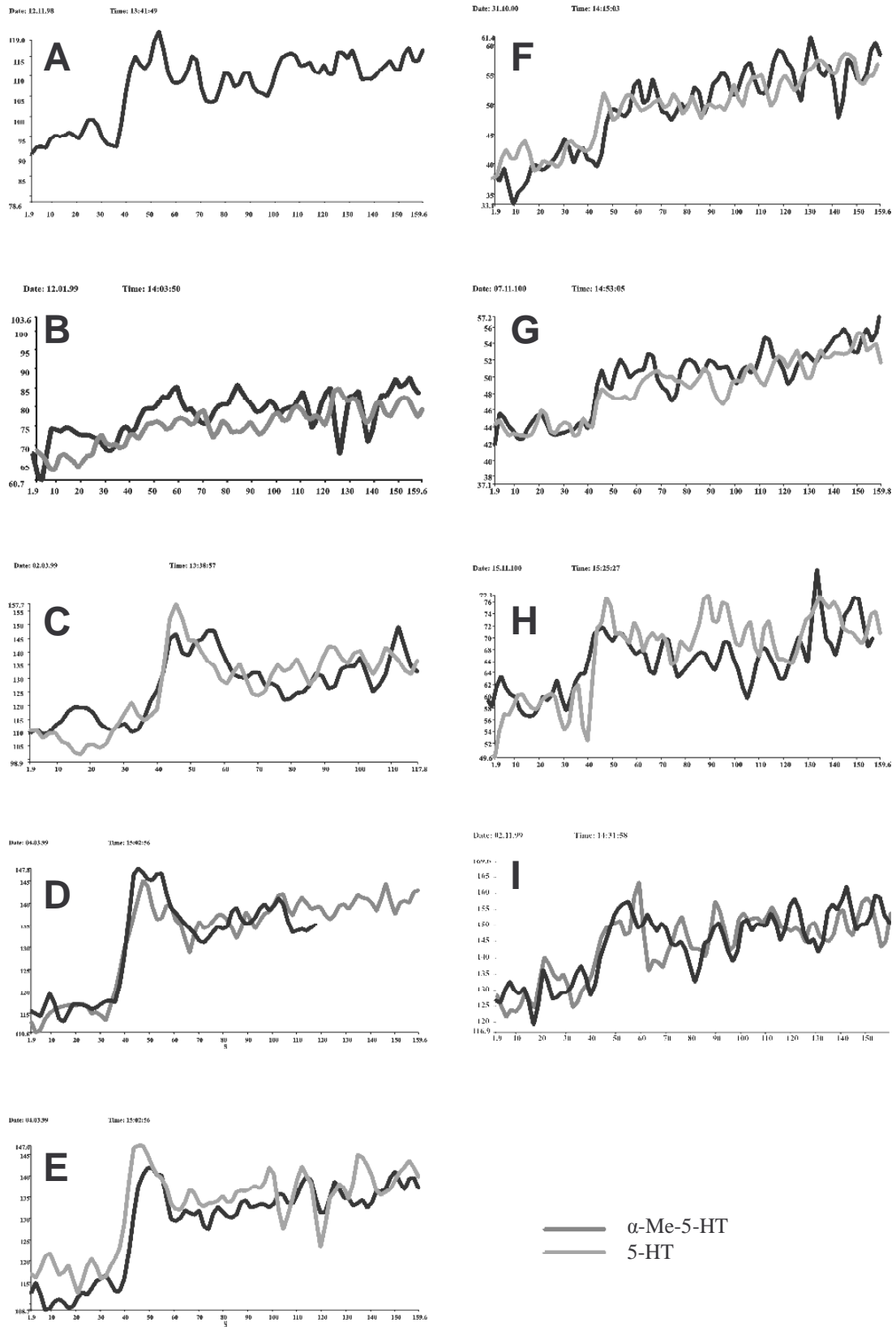


Abb. 17 Die Kalziumkurven der 5 Patienten (A-E) und der 4 Kontrollen (F-I) mit dem Tyr-Allel. Bis auf die einer Patientin zeigten die Kurven deutliche initiale Anstiege der intrazellulären Kalziumionenkonzentration um ca. 25nmol/l, während die gesunden Kontrollen mit dem Tyr-Allel einen geringeren Anstieg um nur durchschnittlich 15 nmol/l zeigten.

6. Diskussion

6.1. Lymphozyten als Modell für zelluläre degenerative Prozesse des zentralen Nervensystems (ZNS)

Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden an humanen Blutzellen durchgeführt, den immunologisch aktiven Lymphozyten.

Lymphozyten haben neben ihrer Hauptaufgabe der Körperabwehr die Funktion eines Effektorsystems in den Interaktionen zwischen Neuroendokrinium und Immunsystem. Sie sind in diesem Zusammenhang selbst neuroendokrine Zellen, da Hormone und klassische Neurotransmitter der neuroendokrinen Systeme, zum Beispiel Serotonin und Cortisol, an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche oder in der Zelle binden und die Zellaktivität modulieren (Hellstrand und Hermodsson 1987). Umgekehrt können Zytokine und andere Produkte der Lymphozyten die Funktion und Aktivität anderer neuroendokriner Zellen modifizieren (Carr und Weigent 1989). Aufgrund dieser vielfältigen Interaktionsfähigkeiten mit neuronalen Zellen werden Lymphozyten von einigen Autoren als „mobiles immunologisches Gehirn“ mit perzeptiven Aufgaben bezeichnet (Blalock 1994; Weigent und Blalock 1995; Greger und Windhorst 1996, S. 1711). Die Interaktionen zwischen den neuronalen, endokrinen und immunologischen Funktionen sind physiologisch wichtig, um die adäquate Adaptation des Organismus an physiologische und pathologische Veränderungen der Umwelt und des Körpers zu gewährleisten.

Mehrere Autoren wiesen darauf hin, dass degenerative Prozesse, wie sie in neuronalen Geweben im Alter und unter pathologischen Bedingungen beschrieben sind, sich in vergleichbarer Weise in nicht ZNS-ständigen, d.h. „peripheren“ Zellen wie Fibroblasten, Lymphozyten oder Thrombozyten abspielen. Auch die Veränderungen, die man in neuronalen Zellen von Patienten mit M. Alzheimer (AD) gezeigt hat, konnten in peripheren Geweben und Zellen dieser Patienten nachgewiesen werden (Peterson 1992, Bosman, Bartholomeus et al. 1991; Schlossmacher, Ostaszewski et al. 1992; Karlsson, Blennow et al. 1995). In diesen Arbeiten wurden periphere Zellen, darunter auch zirkulierende Lymphozyten, als Modell für degenerative Prozesse des zentralen Nervensystems (ZNS) vorgeschlagen.

Im Alter und bei AD gibt es Hinweise auf Veränderungen des Immunsystems und der Lymphozyten. Die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke lässt nach, sodass periphere aktivierte Lymphozyten leichter ins ZNS eintreten können (Hampel, Mullerspahn et al. 1995) und das ZNS eine erhöhte Vulnerabilität für Produkte der peripheren Immunzellen besitzt.

Während im Alter sowohl die Anzahl an Lymphozyten als auch die Mitogen-induzierte Proliferation abnimmt (Peterson 1992), findet man bei Alzheimer-Patienten eine erhöhte Stimulierbarkeit der Lymphozyten zur Proliferation durch Mitogene (Song, Vandewoude et al. 1999), andererseits eine Abnahme der Proliferation nach β -Amyloid-Exposition (Trieb, Ransmayr et al. 1996). Es kommt zu Erhöhungen von proinflammatorischen Interleukinen (Bonaccorso, Lin et al. 1998).

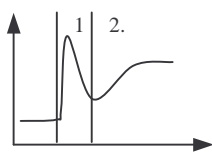
Lymphozyten besitzen in der $[Ca^{2+}]_i$ -Homöostase Ähnlichkeiten mit neuronalen Zellen. Neben dem Vorhandensein von Ca^{2+} -Speicherorganellen, Ca^{2+} -ATPasen, Na^+ - Ca^{2+} -Austauschern und Ca^{2+} -bindenden Proteinen (Miller 1994; Peterson 1992) sind auch Strukturen in Lymphozyten nachweisbar, die für erregbare Zellen typisch sind. Dazu gehört der „hirnspezifische“ Ryanodin-Rezeptor (Hakamata, Nishimura et al. 1994), spannungsabhängige und Ca^{2+} -abhängige Kalium-Kanäle (Attali, Honore et al. 1992; Fanger, Hoth et al. 1995).

Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass Lymphozyten als Modell zur Untersuchung einiger zellulärer degenerativer Prozesse, die im zentralen und peripheren Geweben in vergleichbarer Weise ablaufen, geeignet sind.

Im Gegensatz zu Hirngewebe, das entweder postmortal oder bioptisch gewonnen werden muss, kann man durch Venenpunktion Lymphozyten erhalten. Diese Technik ist einfacher und atraumatischer als die Gewinnung und Präparation von Fibroblasten, sodass die Nutzung von Lymphozyten eine bessere Standardisierung der Techniken zulässt (Eckert, Forstl et al. 1996). Bei Versuchen mit frischen Lymphozyten hat man keine Probleme mit unterschiedlichen Zellzyklen, die für widersprüchliche Ergebnisse bei Versuchen mit Fibroblasten verantwortlich sein könnten (Chen, Corbley et al. 1988). Nicht nur die Einfachheit in der Gewinnung des Untersuchungsmaterials machen periphere Modelle wertvoll, sondern auch

die Möglichkeiten, postmortale Studien in einem vitalen System zu reproduzieren, neue pathophysiologische Zusammenhänge auch stadienabhängig aufzudecken und intravitale und eventuell auch diagnostische Marker zu entdecken.

6.2. Der 5-HT_{2a}-Rezeptor auf humanen Lymphozyten



Nach Stimulation der Lymphozyten mit Serotonin (5-HT) konnte ein Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) aufgezeichnet werden. Man konnte in diesem Signal zwei Phasen voneinander abgrenzen, eine erste, die einen steilen Anstieg der Kalziumionenkonzentration beinhaltet und eine zweite, die einen zweiten anhaltenden Konzentrationsanstieg zeigte. Dieser Verlauf ähnelte den Rezeptor-medierten Verläufen, die andere Arbeitsgruppen zeigen konnten (Braiman, Goldstein et al. 2000).

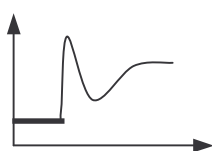
Die Typisierung des Rezeptors, der das 5-HT-induzierte Kalzium-Signal vermittelt, ließ sich durch eine Inkubation mit verschiedenen 5-HT-Antagonisten vor der Stimulation mit 5-HT eingrenzen. Der 5-HT₂-Antagonist Risperidon und der selektive 5-HT_{2a}-Antagonist Ketanserin blockierten das Signal vollständig. Andere Substanzen, die spezifisch 5-HT₁, 5-HT₃ oder 5-HT₄-Rezeptoren blockieren, konnten den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nicht verhindern (s. Abb.10, S.51).

In der Literatur findet man unterschiedliche Angaben zu serotonergen Rezeptoren auf Lymphozyten, die unter anderem durch methodische Differenzen zu erklären sind. Dass der 5-HT₂-Rezeptor in Lymphozyten funktionelle Bedeutung besitzt, zeigen Versuche, in denen 5-HT₂-Rezeptorantagonisten die Typ IV Immunreaktion unterdrücken (Ameisen, Meade et al. 1989). Allerdings konnten in anderen Versuchsansätzen andere 5-HT-Rezeptoren nachgewiesen werden, zum Beispiel der 5-HT_{1a}-Rezeptor auf aktivierten humanen T-Lymphozytenlinien (Aune, McGrath et al. 1993). Dieser soll wie der 5-HT_{2a}-Rezeptor zu einem IP₃-abhängigen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führen. Der 5-HT_{1a}-Rezeptor wurde auch auf Lymphozyten von HIV-positiven Patienten entdeckt (Eugen-Olsen, Afzelius et al. 1997).

Durch die pharmakologische Bestimmung des 5-HT-Rezeptortyps in dieser Arbeit kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich andere 5-HT-Rezeptortypen außer dem 5-HT_{2a}-Rezeptor auf der Lymphozytenmembran befinden. Zum einen ist ein Vorkommen von Rezeptoren möglich, die kein messbares Kalzium-Signal vermitteln und zum anderen serotonerge Rezeptoren, die sich aus Mangel an selektiven Antagonisten nicht pharmakologisch ausschließen ließen. Dazu gehören besonders der 5-HT_{2b}-Rezeptor und die 5-HT₅-, 6-, und 7 – Rezeptoren. Dennoch erlaubt die Tatsache, dass Ketanserin die Fähigkeit besitzt, das Kalzium-Signal bereits bei einer Konzentration von 25nmol/l vollständig zu blockieren, den Schluss, dass für den 5-HT-induzierten Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration in einer gemischten Lymphozytensuspension funktionell ausschließlich der 5-HT_{2a}-Rezeptor relevant ist.

