

Aus der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Markus Schweiger

In vivo Charakterisierung endothelialer Zellaktivierung in einem transgenen Mausmodell des Morbus Alzheimer

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

vorgelegt von
Caroline Schultheiß

aus
Landau/Isar

Jahr
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Markus Essler
Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik
Technische Universität München

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Elsenhans
PD Dr. Berking
PD Dr. Sitter

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2007

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Einleitung | 3 |
| Die Alzheimer Erkrankung | 3 |
| Spaltung von APP und Mechanismen der Amyloidogenese | 5 |
| Sekretasen als Therapieziel bei der Alzheimer Erkrankung | 6 |
| Die „Amyloid Kaskaden Hypothese“ | 7 |
| Die zerebrale Amyloidangiopathie (CAA) | 10 |
| Beeinflussung der Gefäßfunktion durch A β | 11 |
| Kardiovaskuläre Medikamente wirken präventiv auf die AD Entstehung | 12 |
| Mechanismen der Angiogenese | 14 |
| $\alpha_v\beta_3$ Integrin | 15 |
| Die „Angiogenese Hypothese“ | 16 |
| Hemmung der Angiogenese durch A β | 18 |
| Das APP23 Maus Modell | 18 |
| Neuropsychologische Veränderungen in APP23 Mäusen | 20 |
| Ziel der Arbeit | 22 |
| Materialien | 23 |
| Tiere | 23 |
| Substanzen, Verbrauchsmittel und Geräte für: | 23 |
| Immunhistochemie | 23 |
| Masson Trichrom Färbung | 24 |
| Tc-99m Annexin V Biodistribution | 24 |
| “Matrigel plug” Injektion | 24 |
| Hb Bestimmung aus dem “Matrigel plug” | 25 |
| Western blot | 25 |
| Methoden | 28 |
| Präparation von APP23 Gehirnen | 28 |
| Herstellung von Kryo- bzw. Paraffinschnitten | 28 |
| Masson Trichrom Färbung | 28 |
| CD31 Immunhistochemie | 29 |
| Amyloid Immunhistochemie | 30 |
| β_3 -Integrin Immunhistochemie | 30 |
| Amyloid/ β_3 -Integrin Doppelimmunhistochemie | 31 |

| | |
|--|----|
| Tc-99m Annexin V Biodistribution | 31 |
| Angiogeneseinduktion durch APP23 bzw. Kontrollhirn im „Matrigel plug assay“ | 31 |
| Angiogenesehemmung durch Medikamente im „Matrigel plug assay“ | 32 |
| Photometrische Hämoglobin (Hb) Bestimmung aus „Matrigel plugs“ | 32 |
| Anti-VE-Cadherin Western blot | 33 |
| Statistische Signifikanz | 34 |
| Ergebnisse | 35 |
| Amyloid Plaque Ablagerungen im Gehirnparenchym von APP23 Mäusen | 35 |
| Amyloid positive Blutgefäße im Gehirn von APP23 Mäusen | 35 |
| β 3-Integrin Expression in APP23 Gehirngefäßen | 38 |
| Amyloid/ β 3-Integrin Doppelimmunhistologie | 40 |
| Apoptose in Gehirngefäßen von APP23 Mäusen | 41 |
| Untersuchungen zum Nachweis von funktionell wirksamen Angiogenesefaktoren im Gehirn von APP23 Mäusen | 42 |
| Quantifizierung der neugebildeten Blutgefäße in „Matrigel plug“ | 43 |
| Morphologischer Nachweis von Blutgefäßen in „Matrigel plugs“ mit der Masson Trichrom Färbung | 44 |
| Nachweis von VE-Cadherin in „Matrigel plugs“ | 45 |
| Angiogenesehemmung im „Matrigel plug“ durch Medikamente | 46 |
| Diskussion | 48 |
| Zusammenfassung | 53 |
| Literaturverzeichnis | 54 |
| Abkürzungsverzeichnis | 60 |
| Danksagung | 62 |
| Lebenslauf | 63 |

Einleitung

Die Alzheimer Erkrankung

Die Alzheimer Erkrankung („Alzheimer’s disease“, AD) gehört zur Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen und betrifft ungefähr 2% der Bevölkerung in den Industriestaaten. Betroffene Patienten verlieren langsam ihr Gedächtnis und ihre Merkfähigkeit und durchleiden oftmals schwere Persönlichkeitsveränderungen.