Die 5-HT₂-Rezeptoren gehören zu der G-Protein-Rezeptorfamilie, bei der die Stimulation über die Aktivierung der Phospholipase C zu einer Bildung von Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) führt (Martin und Humphrey 1993). IP₃ bindet an IP₃-Rezeptoren des endoplasmatischen Reticulums (ER) und bedingt den raschen initialen Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ (1.Phase) (Finch, Turner et al. 1991). In der vorliegenden Arbeit reduzierte sich die erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ innerhalb von 120 sec nicht auf die Ausgangskonzentration, sondern stieg meist nach einem kurzen Abfall nochmals leicht an. Die anhaltend erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ oder der zweite leichte Anstieg deuten auf eine Öffnung von membranständigen Kalzium-Kanälen und auf einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum hin. Dieser Ca^{2+} -Einwärtsstrom wird I_{crac} (Strom (I) calcium-release-activated) oder kapazitiver Kalziumionen-Einstrom (CCE) genannt (2.Phase) (Chow und Jondal 1990; Hoth und Penner 1992). Der CCE wird durch eine Verarmung an Ca^{2+} im ER ausgelöst und führt über eine vorübergehend erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ zu einer Auffüllung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher.

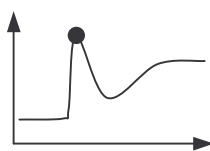
6.3. Die basale Kalziumionenkonzentration



In den Lymphozyten der Alzheimer-Patienten lag die basale $[Ca^{2+}]_i$ tendenziell höher als in der

Kontrollgruppe, ohne einen signifikanten Unterschied zu erreichen. Diese diskrete Erhöhung zeigt sich in anderen Arbeiten durch unterschiedliche Ergebnisse mit erhöhten (Adunsky, Baram et al. 1991; Ibarreta, Parrilla et al. 1997) oder tendenziell erhöhten (Hartmann, Eckert et al. 1994) Werten oder mit Basalwerten, die sich nicht zwischen den Gruppen unterschieden (Bondy, Klages et al. 1994; Eckert, Förstl et al. 1997; Sulger, Dumais-Huber et al. 1999). Die Größenordnung von 30-100nmol/l, in der sich die basale $[Ca^{2+}]_i$ bewegt, ist nicht auffällig. Aus dieser Tendenz zu höheren basalen Kalziumionenkonzentrationen lässt sich am ehesten eine allgemeine Veränderung der Kalzium-Homöostase ableiten. Pathophysiologische Auswirkungen erscheinen unwahrscheinlich.

6.4. Das initiale Maximum des Kalzium-Signals



Das initiale Maximum des Kalzium-Signals nach 5-HT und α Me-5-HT-Stimulation war bei der Alzheimer-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Diese Erhöhung des Kalzium-Signals nach serotonerger Stimulation kann einerseits durch eine Hochregulation des 5-HT_{2a}-Rezeptors zustande kommen und andererseits durch eine verstärkte IP₃-abhängige Freisetzung von Kalziumionen aus dem endoplasmatischen Reticulum bedingt sein. Während die Stimulation von Lymphozyten mit 5-HT bei Alzheimer-Patienten in dieser Arbeit erstmals gezeigt wurde, gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen, in denen Lymphozyten mit verschiedenen anderen Substanzen stimuliert wurden. Die Ergebnisse sind uneinheitlich, sie zeigen ein verstärktes Signal in Fibroblasten nach Stimulation mit Bradykinin und Bombesin (Hirashima, Etcheberrigaray et al. 1996), die nach Bindung an ihre Rezeptoren über IP₃ zu einer Kalziumionenfreisetzung führen. Beim Vergleich zwischen Alzheimerpatienten und Kontrollen zeigte eine Gruppe einen verstärkten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit PHA in Lymphozyten (Adunsky, Baram et al. 1991; Adunsky, Diver-Haber et al. 1995) und andere ein unverändertes Kalzium-Signal nach der Stimulation mit Mitogenen in Lymphozyten (Eckert, Förstl et al. 1993; Bondy, Klages et al. 1994; Hartmann, Eckert et al. 1994; Bondy, Hofmann et al. 1995; Eckert, Förstl et al. 1997).

Dass das Kalzium-Signal nach serotonerger Stimulation in AD stärker war als in der Kontrollgruppe steht im Widerspruch zu Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen, die zum einen den Verlust von Serotoninbindungsstellen im Cortex des Gehirns feststellen konnten (Cross, Crow et al. 1984; Crow, Cross et al. 1984) und zum anderen eine Verminderung der Funktion von Serotoninrezeptoren in Form von Signaltransduktionsstörungen zeigten. Es handelt sich bei diesen Störungen um Entkopplungen der jeweils nachgeschalteten Einheiten in der Signalkaskade, die sich unter anderem in einer Rezeptor-G-Protein Entkopplung, einer Störung der Rezeptor/G-Protein-Aktivierung von Phospholipase C und der Funktion des IP3 zeigen (Cowburn, Fowler et al. 1996).

Diese Diskrepanz wirft die Frage auf, ob man postmortale Untersuchungen an Zellen des ZNS mit Untersuchungen an peripheren Zellen des Immunsystems vergleichen kann. Die Verwendung eines peripheren Modells zur Untersuchung von Prozessen im ZNS könnte die widersprüchlichen Ergebnisse in den Untersuchungen zur Signaltransduktion und dem erhöhten Kalzium-Signal nach serotonerger Stimulation erklären. Zudem lassen sich weitere methodische Unterschiede zwischen den peripheren und zentralen post mortem durchgeführten Untersuchungen für die Diskrepanz der Ergebnisse verantwortlich machen. Die Patienten werden in verschiedenen Stadien ihrer Erkrankung erfasst, zu einem früheren Zeitpunkt bei den peripheren Zellen, die man durch Blutentnahme gewinnt und zu einem späteren Zeitpunkt bei den postmortalen Untersuchungen. Auch können sekundäre degenerative Effekte durch prämortale Agonie oder durch postmortale Veränderungen die Ergebnisse der postmortalen Studien beeinflussen.

Die uneinheitlichen Ergebnisse bei den Untersuchungen mit peripheren und zentralen Zellen könnten aber auch durch die verschiedenen Stimulationssubstanzen zustande kommen. Diese Überlegung spräche für eine spezifische Veränderung der serotonergen Signaltransduktion und nicht der Signaltransduktion anderer Systeme, in denen es über andere Stimuli und Rezeptoren zu einer IP3-abhängigen Kalziumionenfreisetzung kommt.

Zusammenfassend gibt das erhöhte Kalzium-Signal nach serotonerger Stimulation somit Hinweise auf eine erhöhte Sensitivität der IP₃-abhängigen Kalziumionenfreisetzung vor allem in Anbetracht von Studien, die nach IP₃-induzierenden Stimuli eine erhöhte Kalziumionenfreisetzung bei AD zeigten (Hirashima, Etcheberrigaray et al. 1996). Zusätzlich könnte aber auch eine spezifische Veränderung der serotonergen Signaltransduktion mit einer Hochregulierung des 5-HT_{2a}-Rezeptors Ursache des verstärkten Kalzium-Signals nach serotonerger Stimulation sein. In den folgenden Abschnitten werden einige Punkte, die für eine Hochregulierung des 5-HT_{2a}-Rezeptors sprechen oder in diesem Falle von Bedeutung sind, benannt.

6.4.1. GENETISCHE FAKTOREN FÜR EIN ERHÖHTES KALZIUM-SIGNAL NACH SEROTONERGER STIMULATION

Genomische Variationen von DNA-Sequenzen in Form von Punktmutationen können mit signifikanten Unterschieden in Signaltransduktionsprozessen (Dobrev, Wettwer et al. 2000), mit psychiatrischen Symptomen (Nacmias, Tedde et al. 2001) und medikamentösen Therapieerfolgen assoziiert werden (Maitland-van der Zee, Klungel et al. 2002).

Bei dem 5-HT_{2a}-Rezeptor-Gen, einer der ersten klonierten Gene aus der Gruppe der serotonergen Rezeptorgene, konnten zwei natürlich vorkommende Punktmutationen identifiziert werden, der seltenere Ala447Val-Polymorphismus und der His452Tyr-Polymorphismus mit einer Allelfrequenz des selteneren Allels (⁴⁵²Tyr) von 10% (Erdmann, Shimron-Abarbanell et al. 1996). Ozaki et al. konnten die Funktionalität des His452Tyr-Polymorphismus in Form einer Veränderung des 5-HT induzierten Kalzium-Signals in Thrombozyten einer kleinen Population von Patienten mit saisonaler affektiver Störung zeigen (Ozaki, Manji et al. 1997). Das ⁴⁵²Tyr Allel war assoziiert mit einem geringeren initialen Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration, einer größeren Latenz bis zum Maximum dieses Anstiegs und einer verlängerten Halbwertszeit (HWZ).

In der vorliegenden Arbeit konnten bei den Kontrollen keine Unterschiede in dem 5-HT-induzierten Kalzium-Signal zwischen den

Genotypen His/His (n=15) und His/Tyr (n=4) festgestellt werden. Leider kann aufgrund der geringen Fallzahl ein Effekt im Sinne der Ergebnisse von Ozaki et al. nicht ausgeschlossen werden. Es ist aber möglich, dass der von Ozaki et al. beschriebene Effekt auf Patienten mit affektiven Störungen beschränkt ist.

Interessanterweise war bei den Patienten mit dementiellen Symptomen der His/Tyr-Genotyp im Gegensatz zu den Kontrollen mit einem signifikant höheren initialen Maximum assoziiert. Die gegenteiligen Veränderungen in der Kalzium-Homöostase zwischen den Alzheimer-Patienten und den depressiven Patienten von Ozaki et al. mit dem His/Tyr-Genotyp deuten darauf hin, dass es krankheitsspezifische Veränderungen gibt, die durch den Polymorphismus ausgelöst werden können (Ozaki, Manji et al. 1997). Dieses Phänomen wurde zum Beispiel auch von Holmes et al. festgestellt, die nur bei Alzheimer-Patienten eine Assoziation von Symptomen mit Mutationen feststellen konnten, während bei anderen Patientengruppen der Effekt nicht nachgewiesen werden konnte (Holmes, Arranz et al. 1998). Der His452Tyr-Polymorphismus scheint somit einen gegenteiligen Effekt bei depressiven Patienten und Demenzpatienten hervorzurufen. Um diese These zu belegen muss allerdings ein direkter Vergleich zwischen den Patientengruppen in einer größeren Population durchgeführt werden.

Wie auch in der Arbeit von Ozaki et al. (Ozaki, Manji et al. 1997) wurden keine Patienten gefunden, die homozygot für das seltenere ⁴⁵²Tyr-Allel waren. Diese Tatsache schränkt die Aussage der Ergebnisse weiter ein bzw. kann leider durch mögliche deutlichere Veränderungen die These nicht stützen. Ob der His452Tyr-Polymorphismus zu dem bei den Alzheimer-Patienten nachzuweisenden erhöhten initialen Maximum beiträgt, muss mit einer höheren Patientenzahl und unter Ausschluss anderer wichtiger Faktoren in weiteren Untersuchungen geprüft werden.

Die Allelfrequenz von 10% für das seltenere ⁴⁵²Tyr-Allel sowohl bei Patienten als auch bei Probanden gibt keinen Anhaltspunkt dafür, dass die Verteilung der Genotypen sich unterscheidet und entsprechen denen der Literatur (Erdmann, Shimron-Abarbanell et al. 1996; Minov, Baghai et al. 2001).

6.4.2. GESTEIGERTE SEROTONERGE SIGNALTRANSDUKTION UND DEPRESSIVE BZW. KOGNITIVE SYMPTOME BEI AD

Eine gesteigerte serotonerge Signaltransduktion über 5-HT_{2a}-Rezeptoren könnte sowohl die depressiven als auch die kognitiven Symptome bei AD beeinflussen.

Kognitive Symptome

Eine erhöhte Empfindlichkeit der serotonergen Transmission, besonders des 5-HT_{2a}-Rezeptors, kann auch die kognitiven Symptome bei AD beeinflussen. Untersuchungen weisen darauf hin, dass durch eine Stimulierung des 5-HT_{2a}-Rezeptors sowohl peripher als auch zentral die Freisetzung einer Reihe anderer Neurotransmitter und Hormone moduliert werden kann. Dazu gehört die Ausschüttung von Acetylcholin (Muramatsu, Tomaki-Ohashi et al. 1988), Adrenalin (Feniuk, Hare et al. 1998), Dopamin (Muramatsu, Tomaki-Ohashi et al. 1988), exzitatorischen Aminosäuren wie Glutamat (Maura, Roccatagliata et al. 1988), Vasopressin, Cortison, Luteinisierungshormon und Prolactin (Hoyer, Clarke et al. 1994).

Andere Studien konnten einen direkten anticholinergen Einfluss des serotonergen Systems über 5-HT_{2a}-Rezeptoren auf das Lernen und das Gedächtnis feststellen. Auch wenn eine allgemeine Depletion an Serotonin Lernen und Gedächtnis einschränkt (Nilsson, Strecker et al. 1988; Richter-Levin und Segal 1989), kann in einigen Arbeiten eine selektive Blockierung des 5-HT_{2a}-Rezeptors, die cholinerge Transmission (Muramatsu, Tomaki-Ohashi et al. 1988) oder das Lernen verbessern (Meneses 1998).

Eine veränderte serotonerge Signaltransduktion könnte somit sowohl direkte Auswirkungen auf das Lernen und das Gedächtnis haben als auch indirekt über cross-talks mit dem cholinergen System diese Prozesse beeinflussen.

Depressive Symptome

Die Noradrenalin-Serotonin-Mangelhypothese bei der Depression findet seit der Aufklärung des Wirkmechanismus der Antidepressiva auf die Monoamine breite Unterstützung. Sowohl bei Patienten mit depressiven Störungen als auch bei Alzheimer-Patienten konnte ein Verlust an Serotonin und 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA als Indikator für die metabolische Aktivität) in mehreren Studien sowohl in Hirngewebe als auch im Liquor

cerebrospinalis nachgewiesen werden (Reinikainen, Soininen et al. 1990; Owens und Nemeroff 1994). Ein deutlicheres Ausmaß an serotonerger Dysfunktion im ZNS wurde bei Alzheimer-Patienten beschrieben, die zusätzlich an depressiven Störungen litten (Chen, Alder et al. 1996).

In peripheren Zellen von Patienten mit depressiven Störungen wurde sehr konsistent eine gesteigerte Transmission der serotonergen Signaltransduktion über 5-HT_{2a}-Rezeptoren festgestellt (Eckert, Gann et al. 1994; Tomiyoshi, Kamei et al. 1999; Plein und Berk 2000). Somit gibt es auch bei den Untersuchungen mit depressiven Patienten die Inkonsistenz zwischen Untersuchungen an zentralen Zellen mit einer gestörten serotonergen Signaltransduktion und an peripheren Zellen mit einer gesteigerten serotonergen Signaltransduktion. Diese Übereinstimmungen zwischen neurochemischen Veränderungen von Alzheimer-Patienten und Patienten mit Depression könnten mit dem erhöhten Risiko der Alzheimer-Patienten, eine Depression zu entwickeln und mit der häufigen Koexistenz von Demenz und Depression assoziiert sein (Reding, Haycox et al. 1985).

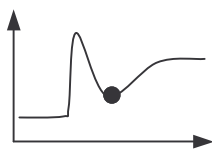
Es gibt bei den depressiven Erkrankungen zudem einige Hinweise darauf, dass nicht spezifische Rezeptordefizite und eine spezifische Störung der serotonergen Aktivität für die neurobiologischen Pathomechanismen verantwortlich sind, sondern dass eine generelle Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und Störung der Kalzium-Homöostase besteht (Dubovsky, Murphy et al. 1992; Dubovsky, Murphy et al. 1992; Dubovsky, Thomas et al. 1994; Eckert, Gann et al. 1994; Yamawaki, Kagaya et al. 1996). Zu der erhöhten Vulnerabilität der Alzheimer-Patienten depressive Symptome zu entwickeln, könnte nicht nur eine Übereinstimmung in der Veränderung des serotonergen Systems, sondern auch eine Gleichartigkeit in den jeweiligen Veränderungen der Kalzium-Homöostase beitragen.

Es gibt Hinweise darauf, dass im Gegensatz zu einer Alzheimer-Demenz ohne Depression Kalziumantagonisten bei einer Koexistenz von Demenz und Depression therapeutische Wirkungen zeigen (De Vry, Fritze et al. 1997). Eine Therapie mit Kalziumantagonisten hätte vor allem Vorteile gegenüber der Anwendung von tricyclischen Antidepressiva, die durch anticholinerge und kardiovaskuläre Nebenwirkungen und gleichzeitigem Effektivitätsverlust in geriatrischen Populationen (Slotkin,

Whitmore et al. 1989) bei Alzheimer-Demenz wenig geeignet erscheinen.

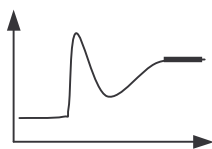
Zusammenfassend ist der Vergleich der neurochemischen Veränderungen bei der Depression mit denen bei AD aufgrund der Ähnlichkeit in den Ergebnissen und der vergleichbaren Schwierigkeiten in der Interpretation interessant. Er lässt aber keinen Schluss zu, ob es sich um eine Verstärkung der serotonergen Signaltransduktion handelt oder um eine erhöhte IP3-abhängige Kalziumionenfreisetzung unabhängig vom Stimulus.

6.5. Das Minimum des Serotonin-induzierten Kalzium-Signals



Das Minimum ist schwierig zu interpretieren, da die Höhe abhängig zu sein scheint vom initialen Maximum, denn bei allen Gruppen reduzierte sich die $[Ca^{2+}]_i$ nach dem initialen Peak um ca. 50%. Die Unterschiede ähneln somit denen, die bei dem Vergleich des initialen Maximums auftraten. Außerdem kann der tendenziell erhöhte Wert bei AD auch durch eine Überlagerung durch den darauffolgenden CCE zustande kommen. Die Aussagekraft dieses Wertes ist somit begrenzt, verdeutlicht aber, dass die $[Ca^{2+}]_i$ bei den Alzheimer-Patienten über den ganzen Verlauf höher lag als die bei der Kontrollgruppe.

6.6. Das finale Maximum des Serotonin-induzierten Kalzium-Signals



Der kapazitative Kalziumionen-Einstrom (CCE), der durch die Verarmung an Kalziumionen im endoplasmatischen Reticulum zum Beispiel nach IP3-abhängiger Kalziumionenfreisetzung ausgelöst wird (Putney, Broad et al. 2001), ist durch die transiente Erhöhung in der zweiten Phase des Kalzium-Signals und dem Messpunkt des „finalen Maximums“ (Max_{fin}) charakterisiert.

Bei den Alzheimer-Patienten ist diese transiente Erhöhung stärker ausgeprägt als in der Kontrollgruppe und zeigt sich in den signifikant erhöhten finalen Maxima.

6.6.1. FAKTOREN, DIE ZU EINEM VERSTÄRKTEM CCE BEITRAGEN KÖNNTEN

Ryanodin-Rezeptoren

Der kapazitative Kalziumionen-Einstrom (CCE) zeichnet dadurch aus, dass nur soviel Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum einströmt, wie zum

Auffüllen der intrazellulären Kalziumionenspeicher benötigt wird (Chow und Jondal 1990). Diese Regulation, welche die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration in engen Grenzen hält, könnte bei den Alzheimer-Patienten verloren gegangen sein. Eine Ursache könnte zum Beispiel eine erhöhte Anzahl oder verlängerte Öffnungsdauer von membranständigen Kalziumkanälen sein. Der Mechanismus und die Regulation des CCE ist bis heute noch nicht geklärt, aber es werden Theorien favorisiert, die einen diffusiblen Kalzium Influx Faktor (Csutora, Su et al. 1999) oder direkte mechanische Interaktion zwischen ER und Plasmamembran durch Konformationsänderungen zum Beispiel von Ryanodin-Rezeptoren postulieren (Kiselyov, Shin et al. 2000). Bei Alzheimer-Patienten fanden sich eine erhöhte Anzahl von Ryanodin-Rezeptoren (Kelliher, Fastbom et al. 1999), die zu einem erhöhten CCE und einer damit anhaltend erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ beitragen könnten.

Auswirkungen des β -Amyloids auf die Kalzium-Homöostase

Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte durch die Vorbehandlung der Zellen mit A β auch in gesunden Zellen Veränderungen der Kalzium-Homöostase hervorgerufen werden (Eckert, Hartmann et al. 1993; Mattson, Tomaselli et al. 1993).

β -Amyloid kann direkt den Kalziumionen-Einstrom über die Zellmembran beeinflussen. Schon in niedrigen Konzentrationen kann A β eine Erhöhung der basalen $[Ca^{2+}]_i$ und eine Verstärkung des Stimulus-induzierten Kalziumionen-Einstroms bewirken (Mattson, Tomaselli et al. 1993). Diese Erhöhung der Membran-Leitfähigkeit für Kalzium könnte A β durch die Bildung eines selektiven Kationen-Kanals verursachen. In in-vitro-Versuchen zeigte sich, dass β -Amyloid in einer Lipiddoppelmembran einen Kationen-Kanal mit einer Transportfunktion für Kalzium bilden kann (Arispe, Pollard et al. 1993; Arispe, Rojas et al. 1993; Pollard, Rojas et al. 1993).

Durch eine Ablagerung von A β auf der Zelloberfläche und durch die intrazelluläre Bildung von freien Radikalen nach der Behandlung mit A β können außerdem Membranproteine, die für die Kalzium-Homöostase Bedeutung haben, geschädigt werden. Bei Inkubation der Zellen mit A β wurde ein verstärkter Kalziumionen-Einstrom über die

spannungsabhängigen membranständigen Kalziumkanäle (VOCC) beobachtet (Silei, Fabrizi et al. 1999). Auch eine verringerte Elimination über die Zellmembran kann zur Akkumulation von Kalzium und einem erhöhten CCE beitragen ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (Wu, Derrico et al. 1997), ATPasen (Mark, Hensley et al. 1995)).

Die beschriebenen Störungen der Kalzium-Homöostase können somit Folgen einer A β -Formation in der Zellmembran oder auf der Zelloberfläche sein.

Kaliumkanäle

Eine Interaktion zwischen A β und den spannungsabhängigen Kalium-Kanälen wurde von Etcheberrigaray et al. vorgeschlagen (Etcheberrigaray, Ito et al. 1994). Seine Untersuchungen zeigen, dass bei AD der durch den Kalium-Kanal-Blocker Tetraethylammoniumchlorid induzierten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ geringer ausfällt. Im gleichen Maße beeinflusst in AD auch β -Amyloid die Kalzium-Homöostase geringer als bei gesunden Probanden.

Es wird vermutet, dass es bei Gesunden nach der Behandlung mit A β durch eine Membranpotentialänderung zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kommt, während dieser Mechanismus bei AD durch eine K^+ -Kanal-Dysfunktion unterdrückt wird. Ein Aktivitätsverlust der Phosphokinase C α ist mit der K^+ -Kanal-Dysfunktion assoziiert (Bhagavan, Ibarreta et al. 1998), somit könnte unter anderem eine Veränderung der Kalzium-Homöostase die Kaliumkanalfunktion beeinflussen.

Einige Arbeitsgruppen betonen, dass gerade in Lymphozyten für den kapazitativen Kalziumionen-Einstrom nicht nur die luminale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im endoplasmatischen Reticulum wichtig ist, sondern dass er zusätzlich spannungsabhängig reguliert wird (Zweifach und Lewis 1996) (Densmore, Haverstick et al. 1996). Eine Dysfunktion von Kaliumkanälen könnte somit einen direkten Einfluss auf das Membranpotential haben und darüber hinaus in die Regulation des kapazitativen Kalziumionen-Einstroms eingreifen.

6.6.2. VERÄNDERUNGEN DES CCE'S BEI DER FAMILIÄREN FORM

Zusätzlich zu diesen Überlegungen ist der Vergleich mit Veränderungen der Kalzium-Homöostase in Zellen mit Presenilin-Mutationen interessant. Vererbte Mutationen der PS-1- und PS-2-Gene sind

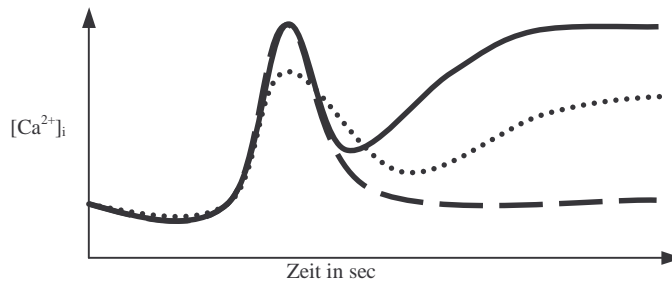


Abb. 18 schematische Darstellung des Agonist-induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen mit Presenilin-Mutationen (gestrichelte Linie), „normalen“ Zellen (gepunktete Linie) und Zellen ohne Presenilin (durchgezogene Linie). Stimulationssubstanzen waren unter anderem Bradykinin und Bombesin. Während eine Presenilin-Mutation zu einem stärkeren IP_3 -abhängigen Kalziumionen-Einstrom und einem verringerten CCE führt, kommt es durch ein Fehlen des Presenilin-Proteins zu einem verstärkten CCE. Die durchgezogene Linie entspricht auch den Veränderungen, die in dieser Arbeit bei den Alzheimer-Patienten gezeigt werden konnten

für bis zu 40% der familiären Alzheimer-Fälle verantwortlich. Fibroblasten und Lymphozyten, die eine solche Mutation aufwiesen zeigen eine spezifische Veränderung der Kalzium-Homöostase (Abb.18).

Während einer der konsistentesten Befunde der potenzierende Effekt von Presenilin-Mutationen in Hinblick auf die IP_3 -vermittelnde Kalziumionenfreisetzung war (Ito, Oka et al. 1994; Gibson, Martins et al. 1996; Guo, Furukawa et al. 1996; Etcheberrigaray, Hirashima et al. 1998; Leissring, Parker et al. 1999; Leissring, Paul et al. 1999), zeigte sich auch eine Störung des kapazitiven Kalziumionen-Einstroms (CCE). In Zellen mit PS-Mutationen war dieser verringert (Ito, Oka et al. 1994; Yoo, Cheng et al. 2000).

Die modulatorische Wirkung auf den CCE scheint aber nicht auf mutiertes Presenilin beschränkt zu sein, sondern ist eine physiologische Funktion von „normalem“ Presenilin. Yoo et al. konnten zeigen, dass eine an Presenilin verarmte Zelle einen gesteigerten kapazitiven Kalziumionen-Einstrom aufweist (Yoo, Cheng et al. 2000).

Eine interessante Verbindung zwischen sporadischer AD und familiärer AD mit Presenilin-Mutationen bietet die Untersuchungen von Giannakopoulos und Bouras et al, die eine erhöhte Überlebenschance von Neuronen beschreiben, die PS-1 immunoreaktiv sind (Bouras, Giannakopoulos et al. 1996) und eine

erniedrigte Presenilinkonzentration in Zellen von Patienten mit sporadischem AD im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen (Giannakopoulos, Bouras et al. 1997). So liegt meines Erachtens nach die Hypothese nahe, dass der stärkere CCE, verdeutlicht durch das erhöhte finale Maximum, durch eine verringerte Expressionsrate oder funktionelle Aktivität der Preseniline zustande kommen könnte.

Weitere Untersuchungen mit der Quantifizierung von Presenilinen sind nötig, um diese Hypothese zu bestätigen. Diese Differenz zwischen sporadischen und familiären Fällen bietet eventuell eine Möglichkeit, Unterschiede im Verlauf und der Pathophysiologie zu erklären. Voraussetzung dabei ist, diese Untergruppen getrennt zu untersuchen, um einen sich aufhebenden Effekt zu vermeiden

6.6.3. FOLGEN DES VERSTÄRKTEN KAPAZITATIVEN KALZIUMIONENEINSTROMS

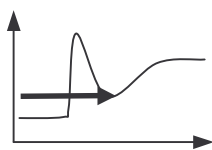
Die anhaltend erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ kann zu einer gestörten Mitochondrien-Funktion mit einer Aktivierung von Enzym-Kaskaden, Akkumulation von Kalzium und einer Störung der Redoxsysteme mit der Bildung von freien Radikalen führen (Mattson 1994). Eine gestörte Kalzium-Homöostase könnte nicht nur durch eine Wirkung des β -Amyloids entstehen. Sie kann auch zu einer Erhöhung des A β -Peptids sowie zu Phosphorylierungen des Tau-Proteins unter anderem durch eine Aktivitätsänderung Kalzium-abhängiger Proteasen und Proteinkinasen beitragen (Querfurth und Selkoe 1994).

Zusätzlich hat die Regulation der Kalziumionenfreisetzung aus dem endoplasmatischen Reticulum direkte Bedeutung beim Apoptose-Vorgang. Zu Beginn der Apoptose kann eine Erhöhung der Typ3 IP3-Rezeptoren in Lymphozyten nachgewiesen werden (Guo, Furukawa et al. 1996; Guo, Sopher et al. 1997) und Inhibitoren der Ca^{2+} -ATPase des ER wie Thapsigargin induzieren Apoptose in vielen Zelltypen. Die Auswirkungen einer erhöhten intrazellulären Kalziumionenkonzentration könnten so mit den pathologischen Hauptmerkmalen (Apoptose, Plaques und Fibrillen mit hyperphosphorylierten Neurofilamentproteinen) der Alzheimerschen Erkrankung in Zusammenhang stehen.

Zusammenfassend kann die anhaltende Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration Hinweis auf eine Störung des kapazitiven

Kalziumionen-Einstroms (CCE) mit einem verstärkten und verlängerten Einstrom aus dem Extrazellulärraum sein. Zu dem verstärkten Kalziumionen-Einstroms könnte eine Störung membranständiger Kalziumionenkanäle, eine lokale Wirkung des β -Amyloids und eine Störung von membranständigen Kaliumkanälen beitragen.

6.7. Die Kinetik des Kalzium-Signals: Hinweis auf eine verkürzte Halbwertszeit



Interessant ist der Vergleich der Kinetik zwischen den untersuchten Gruppen.

Sowohl bei der Stimulation mit 5-HT als auch bei α Me-5-HT-Stimulation gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zeit bis zum Erreichen des initialen Maximums (t_{max}), obwohl zumindest nach der Stimulation mit 5-HT bei der Alzheimer-Gruppe eine Tendenz im Sinne einer Verzögerung festzustellen war. Auch wenn diese Veränderung hier nicht deutlich hervortritt, deutet sie in die gleiche Richtung wie die Ergebnisse von einigen Arbeitsgruppen, die ein verzögertes Signal nach PHA - Stimulation in Lymphozyten zeigen konnten (Bondy, Hofmann et al. 1995; Eckert, Forstl et al. 1996).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine andere kinetische Veränderung. Alzheimer-Patienten erreichten das Minimum des Kalzium-Signals nach serotonerger Stimulation hochsignifikant früher als die Kontrollgruppe. Unterschiedliche Faktoren könnten zu einer Verkürzung der 1. Phase des Serotonin-induzierten Kalzium-Signals beitragen.

6.7.1. FAKTOREN, DIE ZU EINEM FRÜHEREN ERREICHEN DES MINIMUMS BEITRAGEN KÖNNTEN

Überlagerung mit dem kapazitiven Kalziumionen-Einstrom

Es besteht die Möglichkeit, dass eine Überempfindlichkeit des kapazitiven Kalziumionen-Einstroms (CCE) zu einem vorzeitigen Einstrom von Kalziumionen führen kann und durch eine Überlagerung des Minimums, die vorherige Phase kürzer erscheinen lässt. Die erhöhte Sensitivität des kapazitiven Kalziumionen-Einstroms könnte durch eine erniedrigte Pufferkapazität für Kalzium im endoplasmatischen Reticulum bedingt sein oder durch eine Überaktivität der membranständigen Kalziumkanäle. Wenn man eine direkte mechanische Interaktion zwischen

endoplasmatischen Reticulum und Plasmamembran durch Konformationsänderungen zum Beispiel von Ryanodin-Rezeptoren als Mechanismus für den CCE annimmt (Kiselyov, Shin et al. 2000), könnte eine Aktivitätsveränderung von Ryanodinrezeptoren zu diesem Phänomen beitragen.

Verringerte Halbwertszeit

Andererseits könnte dieses frühere Erreichen des Minimums für eine erniedrigte Halbwertszeit (HWZ) des Agonisten-induzierten Signals sprechen. Außer von der Einwirkungszeit des Agonisten ist die Dauer des IP3-induzierten Signals vor allem abhängig von der Geschwindigkeit der GTP-Hydrolyse durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit des G-Proteins ((Krauss 1997), S.207). Eine veränderte GTPase-Aktivität könnte somit zu einer erniedrigten HWZ beitragen. Verschiedene Untersuchungen konnten Veränderungen in der G-Protein-Funktion nach acetylcholinerg und serotonerger Stimulation bei AD feststellen (Weinstein, Magnuson et al. 1996; Jope, Song et al. 1997). Es ist vorstellbar, dass auch die GTPase-Aktivität davon beeinflusst wird zum Beispiel durch die Konformation des G-Proteins.

6.7.2. MÖGLICHE FOLGEN DER VERKÜRZTEN HALBWERTSZEIT DES SEROTONERGEN SIGNALS

Die A β -Produktion und die Tau-Phosphorylierung werden durch Signaltransduktionsmechanismen reguliert. Hierbei fördert der Agonist-induzierte IP3-abhängige Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration die Bildung des neuroprotektiven Spaltprodukts, das lösliche Amyloid-Vorläuferprotein APPs (Nitsch, Wurtman et al. 1996). Die Verkürzung dieser Phase bei Alzheimer-Patienten könnte so zu einer verringerten Synthese von APPs beitragen.

Der CCE führt dagegen eher wie auch der durch Ionophoren ausgelöste Ca²⁺-Einstrom aus dem EZR zu einer verstärkten Bildung von A β (Querfurth und Selkoe 1994). A β kann wiederum die Kalzium-Homöostase stören und so zu seiner eigenen Bildung beitragen, somit einen Teufelskreis induzieren.

6.8. Die Gruppe der „anderen kognitiven Störungen“

6.8.1. DAS SEROTONIN-INDUZIERTES KALZIUM-SIGNAL IST KEIN DIAGNOSTISCHER MARKER

Die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration zu den definierten Zeiten und die kinetischen Werte befanden sich bei der Gruppe der „anderen kognitiven Störungen“ (aKS-Gruppe) stets zwischen denen der Kontrollen und denen der Alzheimer-Patienten. Zu keinem Zeitpunkt im Verlauf des Kalzium-Signals unterschieden sich die Mittelwerte der aKS-Gruppe signifikant von denen der Alzheimer-Patienten. Somit ist das Serotonin-induzierte Kalzium-Signal als diagnostischer Marker wertlos.

6.8.2. VERÄNDERUNG DER KALZIUM-HOMÖOSTASE IN DER aKS-GRUPPE

In der aKS-Gruppe scheint eine Veränderung der Kalzium-Homöostase vorzuliegen. Im Gegensatz zur Alzheimergruppe war bereits der Basalwert der aKS-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p < 0,03$). Während bei dem initialen Maximum keine signifikanten Unterschiede zwischen aKS- und Kontrollgruppe festzustellen waren, wurde das Minimum tendenziell früher als in der Kontrollgruppe erreicht und das finale Maximum war signifikant erhöht ($p < 0,01$). Diese Veränderungen, die qualitativ denen der Alzheimer-Patienten gleichen, aber nicht das Ausmaß annehmen, deuten darauf hin, dass eine Störung der Kalzium-Homöostase bei verschiedenen dementiellen Erkrankungen eine Rolle spielen könnte.

Patienten mit subjektiv kognitiven Störungen und leichten kognitiven Störungen haben ein erhöhtes Risiko, an M. Alzheimer zu erkranken (Kluger, Ferris et al. 1999). Die Veränderungen der Kalzium-Homöostase in der aKS-Gruppe könnten somit eine Vorstufe sein bei der Entwicklung einer Alzheimer-Demenz mit den deutlicheren Veränderungen in der Kalzium-Homöostase und im serotonergen System, die hier für die Alzheimergruppe gezeigt werden konnten.

6.9. Zusammenfassende kritische Beurteilung

Obwohl die Interpretation von Untersuchungen, in denen Lymphozyten als Modell für neurodegenerative Erkrankungen herangezogen werden, durch die fragliche Vergleichbarkeit zentraler und

peripherer Gewebe eingeschränkt ist, erlauben diese Studien dennoch, einige zelluläre Prozesse nach einfacher Venenpunktion zu untersuchen, die vermutlich in vergleichbarer Weise in zentralen und peripheren Geweben ablaufen. Ein weiterer Vorteil dieser Modelluntersuchungen ist die Tatsache, dass mögliche Veränderungen bereits zu einem früheren Zeitpunkt der Erkrankung und nicht erst post mortem, nach längerer Krankheitsdauer, identifiziert und im Verlauf weiter verfolgt werden können.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass es bei AD nach Stimulation mit 5-HT zu einem erhöhten, aber verkürzten Kalzium-Signal und zu einem verstärkten Kalziumionen-Einstrom in Lymphozyten kommt. Ob es sich dabei um eine überwiegend gesteigerte serotonerge Signaltransduktion über 5-HT_{2a}-Rezeptoren handelt oder ob die Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration zusätzlich Ausdruck einer veränderten Kalzium-Homöostase ist, muss weiterhin offen bleiben. Allerdings weist die Tatsache, dass die in der Literatur für AD beschriebene Entkopplung von G-Protein und Rezeptor und die Reduktion in der 5-HT Rezeptordichte des ZNS eigentlich zu einem verminderten Kalzium-Signal nach serotonerger Stimulation führen sollte, auch auf mögliche Störungen der intrazellulären Homöostase und der IP₃-abhängigen Kalziumionenfreisetzung hin.

Trotz der kritischen Bewertung der Befunde lässt sich zusammenfassend darauf hinweisen, dass in dieser Arbeit erstmals gezeigt wird, dass zumindest an zirkulierenden Lymphozyten von AD Patienten die Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors mit spezifischen Agonisten eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration von längerer Dauer induziert. Diese Beobachtung würde die Kalzium-Hypothese der Demenz unterstützen, welche mögliche toxische Effekte den geringen, aber persistierenden Erhöhungen der intrazellulären Konzentration von Kalziumionen zuschreibt.

7. Zusammenfassung

Aus neurochemischer Sicht spielen Störungen der Signaltransduktion in der Pathophysiologie der Alzheimer-Demenz (AD) die entscheidende Rolle. Sie betreffen alle Transmittersysteme, von denen das cholinerge System am auffälligsten verändert ist und das serotonerge System vor allem mit Störungen im nicht-kognitiven Bereich assoziiert ist (Aggressivität, depressive Syndrome, Schlafstörungen). Direkten Einfluss auf die Ausbildung der charakteristischen Alzheimer-Plaques und Fibrillen haben beide Neurotransmittersysteme durch ihre Regulatorfunktion im β -APP-Processing und in der Tau-Proteinphosphorylierung, Serotonin insbesondere über die 5-HT_{2a} und 5-HT_{2c} Rezeptoren. Während in neueren Untersuchungen an post mortem gewonnenen Hirngewebe von Patienten mit AD vor allem Veränderungen der G-Protein/Rezeptor-Kopplung für die Transduktionsstörungen verantwortlich gemacht wurden, sind bisher bei in-vivo Versuchen an peripheren Zellen hauptsächlich Veränderungen der Kalzium-Homöostase für eine spätere Stufe der Transduktionskaskade erfasst worden.

Das Ziel dieser Untersuchung war die Verknüpfung der beiden Systeme: Lymphozyten von Patienten mit M. Alzheimer, von Patienten mit verschiedenen anderen dementiellen Erkrankungen und Kontrollen wurden mit Serotonin stimuliert und das induzierte Kalzium-Signal aufgezeichnet. So konnte eine größere funktionelle Einheit (Agonist-Rezeptorbindung bis zum $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg) an einem peripheren Modell für 5-HT_{2a}-Rezeptoren in einem Versuch erfasst werden.

Während die Basalwerte sich im Mittel nicht unterschieden, ergaben sich beim Vergleich des Kalzium-Signals nach serotonerger Stimulation signifikante Unterschiede zwischen der Alzheimer-Gruppe und den Kontrollen: Nach Zugabe von 5-HT und dem 5-HT_{2a}-Agonisten α -Methyl-5-HT zeigte sich ein signifikant erhöhter initialer Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ($p < 0,03$) in Patienten mit AD, der nachfolgende kurze Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ zeigte früher ein Minimum ($p < 0,001$) und das finale Maximum erreicht nach serotonerger Stimulation eine signifikant höhere $[Ca^{2+}]_i$ bei AD-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen ($p < 0,01$).

Die 5-HT_{2a}-Rezeptoren sind über ein Gq-Protein an das IP₃-Effektor-System gekoppelt, sodass der hohe initiale Peak nach serotonerger Stimulation ein Maß für die IP₃-abhängige Kalzium-Freisetzung ist. Das erhöhte finale Maximum nach α -Methyl-5-HT- und 5-HT-Stimulation zeigt einen verlängerten und erhöhten Kalziumionen-Einstrom aus dem Extrazellulärraum an.

Die Ergebnisse können in zwei Richtungen interpretiert werden: zum einen mit einer Veränderung in der Kalzium-Homöostase zum Beispiel in Form von Veränderungen der membranständigen Kalziumkanäle und zum anderen mit einer gesteigerten Signaltransduktion über 5-HT_{2a}-Rezeptoren, die zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration von längerer Dauer führen können.

Diese Ergebnisse könnten die Kalzium-Hypothese der neurodegenerativen Erkrankungen unterstützen, welche mögliche toxische Effekte unter anderem den geringen, aber persistierenden Erhöhungen der intrazellulären Kalziumionenkonzentration zuschreibt.

Bei der Assoziation des His452Tyr-Polymorphismus mit dem Kalzium-Signal zeigten Patienten mit dem ⁴⁵²Tyr-Allel ein signifikant höheres initiales Maximum als die Patienten mit His/His Genotyp ($p < 0,03$), während bei den Kontrollen kein Unterschied zwischen den Genotypen festzustellen ist. Dieses Ergebnis gibt zum einen Hinweise darauf, dass dieser Polymorphismus im Rahmen der Alzheimerkrankung eine andere Rolle spielen könnte als bei Gesunden und dass er unter Umständen zu dem erhöhten Kalzium-Signal nach serotonerger Stimulation beitragen könnte.

8. Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde zwischen 1998 und 2001 in der Neurochemischen Abteilung der Psychiatrischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität in München angefertigt.

Ich möchte herzlich danken

- Prof. Dr. Brigitta Bondy für die Möglichkeit, in ihrem Labor meine Dissertation zu erarbeiten, für die außergewöhnlich intensive Betreuung, für die offenen wissenschaftlichen Diskussionen und ihre äußerst konstruktive Kritik
- Sylvia deJonge, Stefanie Behrends und Karin Neumeier für die hervorragende und geduldige technische Anleitung und Hilfe bei den Experimenten
- Peter Zill und allen anderen Mitarbeitern der Abteilung für Neurochemie für die nette und freundschaftliche Atmosphäre
- den Probanden und Patienten, die durch ihre Blutspende die Arbeit erst ermöglichten
- meiner Mutter, Christa Viskorf, für das sehr zügige und professionelle Korrekturlesen
- meiner Familie für ihr Zuhören, ihre Ermutigungen und für die Unterstützung in der Suche nach geeigneten Probanden
- Stefan Bartels für seine geduldige Hilfe in vielen verschiedenen Bereichen und besonders für die computertechnischen Ratschläge
- und Anne Zirngibl vor allem für ihre Unterstützung bei statistischen Fragen

9. Abkürzungsverzeichnis

A β	β -Amyloid
ACh	Acetylcholin
AD	Alzheimer Demenz
ADRDA	Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
aKS	andere kognitive Störungen
ApoE	Apolipoprotein E
β APP	β -Amyloid-Precursor-Protein
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
Ca ²⁺	Kalziumionen
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre freie Kalziumionenkonzentration
CCE	kapazitiver Kalziumioneneinstrom (capacitative calcium entry)
CICR	calcium induced calcium release
CIF	Kalzium Influx Faktor
DAG	Diacylglycerol
Max _{ini}	Differenz zwischen initialem Maximum und Basalwert
EOAD	early onset Alzheimer's Disease
ER	endoplasmatisches Reticulum
GABA	γ -Amino-Buttersäure
GDS	Global deterioration scale nach Reisberg
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
5-HT	Serotonin
IICR	IP3 induced calcium release
IP3	Inositoltrisphosphat
LKS	leichte kognitive Störungen
LOAD	late onset Alzheimer's Disease

Max _{fin}	finales Maximum
Max _{ini}	initiales Maximum
αMe-5-HT	αMethyl-Serotonin
NINCDS	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke
PBMC.....	peripheral blood mononuclear cells
PHA.....	Phythämagglutinin
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PMCA.....	plasma membrane Kalzium ATPase
PLC	Phospholipase C
ROCC	receptor operated Kalzium channel
RyR.....	Ryanodin-Rezeptor
sec.....	Sekunden
SERCA	sarco/endoplasmatic reticulum Kalzium ATPase
SKS.....	subjektive kognitive Störungen
SOCC	store operated Kalzium channel
TEA.....	Tetraethylammonium
t _{max}	Zeit bei Erreichen des Maximums
t _{min}	Zeit bei Erreichen des Minimums
VD.....	vaskuläre Demenz
VOCC	voltage operated Kalzium channel
ZNS	zentrales Nervensystem

10. Literaturverzeichnis

- Adams, R. D., M. Victor, et al. (1997). Principles of Neurology, McGraw-Hill.
- Adunsky, A., D. Baram, et al. (1991). "Increased cytosolic free Calcium in lymphocytes of Alzheimer patients." J Neuroimmunol **33**(2 (Aug)): 167-72.
- Adunsky, A., A. Diver-Haber, et al. (1995). "Basal and activated intracellular Calcium ion concentrations in mononuclear cells of Alzheimer's disease and unipolar depression." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **50**(4 (Jul)): B201-204.
- Aghajanian, G. K. and G. J. Marek (1999). "Serotonin, via 5-HT_{2A} receptors, increases EPSCs in layer V pyramidal cells of prefrontal cortex by an asynchronous mode of glutamate release." Brain Res **825**(1-2): 161-71.
- Almulla, N., B. J. Ebersole, et al. (1996). "Contribution of a Helix 5 Locus to Selectivity of Hallucinogenic and Nonhallucinogenic Ligands for the Human 5-Hydroxytryptamine_{2a} and 5-Hydroxytryptamine_{2c} receptors: direct and indirect effects on ligand affinity mediated by the same locus." Molecular Pharmacology **50**: 34-42.
- Altman, H. J., H. J. Normile, et al. (1990). "Enhanced spatial discrimination learning in rats following 5,7-DHT induced serotonergic deafferentation of the hippocampus." Brain Research **518**: 61-66.
- Alzheimer, A. (1906). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." Allg. Z. Psychiatrie Psychisch-Gerichtl. Medm. **64**: 146-148.
- Ameisen, J.-C., R. Meade, et al. (1989). "A new interpretation of the involvement of serotonin in delayed-type hypersensitivity: serotonin-2 receptor antagonists inhibit contact sensitivity by an effect of T cells." J. Immunol.: 3171.
- Andersen, K., L. J. Launer, et al. (1999). "Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group." Neurology **53**(9 (Dec10)): 1992-7.
- Arai, H., K. Kosaka, et al. (1984). "Changes of biogenic amines and their metabolites in postmortem brains from patients with Alzheimer-type dementia." J Neurochem **43**(2): 388-93.
- Arai, H., V. M. Lee, et al. (1990). "Defined neurofilament, tau, and beta-amyloid precursor protein epitopes distinguish Alzheimer from non-Alzheimer senile plaques." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(6): 2249-53.
- Arispe, N., H. B. Pollard, et al. (1993). "Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22): 10573-7.
- Arispe, N., E. Rojas, et al. (1993). "Alzheimer disease amyloid beta protein forms Calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 567-71.
- Arranz, M. J., D. A. Collier, et al. (1996). "Analysis of a structural polymorphism in the 5-HT_{2A} receptor and clinical response to clozapine." Neurosci Lett **217**(2-3): 177-8.
- Attali, B., E. Honore, et al. (1992). "Regulation of a major cloned voltage-gated K⁺ channel from human T lymphocytes." FEBS Lett **303**(2-3): 229-32.
- Aune, T. M., K. M. McGrath, et al. (1993). "Expression of 5-HT_{1a}-Rezeptoren auf aktivierten Lymphozyten." J. Immunol. **151**(3): 1175-1183.

- Azmitia, E. C. and P. M. Whitaker-Azmitia (1991). "Awakening the sleeping giant: anatomy and plasticity of the brain serotonergic system." J Clin Psychiatry **52**(12 (suppl)): 4-16.
- Bachmann, D. L., P. A. Wolf, et al. (1992). "Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the Framingham Study." Neurology **42**: 115-119.
- Barnes, J. M., B. Costall, et al. (1990). "The effects of ondansetron, a 5-HT₃ receptor antagonist, on cognition in rodents and primates." Pharmacol Biochem Behav **35**(4): 955-62.
- Barrow, P. A., R. M. Empson, et al. (2000). "Functional phenotype in transgenic mice expressing mutant human presenilin-1." Neurobiol Dis **7**(2): 119-26.
- Berg, K. A., S. Maayani, et al. (1998). "Pleiotropic behavior of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor agonists." Ann N Y Acad Sci **861**: 104-10.
- Bergman, I., G. Brane, et al. (1983). "Alaproclate: a pharmacokinetic and biochemical study in patients with dementia of Alzheimer type." Psychopharmacology (Berl) **80**(3): 279-83.
- Berridge, M. J. (1993). "Cell signalling. A tale of two messengers." Nature **365**(6445): 388-9.
- Berridge, M. J. (1995). "Calcium signalling and cell proliferation." Bioessays **17**(6): 491-500.
- Berridge, M. J. and R. F. Irvine (1984). "Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction." Nature **312**(5992): 315-21.
- Bhagavan, S., D. Ibarreta, et al. (1998). "Restoration of TEA-Induced Calciumresponses In Fibroblasts from Alzheimer's Disease Patients by a PKC Activator." Neurobiology of Disease **5**: 177-187.
- Bierer, L. M., V. Haroutunian, et al. (1995). "Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits." J Neurochem **64**(2): 749-60.
- Blalock, J. E. (1994). "The syntax of immune-neuroendocrine communication." Immunol Today **15**(11): 504-11.
- Bodick, N. C., W. W. Offen, et al. (1997). "The selective muscarinic agonist xanomeline improves both the cognitive deficits and behavioral symptoms of Alzheimer disease." Alzheimer Dis Assoc Disord **11 Suppl 4**: S16-22.
- Bonaccorso, S., A. Lin, et al. (1998). "Serotonin-immune interactions in elderly volunteers and in patients with Alzheimer's disease (DAT): lower plasma tryptophan availability to the brain in the elderly and increased serum interleukin-6 in DAT." Aging (Milano) **10**(4 (Aug)): 316-23.
- Bondareff, W., C. Q. Mountjoy, et al. (1982). "Loss of neurons of origin of the adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus ceruleus) in senile dementia." Neurology **32**(2): 164-8.
- Bondy, B., M. Hofmann, et al. (1995). "Reduced β -amyloid response in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease." Pharmacopsychiatry **28**(4): 143-6.
- Bondy, B., M. Hofmann, et al. (1996). "The PHA-induced Calcium Signal in Lymphocytes is altered after blockade of K⁺-channels in Alzheimer's Disease." Journal of psychiatric Research **30**(3): 217-227.
- Bondy, B., U. Klages, et al. (1994). "Cytosolic free [Ca²⁺] in mononuclear blood cells from demented patients and healthy controls." European Archives in Psychiatry and Clin Neuroscience(243): 224-228.

- Borson, S. and M. A. Raskind (1997). "Clinical features and pharmacologic treatment of behavioral symptoms of Alzheimer's disease." Neurology **48**(5 Suppl. 6): S17-24.
- Bosman, G. J., I. G. Bartholomeus, et al. (1991). "Alzheimer's disease and cellular aging: as clues to primary mechanisms." Gerontology **37**(1-3): 95-112.
- Bouras, C., P. Giannakopoulos, et al. (1996). "Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease [letter; comment]." Lancet **347**(9009): 1185-6.
- Braiman, A., V. Goldstein, et al. (2000). "Feasibility of a sustained steep Ca(2+)Gradient in the cytosol of electrically non-excitabile cells." J Theor Biol **206**(1): 115-30.
- Busciglio, J., A. Lorenzo, et al. (1992). "Methodological variables in the assessment of beta amyloid neurotoxicity." Neurobiol Aging **13**(5): 609-12.
- Butler, P. D., M. R. Pranzatelli, et al. (1990). "Regional central serotonin-2 receptor binding and phosphoinositide turnover in rats with 5,7-dihydroxytryptamine lesions." Brain Res Bull **24**(1): 125-9.
- Candy, J. M., R. H. Perry, et al. (1983). "Pathological changes in the nucleus of Meynert in Alzheimer's and Parkinson's diseases." J Neurol Sci **59**(2): 277-89.
- Carafoli, E. (1994). "The signaling function of Calcium and its regulation." J Hypertens Suppl **12**(10): S47-56.
- Carr, D. J. and D. A. Weigent (1989). "Hormones common to the neuroendocrine and immune systems." Drug Des Deliv **4**(3): 187-95.
- Chen, C., M. J. Corbley, et al. (1988). "Voltage-sensitive Calcium channels in normal and transformed 3T3 fibroblasts." Science **239**: 1024-1026.
- Chen, C. P., J. T. Alder, et al. (1996). "Presynaptic serotonergic markers in community-acquired cases of Alzheimer's disease: correlations with depression and neuroleptic medication." J Neurochem **66**(4): 1592-8.
- Chow, S. C. and M. Jondal (1990). "Ca²⁺ entry in T cells is activated by emptying the inositol 1,4,5-triphosphate sensitive Ca²⁺ pool." Cell Calcium **11**(10): 641-6.
- Clapham, D. E. (1995). "Calcium signaling." Cell **80**(2): 259-68.
- Cowburn, R. F., C. J. Fowler, et al. (1996). "Neurotransmitter receptor/G-protein mediated signal transduction in Alzheimer's Disease Brain." Neurodegeneration **5**: 483-488.
- Crews, F. T., P. Kurian, et al. (1994). "Cholinergic and serotonergic stimulation of phosphoinositide hydrolysis is decreased in Alzheimer's disease." Life Sci **55**(25-26): 1993-2002.
- Cross, A. J. (1990). "Serotonin in Alzheimer-type dementia and other dementing illnesses." Ann N Y Acad Sci **600**: 405-15; discussion 415-7.
- Cross, A. J., T. J. Crow, et al. (1984). "Serotonin receptor changes in dementia of the Alzheimer type." J Neurochem **43**(6): 1574-81.
- Crow, T. J., A. J. Cross, et al. (1984). "Neurotransmitter receptors and monoamine metabolites in the brains of patients with Alzheimer-type dementia and depression, and suicides." Neuropharmacology **23**(12B): 1561-9.
- Csutora, P., Z. Su, et al. (1999). "Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar Calcium stores." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(1): 121-6.
- Curcio, C. A. and T. Kemper (1984). "Nucleus raphe dorsalis in dementia of the Alzheimer type: neurofibrillary changes and neuronal packing density." J Neuropathol Exp Neurol **43**(4): 359-68.

- D'Amato, R. J., R. M. Zweig, et al. (1987). "Aminergic systems in Alzheimer's disease and Parkinson's disease." Ann Neurol **22**(2 (Aug)): 229-36.
- Davies, P. (1978). "Loss of choline acetyltransferase activity in normal aging and in senile dementia." Adv Exp Med Biol **113**: 251-6.
- Davies, T. A., H. J. Long, et al. (1997). "Moderate and advanced Alzheimer's Patients exhibit platelet Activation Differences." Neurobiology of Aging **18**(2).
- De Vry, J., J. Fritze, et al. (1997). "The management of coexisting depression in patients with dementia: potential of Calcium channel antagonists." Clin Neuropharmacol **20**(1 (Feb)): 22-35.
- Densmore, J. J., D. M. Haverstick, et al. (1996). "A voltage-operable current is involved in Ca²⁺ entry in human lymphocytes whereas ICRAC has no apparent role." Am J Physiol **271**(5 Pt 1): C1494-503.
- Deutsch, L. H., F. W. Bylsma, et al. (1991). "Psychosis and physical aggression in probable Alzheimer's disease." Am J Psychiatry **148**(9): 1159-63.
- Devanand, D. P. (1997). "Behavioral complications and their treatment in Alzheimer's disease." Geriatrics **52 Suppl 2**: S37-9.
- Devanand, D. P., D. M. Jacobs, et al. (1997). "The course of psychopathology in mild to moderate Alzheimer's disease." Arch Gen Psychiatry **54**: 257-63.
- Deyo, R. A., K. T. Straube, et al. (1989). "Nimodipine ameliorates aging-related changes in open-field behaviors of the rabbit." Exp Aging Res **15**(3-4): 169-75.
- Dobrev, D., E. Wettwer, et al. (2000). "G-Protein beta(3)-subunit 825T allele is associated with enhanced human atrial inward rectifier potassium currents." Circulation **102**(6): 692-7.
- Dringenberg, H. C., P. Diavolitsis, et al. (2000). "Effect of tacrine on EEG slowing in the rat: enhancement by concurrent monoamine therapy." Neurobiol Aging **21**(1): 135-43.
- Dubovsky, S. L., J. Murphy, et al. (1992). "The Calcium second messenger system in bipolar disorders: data supporting new research directions." J Neuropsychiatry Clin Neurosci **4**(1): 3-14.
- Dubovsky, S. L., J. Murphy, et al. (1992). "Abnormal intracellular Calcium ion concentration in platelets and lymphocytes of bipolar patients." Am J Psychiatry **149**(1): 118-20.
- Dubovsky, S. L., M. Thomas, et al. (1994). "Intracellular Calcium signalling in peripheral cells of patients with bipolar affective disorder." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **243**(5): 229-34.
- Eckert, A., H. Förstl, et al. (1993). "Decreased β -Amyloid sensitivity in Alzheimer's disease." The Lancet **342**(8874 (Sep25)): 805-806.
- Eckert, A., H. Forstl, et al. (1996). "Lymphocytes and neutrophils as peripheral models to study the effect of beta-amyloid on cellular Calcium signalling in Alzheimer's disease." Life Sci **59**(5-6): 499-510.
- Eckert, A., H. Förstl, et al. (1997). "Free Intracellular Calcium in Peripheral cells in Alzheimer's Disease." Neurobiology of Aging **18**(3): 281-284.
- Eckert, A., H. Förstl, et al. (1998). "Changes of intracellular Calcium regulation in Alzheimer's disease and vascular dementia." J Neural Transm Suppl **54**: 201-210.
- Eckert, A., H. Gann, et al. (1994). "Platelet and lymphocyte free intracellular Calcium in affective disorders." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **243**(5): 235-9.

- Eckert, A., H. Hartmann, et al. (1993). "β-Amyloid protein enhances the mitogen-induced Calcium response in circulating human lymphocytes." FEBS Lett **330**(1 (Sep 6)): 49-52.
- Erdmann, J., D. Shimron-Abarbanell, et al. (1996). "Systematic screening for mutations in the human serotonin-2A (5-HT_{2A}) receptor gene: identification of two naturally occurring receptor variants and association analysis in schizophrenia." Hum Genet **97**(5): 614-9.
- Etcheberrigaray, R., N. Hirashima, et al. (1998). "Calcium Responses in Fibroblasts from Asymptomatic Members of Alzheimer's disease Families." Neurobiology of Disease **5**: 37-45.
- Etcheberrigaray, R., E. Ito, et al. (1994). "Soluble beta-amyloid induction of Alzheimer's phenotype for human fibroblast K⁺ channels." Science **264**(5156): 276-9.
- Etcheberrigaray, R., E. Ito, et al. (1993). "Potassium channel dysfunction in fibroblasts identifies patients with Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 8209-13.
- Eugen-Olsen, J., P. Afzelius, et al. (1997). "Serotonin modulates immune function in T cells from HIV-eropositive subjects." Clinical immunology and immunopathology **84**(2): 115-121.
- Fanger, C. M., M. Hoth, et al. (1995). "Characterization of T cell mutants with defects in capacitative Calcium entry: genetic evidence for the physiological roles of CRAC channels." J Cell Biol **131**(3): 655-67.
- Feniuk, W., J. Hare, et al. (1998). "Analysis of the Mechanism of 5-hydroxytryptamine-induced vasopressor response in ganglion-blocked anaesthetized dogs." J. Pharm. Pharmac. **33**: 155-160.
- Feuerstein, T. J., O. Gleichauf, et al. (1996). "Modulation of cortical acetylcholine release by serotonin: the role of substance p interneurons." Naunyn Schmiedebergs Archives in Pharmacology **354**(5): 618-26.
- Finch, E. A., T. J. Turner, et al. (1991). "Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Calcium release." Science **252**(5004): 443-6.
- Fratiglioni, L., D. De Ronchi, et al. (1999). "Worldwide prevalence and incidence of dementia." Drugs Aging **15**(5): 365-75.
- Fu, W., H. Luo, et al. (1998). "Catecholamines potentiate amyloid beta-peptide neurotoxicity: involvement of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and perturbed Calcium homeostasis." Neurobiol Dis **5**(4): 229-43.
- Garlind, A. (1995). "Diminished ³[H] inositol (1,4,5)P₃ but not ³[H] inositol (1,3,4,5)P₄ binding in Alzheimer's disease brain." Brain Res **681**: 160-166.
- Giannakopoulos, P., C. Bouras, et al. (1997). "Presenilin-1-immunoreactive neurons are preserved in late-onset Alzheimer's disease." Am J Pathol **150**(2): 429-36.
- Gibson, G., R. Martins, et al. (1996). "Altered oxidation and signal transduction systems in fibroblasts from Alzheimer patients." Life Sci **59**(5-6): 477-89.
- Gottfries, C. G. (1985). "Alzheimer's disease and senile dementia: Biochemical characteristics and aspects of treatment." Psychopharmacology **86**: 245-252.
- Gottfries, C. G. (1994). "Therapy options in Alzheimer's disease." Br J Clin Pract **48**(6): 327-30.
- Greenwood, A. F., R. E. Powers, et al. (1995). "Phosphoinositide hydrolysis, Galphaq, phospholipase C and protein kinase C in postmortem human brain: effects of post mortem interval, subject age and Alzheimer's Disease." Neuroscience **69**(1): 125-138.

- Greger, R. and U. Windhorst (1996). Comprehensive human physiology, Springer.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, et al. (1986). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem **260**: 3440-50.
- Guo, Q., K. Furukawa, et al. (1996). "Alzheimer's PS-1 mutation perturbs Calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid β -peptide." Neuroreport **8**(1): 379-83.
- Guo, Q., L. Sebastian, et al. (1999). "Neurotrophic factors [activity-dependent neurotrophic factor (ADNF) and basic fibroblast growth factor (bFGF)] interrupt excitotoxic neurodegenerative cascades promoted by a PS1 mutation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7 (Mar30)): 4125-30.
- Guo, Q., B. L. Sopher, et al. (1997). "Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid β -peptide: involvement of Calcium and oxyradicals." J Neurosci **17**(11): 4212-22.
- Häfner, H. (1990). Epidemiology of Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease: Epidemiology, Neuropathology, Neurochemistry, and Clinics. K. Maurer, Riederer, P., Beckmann, H. Wien, Springer: 23-39.
- Hakamata, Y., S. Nishimura, et al. (1994). "Involvement of the brain type of ryanodine receptor in T-cell proliferation." FEBS Lett **352**(2): 206-10.
- Hampel, H., F. Mullerspahn, et al. (1995). "Evidence of blood cerebrospinal fluid-barrier impairment in a subgroup of patients with dementia of the Alzheimer's type and major depression." Dementia **6**: 348-354.
- Hartmann, H., A. Eckert, et al. (1994). "Similar age-related changes of free intracellular Calcium in lymphocytes and central neurons: effects of Alzheimer's disease." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **243**(5): 218-23.
- Haug, L. S. e. a. (1996). "Decreased Inositol (1,4,5)-Trisphosphate Receptor Levels in Alzheimer's Disease Cerebral Cortex: Selectivity of Changes and Possible Correlation to Pathological Severity." Neurodegeneration **5**(169-176).
- Heider, M., R. Schliebs, et al. (1997). "Basal forebrain cholinergic immunolesion by 192IgG-saporin: evidence for a presynaptic baation of subpopulations of alpha 2- and β -adrenergic as well as 5-HT_{2A} receptors on cortical cholinergic terminals." Neurochemistry Research **22**(8): 957-66.
- Hellstrand, K. and S. Hermodsson (1987). "Role of serotonin in the regulation of human natural killer cell cytotoxicity." The Journal of Immunology **139**(3): 869-875.
- Hendrie, H. C. (1998). "Epidemiology of dementia and Alzheimer's disease." Am J Geriatr Psychiatry **6**(2 Suppl 1 (Spring)): S3-18.
- Heyman, A., W. E. Wilkinson, et al. (1983). "Alzheimer's disease: genetic aspects and associated clinical disorders." Ann Neurol **14**(507).
- Hirashima, N., R. Etcheberrigaray, et al. (1996). "Calcium Responses in Human Fibroblasts: A Diagnostic Molecular Profile for Alzheimer's Disease." Neurobiology of Aging **17**(4): 549-555.
- Hofman, A., W. A. Rocca, et al. (1991). "The prevalence of dementia in Europe: a collaborative study of 1980-1990 findings." Int J Epidemiol **20**(3 (Sep)): 736-48.
- Holmes, C., M. J. Arranz, et al. (1998). "5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor polymorphisms and psychopathology in late onset Alzheimer's disease." Hum Mol Genet **7**(9 (Sep)): 1507-9.

- Hoth, M. and R. Penner (1992). "Depletion of intracellular Calcium stores activates a Calcium current in rat mast cells." Nature **355**: 353-5.
- Hoyer, D., D. E. Clarke, et al. (1994). "International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)." Pharmacol Rev **46**(2): 157-203.
- Hung, A. Y., C. Haass, et al. (1993). "Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid β -protein." J Biol Chem **268**: 22959-22962.
- Ibarreta, D., R. Parrilla, et al. (1997). "Altered Ca²⁺ Homeostasis in Lymphoblasts from Patients with late-Onset Alzheimer Disease." Alzheimer Disease and Associated Disorders **11**(4): 220-227.
- Ito, E., K. Oka, et al. (1994). "Internal Ca²⁺ mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci USA **91**: 534-538.
- Jagger, C., K. Andersen, et al. (2000). "Prognosis with dementia in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group." Neurology **54**((11 Suppl 5)): S16-20.
- Jean, T. and C. B. Klee (1986). "Calcium modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Calcium release from neuroblastoma x glioma hybrid (NG108-15) microsomes." J Biol Chem **261**(35): 16414-20.
- Joachim, C. L., J. H. Morris, et al. (1987). "Tau antisera recognize neurofibrillary tangles in a range of neurodegenerative disorders." Ann Neurol **22**(4): 514-20.
- Johnson, M. P., R. J. Loncharich, et al. (1993). "Species variations in transmembrane region V of 5-Hydroxytryptamine type 2A receptor alter the structure-activity relationship of certain ergolines and tryptamines." Molecular Pharmacology **45**: 277-286.
- Jope, R. S. (1996). "Cholinergic Muscarinic Receptor Signaling by the Phosphoinositide Signal Transduction System in Alzheimer's Disease." Alzheimer's Disease Review **1**: 2-14.
- Jope, R. S., L. Song, et al. (1997). "Cholinergic Activation of Phosphoinositide Signaling Is Impaired in Alzheimer's Disease Brain." Neurobiology of Aging **18**(1): 111-120.
- Karlsson, J. O., K. Blennow, et al. (1995). "Increased proteolytic activity in lymphocytes from patients with early onset Alzheimer's disease." Neurobiology of Aging **16**(6 (Nov-Dec)): 901-906.
- Kelliher, M., J. Fastbom, et al. (1999). "Alterations in the ryanodine receptor Calcium release channel correlate with Alzheimer's Disease neurofibrillary and β -Amyloid pathologies." Neuroscience **92**(2): 499-513.
- Kennedy, K. B. (1989). "Regulation of neuronal function by Calcium." TINS **12**(11): 417-420.
- Khachaturian, Z. S. (1989). "The role of Calcium regulation in brain aging: reexamination of a hypothesis." Aging **1**: 17-34.
- Kidd, M., D. Allsop, et al. (1985). "Senile plaque amyloid, paired helical filaments, and cerebrovascular amyloid in Alzheimer's disease are all deposits of the same protein." Lancet **1**(8423): 278.
- Kiselyov, K. I., D. M. Shin, et al. (2000). "Gating of store-operated channels by conformational coupling to ryanodine receptors." Mol Cell **6**(2): 421-31.
- Kluger, A., S. H. Ferris, et al. (1999). "Neuropsychological prediction of decline to dementia in nondemented elderly." J Geriatr Psychiatry Neurol **12**(4): 168-79.

- Kopelman, M. D. (1986). "The cholinergic neurotransmitter system in human memory and dementia: a review." Q J Exp Psychol A **38**(4): 535-73.
- Krauss, G. (1997). Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. Weinheim, Wiley-VCH.
- Kumar, V., N. B. Durai, et al. (1998). "Pharmacologic management of Alzheimer's disease." Clin Geriatr Med **14**(1): 129-46.
- La Rue, A., J. Watson, et al. (1992). "Retrospective accounts of dementia symptoms: are they reliable?" Gerontologist **32**(2): 240-5.
- Lawlor, B. A., T. Sunderland, et al. (1991). "A pilot placebo-controlled study of chronic m-CPP administration in Alzheimer's disease." Biol Psychiatry **30**(2): 140-4.
- Lawrence, A. D. and B. J. Sahakian (1998). "The cognitive psychopharmacology of Alzheimer's disease: focus on cholinergic systems." Neurochem Res **23**(5): 787-94.
- Leisring, M. A., Y. Akbari, et al. (2000). "Capacitative Calcium entry deficits and elevated luminal Calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice." J Cell Biol **149**(4): 793-8.
- Leisring, M. A., I. Parker, et al. (1999). "Presenilin-2 mutations modulate amplitude and kinetics of inositol 1, 4,5-trisphosphate-mediated Calcium signals." J Biol Chem **274**(46): 32535-8.
- Leisring, M. A., B. A. Paul, et al. (1999). "Alzheimer's presenilin-1 mutation potentiates inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Calcium signaling in *Xenopus* oocytes." J Neurochem **72**(3): 1061-8.
- Lennox, G., J. Lowe, et al. (1988). "Ubiquitin is a component of neurofibrillary tangles in a variety of neurodegenerative diseases." Neurosci Lett **94**(1-2): 211-7.
- Letenneur, L., L. J. Launer, et al. (2000). "Education and the risk for Alzheimer's disease: sex makes a difference." Am J Epidemiol **151**(11): 1064-71.
- Li, G., J. M. Silverman, et al. (1995). "Age at onset and familial risk in Alzheimer's disease." Am J Psychiatry **152**(424).
- MacDermott, A. B. and N. Dale (1987). "Receptors, ion channels and synaptic potentials underlying the integrative actions of excitatory amino acids." Trends Neurosci **10**: 280-284.
- Maitland-van der Zee, A.-H., O. H. Klungel, et al. (2002). "Genetic polymorphisms: importance for response to HMG-CoA reductase inhibitors." Atherosclerosis **163**(2): 213-22.
- Mann, D. M., P. O. Yates, et al. (1984). "Monoaminergic neurotransmitter systems in presenile Alzheimer's disease and in senile dementia of Alzheimer type." Clin Neuropathol **3**(5): 199-205.
- Mark, R. J., K. Hensley, et al. (1995). "Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: Evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death." Journal of Neuroscience **15**: 6239-6249.
- Marrion, N. V. and P. R. Adams (1992). "Release of intracellular Calcium and modulation of membrane currents by caffeine in bull-frog sympathetic neurones." J Physiol **445**: 515-35.
- Martin, G. R. and P. P. A. Humphrey (1993). "Classification Review: Receptors for 5-Hydroxytryptamine: Current Perspectives on Classification and Nomenclature." Neuropharmacology **33**(3/4): 261-273.
- Mattson, M. P. (1994). "Calcium and neuronal injury in Alzheimer's disease. Contributions of β -amyloid precursor protein mismetabolism, free radicals, and metabolic compromise." Ann N Y Acad Sci **747**((Dec 15)): 50-76.

- Mattson, M. P., S. W. Barger, et al. (1993). "β-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis in Alzheimer's disease." Trends Neurosci **16**(10 (Oct)): 409-414.
- Mattson, M. P., Q. Guo, et al. (1998). "Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease." J Neurochem **70**(1): 1-14.
- Mattson, M. P., K. J. Tomaselli, et al. (1993). "Calcium-destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated beta-amyloid peptide are attenuated by basic FGF." Brain Res **621**(1): 35-49.
- Mattson, M. P., H. Zhu, et al. (2000). "Presenilin-1 mutation increases neuronal vulnerability to focal ischemia in vivo and to hypoxia and glucose deprivation in cell culture: involvement of perturbed Calcium homeostasis." J Neurosci **20**(4 (Feb15)): 1358-64.
- Maura, G., E. Roccatagliata, et al. (1988). "Serotonin-glutamate interaction in rat cerebellum: involvement of 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors." European Journal of Pharmacology **145**: 31-38.
- McKhann, G., D. Drachman, et al. (1984). "Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices at the Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease." Neurology **34**: 939-44.
- Meltzer, C. C., G. Smith, et al. (1998). "Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: the emerging role of functional imaging." Neuropsychopharmacology **18**(6 (Jun)): 407-30.
- Meneses, A. (1998). "Physiological, pathophysiological and therapeutic roles of 5-HT systems in learning and memory." Rev Neurosci **9**(4): 275-89.
- Meyer, T. and L. Stryer (1990). "Transient Calcium release induced by successive increments of inositol 1,4,5-trisphosphate." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(10): 3841-5.
- Miller, R. A. (1994). "Aging and immune function. Cellular and biochemical analyses." Exp Gerontology **29**: 21-35.
- Minov, C., T. C. Baghai, et al. (2001). "Serotonin-2A-receptor and -transporter polymorphisms: lack of association in patients with major depression." Neuroscience letters **303**: 119-122.
- Mohr, E., T. Mendis, et al. (1994). "Neurotransmitter replacement therapy in Alzheimer's disease." J Psychiatry Neurosci **19**(1): 17-23.
- Moore, N. A., N. C. Tye, et al. (1992). "The behavioral pharmacology of olanzapine, a novel "atypical" antipsychotic agent." J Pharmacol Exp Ther **262**(2): 545-51.
- Mossner, R. and K. P. Lesch (1998). "Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions." Brain Behav Immun **12**(4): 249-71.
- Muallem, S., S. J. Pandol, et al. (1989). "Hormone-evoked Calcium release is a quantal process." J Biol Chem **264**: 205-212.
- Muramatsu, M., J. Tomaki-Ohashi, et al. (1988). "Serotonin-2 receptor-mediated regulation of release of acetylcholine by minaprine in cholinergic nerve terminals of hippocampus in rat." Neuropharmacology **27**(603-609).
- Muramatsu, M., J. Tomaki-Ohashi, et al. (1988). "5-HT₂ antagonists and minaprine block the 5-HT-induced inhibition of dopamine release from rat brain striatal slices." European Journal of Pharmacology **153**: 89-95.
- Muraoka, S., K. Kamei, et al. (1998). "Chronic Imipramine Administration Amplifies the Serotonin_{2A} Receptor-induced Intracellular Ca²⁺ Mobilization in C6 Glioma Cells Through a Calmodulin-Dependent Pathway." Journal of Neurochemistry **71**(4): 1709-1718.

- Nacmias, B., A. Tedde, et al. (2001). "Association between 5-HT(2A) receptor polymorphism and psychotic symptoms in Alzheimer's disease." Biol Psychiatry **50**(6): 472-5.
- Nee, L. E., A. Eldrige, et al. (1987). "Dementia of the Alzheimer type: clinical and family study of 22 twin pairs." Neurology **37**(359).
- Nilsson, O. G., R. E. Strecker, et al. (1988). "Combined cholinergic and serotonergic denervation of the forebrain produces severe deficits in a spatial learning task in the rat." Brain Res **453**(1-2): 235-46.
- Nitsch, R. M., N. Deng, et al. (1996). "Serotonin 5-HT2a and 5-HT2c Receptors Stimulate Amyloid Precursor Protein Ectodomain Secretion." Journal of Biological Chemistry **271**(8): 4188-94.
- Nitsch, R. M., R. J. Wurtman, et al. (1996). "Regulation of APP processing. Potential for the therapeutical reduction of brain amyloid burden." Annals of the New York Academy of Sciences **777**: 175-82.
- Nordberg, A. (1992). "Neuroreceptor changes in Alzheimer Disease." Cerebrovasc Brain Met **4**: 303-328.
- Nordberg, A. (1996). "Pharmacological treatment of cognitive dysfunction in dementia disorders." Acta Neurol Scand Suppl **168**: 87-92.
- Nyth, A. L. and C. G. Gottfries (1990). "The clinical efficacy of citalopram in treatment of emotional disturbances in dementia disorders. A Nordic multicentre study." Br J Psychiatry **157**: 894-901.
- Ott, A., M. M. Breteler, et al. (1998). "Incidence and risk of dementia. The Rotterdam Study." Am J Epidemiol **147**(6 (Mar15)): 574-80.
- Owens, M. J. and C. B. Nemeroff (1994). "Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter." Clin Chem **40**(2): 288-95.
- Ozaki, N., H. Manji, et al. (1997). "A naturally occurring amino acid substitution of the human serotonin 5-HT2A receptor influences amplitude and timing of intracellular Calcium mobilization." J Neurochem **68**(5): 2186-93.
- Palmer, A. M. (1996). "Neurochemical studies of Alzheimer's disease." Neurodegeneration **5**(4): 381-91.
- Pearce, J. (1974). "Mental changes in Parkinsonism." Br Med J Lett **1**: 445.
- Perry, E. K., B. E. Tomlinson, et al. (1981). "Noradrenergic and cholinergic systems in senile dementia of Alzheimer type." Lancet **2**(8238): 149.
- Peterson, C. (1992). "Changes in Calcium's role as a messenger during aging in neuronal and nonneuronal cells." Ann NY Acad Sci **663**((Nov 21)): 279-293.
- Petry, S., J. L. Cummings, et al. (1988). "Personality aberrations in dementia of the Alzheimer type." Archives in Neurology **45**: 1187-1190.
- Pike, C. J., D. Burdick, et al. (1993). "Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state." J Neurosci **13**(4): 1676-87.
- Plein, H. and M. Berk (2000). "Changes in the platelet intracellular Calcium response to serotonin in patients with major depression treated with electroconvulsive therapy: state or trait marker status." Int Clin Psychopharmacol **15**(2 8Mar): 93-6.
- Pollard, H. B., E. Rojas, et al. (1993). "A new hypothesis for the mechanism of amyloid toxicity, based on the Calcium channel activity of amyloid beta protein (A beta P) in phospholipid bilayer membranes." Ann N Y Acad Sci **695**: 165-8.

- Preuss, U. W., G. Koller, et al. (2000). "No association between suicidal behavior and 5-HT2A-T102C polymorphism in alcohol dependents." Am J Med Genet **96**(6): 877-8 Munich, Germany.
- Putney, J. W., Jr., L. M. Broad, et al. (2001). "Mechanisms of capacitative Calcium entry." J Cell Sci **114**(Pt 12): 2223-9.
- Querfurth, H. W. and D. J. Selkoe (1994). "Calcium ionophore increases amyloid beta peptide production by cultured cells." Biochemistry **33**(15): 4550-61.
- Reding, M., J. Haycox, et al. (1985). "Depression in patients referred to a dementia clinic: A three-year prospective study." Archives in Neurology **42**: 894-896.
- Reinikainen, K. J., H. Soininen, et al. (1990). "Neurotransmitter changes in Alzheimer's disease: implications to diagnostics and therapy." J Neurosci Res **27**(4): 576-86.
- Reisberg, B., S. H. Ferris, et al. (1982). "The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia." Am J Psychiatry **139**(9): 1136-9.
- Richter-Levin, G. and M. Segal (1989). "Raphe cells grafted into the hippocampus can ameliorate spatial memory deficits in rats with combined serotonergic/cholinergic deficiencies." Brain Res **478**(1): 184-6.
- Richter-Levin, G. and M. Segal (1989). "Spatial performance is severely impaired in rats with combined reduction of serotonergic and cholinergic transmission." Brain Res **477**(1-2): 404-7.
- Ritchie, K., J. Touchon, et al. (1998). "Progressive disability in senile dementia is accelerated in the presence of depression." Int J Geriatr Psychiatry **13**(7): 459-61.
- Roman, G. C., T. K. Tatemichi, et al. (1993). "Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop." Neurology **43**(2): 250-60.
- Rothmann, S. M. and J. W. Olney (1986). "Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage." Ann Neurol **19**: 105-111.
- Sanderson, K. L., L. Butler, et al. (1997). "Aggregates of a β -amyloid peptide are required to induce Calcium currents in neuron-like human teratocarcinoma cells: relation to Alzheimer's disease." Brain research **744**: 7-14.
- Schlossmacher, M. G., B. L. Ostaszewski, et al. (1992). "Detection of distinct isoform patterns of the β -amyloid precursor protein in human platelets and lymphocytes." Neurobiology of Aging **13**(3 (May-June)): 421-34.
- Sei, Y., K. L. Gallagher, et al. (1999). "Skeletal muscle type ryanodine receptor is involved in Calcium signaling in human B lymphocytes." J Biol Chem **274**(9): 5995-6002.
- Silei, V., C. Fabrizi, et al. (1999). "Activation of microglial cells by PrP and β -amyloid fragments raises intracellular Calcium through L-type voltage sensitive Calcium channels." Brain Research **818**: 168-170.
- Simpson, P. B., R. A. Challiss, et al. (1995). "Neuronal Ca²⁺ stores: activation and function." Trends Neurosci **18**(7): 299-306.
- Slotkin, T. A., W. L. Whitmore, et al. (1989). "Reduced inhibitory effect of imipramine on radiolabeled serotonin uptake into platelets in geriatric depression." Biol Psychiatry **25**(6): 678-91.
- Song, C., M. Vandewoude, et al. (1999). "Alterations in immune functions during aging and Alzheimer's disease." Psychiatry Research **85**: 71-80.

- Storga, D., K. Vrecko, et al. (1996). "Monoaminergic neurotransmitters, their precursors and metabolites in brains of Alzheimer patients." Neuroscience Letters **203**(1): 29-32.
- Sulger, J., C. Dumais-Huber, et al. (1999). "The Calcium Response of human T Lymphocytes Is Decreased in Aging but increased in Alzheimer's Dementia." Biological Psychiatry **45**: 737-742.
- Sunderland, T., S. E. Molchan, et al. (1997). "Pharmacologic challenges in Alzheimer disease and normal controls: cognitive modeling in humans." Alzheimer Disease and Associated Disorders **11**(Suppl. 4): S23-S26.
- Tilley, L., K. Morgan, et al. (1999). "Evaluation of polymorphisms in the presenilin-1 gene and the butyrylcholinesterase gene as risk factors in sporadic Alzheimer's disease." Eur J Hum Genet **7**(6): 659-63.
- Tollefson, G. D. (1990). "Short-term effects of the Calcium channel blocker nimodipine (Bay-e-9736) in the management of primary degenerative dementia." Biol Psychiatry **27**(10): 1133-42.
- Tomiyoshi, R., K. Kamei, et al. (1999). "Serotonin-induced platelet intracellular Ca²⁺ responses in untreated depressed patients and imipramine responders in remission." Biol Psychiatry **45**(8): 1042-8.
- Tomlinson, B. E., G. Blessed, et al. (1970). "Observations on the brain of demented old people." Journal of Neurological Science **11**: 205-242.
- Trieb, K., G. Ransmayr, et al. (1996). "APP peptides stimulate lymphocyte proliferation in normals, but not in patients with Alzheimer's Disease." Neurobiology of Aging **17**(4): 541-547.
- Tune, L. E. and T. Sunderland (1998). "New cholinergic therapies: treatment tools for the psychiatrist." J Clin Psychiatry **59 Suppl 13**: 31-5.
- Watson, J., S. Brough, et al. (1998). "Functional effects of the muscarinic receptor agonist, xanomeline, at 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors." Br J Pharmacol **125**(7 (Dec)): 1413-20.
- Weigent, D. A. and J. E. Blalock (1995). "Associations between the neuroendocrine and immune systems." J Leukoc Biol **58**(2): 137-50.
- Weinstein, D., D. Magnuson, et al. (1996). "Altered G-protein coupling of a frontal cortical low affinity [3H]8-hydroxy-N,N-dipropyl-2-aminotetralin serotonergic binding site in Alzheimer's disease." Behavioural Brain Research **73**(1-2): 325-9.
- Weiss, J. H., C. J. Pike, et al. (1994). "Ca²⁺ channel blockers attenuate β -Amyloid peptide toxicity to cortical neurones in culture." Journal of Neurochemistry **62**: 372-375.
- Wisniewski, H. M., K. Iqbal, et al. (1989). "Cytoskeletal protein pathology and the formation of beta-amyloid fibers in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **10**(5): 409-12; discussion 412-4.
- Wisniewski, H. M., H. K. Narang, et al. (1976). "Neurofibrillary tangles of paired helical filaments." J Neurol Sci **27**(2): 173-81.
- Wong, E. H., G. P. Reynolds, et al. (1996). "Characterization of [3H]GR 113808 binding to 5-HT₄ receptors in brain tissues from patients with neurodegenerative disorders." Behavioural Brain Research **73**(1-2): 249-52.
- Wu, A., C. A. Derrico, et al. (1997). "Alzheimer's amyloid-beta peptide inhibits sodium/Calcium exchange measured in rat and human brain plasma membrane." Neuroscience **80**(3): 675-684.
- Wu, C., S. K. Singh, et al. (1999). "Activated astrocytes display increased 5-HT_{2a} receptor expression in pathological states." Exp Neurol **158**(2): 529-33.

- Yamawaki, S., A. Kagaya, et al. (1996). "Enhanced Calcium response to serotonin in platelets from patients with affective disorders." J Psychiatry Neurosci **21**(5): 321-4.
- Yanker, B. A., L. R. Dawes, et al. (1989). "Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's Disease." Science **245**: 417-420.
- Yasuda, M., N. Hirono, et al. (1999). "Case-control study of presenilin-1 intronic polymorphism in sporadic early and late onset Alzheimer's disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **66**(6): 722-6.
- Yoo, A. S., I. Cheng, et al. (2000). "Presenilin-mediated modulation of capacitative Calcium entry [In Process Citation]." Neuron **27**(3): 561-72.
- Zubenko, G. S., J. Moossy, et al. (1991). "Neuropathologic and neurochemical correlates of psychosis in primary dementia." Arch Neurol **48**(6): 619-24.
- Zweifach, A. and R. S. Lewis (1996). "Calcium-dependent potentiation of store-operated Calcium channels in T lymphocytes." J Gen Physiol **107**(5): 597-610.

Lebenslauf: Andrea Katharina Alice Viskorf

persönliche Daten:

Geburtsdatum, -ort: 17.09.1976 in Münster
Anschrift: Engelschalkinger Str. 199, 81927 München
Telefon: 089 / 93940939
email: andrea.viskorf@gmx.de

Ausbildung:

**1987-1995
Münster**

Johann-Conrad-Schlaun Gymnasium in

Juni 1995

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Gesamtnote: sehr gut (1,1)

1995-2002

**Ludwig-Maximilians-Universität in
München**
Medizinische Fakultät

Aug. 1997

Physikum
Gesamtnote: gut (1,7)

Aug. 1998

1. Staatsexamen
Gesamtnote: gut (2)

Aug. 2000

2. Staatsexamen
Gesamtnote: gut (1,7)
mündl. Fächer: Gynäkologie und Neurologie
(sehr gut)

Mai 2002

3. Staatsexamen
Note: sehr gut (1,0)
Abschluss des Hochschulstudiums der
Medizin
Gesamtnote: sehr gut (1,49)

seit Sept. 1998

**Doktorandin an der Psychiatrischen Klinik
der LMU**

Abteilung für Neurochemie
Betreuung: Prof. Dr. Brigitta Bondy
Thema: Serotonin-induziertes Kalzium-Signal
in Lymphozyten von Patienten mit M.
Alzheimer

Okt. 1999

Vorstellung erster Ergebnisse auf dem
AGNP- Symposium in Nürnberg

Praktisches Jahr

April-Juni 2001

Onkologische Chirurgie, Memorial-Sloan-
Kettering-Cancer-Center in New York, USA

Juni-August 2001

Neurochirurgie, Universitätsklinikum
Großhadern

August –Nov. 2001

Neurologie, Universitätsklinikum Großhadern

Nov 2001- Feb. 2002

Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus
München Schwabing

Famulaturen

März 1998

Innere Medizin, Franziskushospital in Münster

August 1999

Psychiatrie, Maudsley Hospital, King's
College, London

Sept. 1999

Neurochirurgie, städt. Krankenhaus
Bogenhausen in München

März 2000

Anästhesie, Praxis für Anästhesiologie in
München

Zusätzliche Kenntnisse und Aktivitäten:

1991-1995

Jugendgruppenleitung und
Ferienfreizeitorganisation
in St. Mauritz, Münster

1997-1999

Pflegeaushilfsdienst im Krankenhaus
Bogenhausen

seit Juli 2001

Mitarbeiterin des Praxisleitfadens
Allgemeinmedizin
Urban & Fischer Verlag, München

Sprachen:

Englisch, Französisch (Schule), Spanisch (2
Semester)

Computer:

PC, Windows, MS Word, Excel

Musik:

wechselnd bis Ende 2000 Unterricht in den
Instrumenten Querflöte, Klavier, Gitarre
1995-2002 Gospelchor St. Emmeram
2000-2002 Gaudete-Chor München

München, den 25.07.2002