Zurückzuführen ist dies auf eine ausgeprägte Atrophie besonders der für Lernen und Gedächtnisfunktionen wichtigen Hirnregionen, sprich des temporalen und frontalen Cortex. Die Atrophie resultiert aus einem Neuronenuntergang und der Degeneration synaptischer Verbindungen zwischen den einzelnen Nervenzellen (siehe Abb. 1) (36).

Normales Gehirn



Alzheimer Gehirn

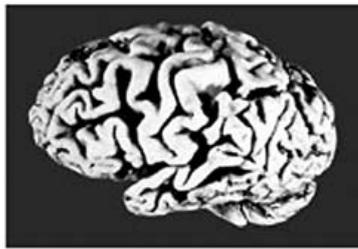


Abb. 1a) Geschrumpfte Gyri und vertiefte Sulci infolge Volumenabnahme frontotemporaler Hirnregionen bei AD (36).

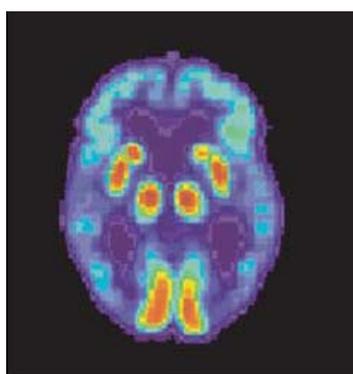
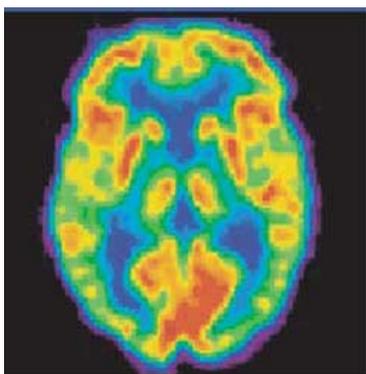


Abb. 1b) Durch den Neuronenuntergang im PET sichtbare typische Verminderung der Stoffwechselaktivität bei AD (36).

Die Diagnose AD kann klinisch nur mit Ungewissheit abgeschätzt werden, definitiv bestätigt werden kann sie nur durch die typische Histopathologie post mortem. Die Erkrankung ist durch Ablagerungen typischer Amyloid β ($A\beta$) Plaques sowie neurofibrillärer „tangles“

gekennzeichnet. Plaques sind extrazelluläre Ansammlungen aggregierter A β -Peptide. Die neurofibrillären „tangles“ befinden sich intrazellulär und bestehen aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein. In der Umgebung von A β -Plaques findet man dystrophe Axone und Dendriten, aber auch aktivierte Mikroglia und reaktive Astrozyten, welche Entzündungsmediatoren freisetzen. Plaques und „tangles“ finden sich nicht nur besonders zahlreich im temporalen und frontalen Cortex, sondern auch in Hippocampus, Amygdala und entorhinalem Cortex und erklären damit auch emotionale Veränderungen von AD Patienten (36).

Meistens tritt AD sporadisch ohne erkennliche Ursache auf. Die A β Plaque Ablagerungen entstehen durch Prozessierung eines Vorläuferproteins, dem „amyloid precursor protein“ (APP). APP wird beim Menschen ubiquitär exprimiert. Durch zerebrale Ischämie, „nerve growth factor“ (NGF), „basic fibroblastic growth factor“ (bFGF), Interleukin-1 β und extrazelluläre Matrix (APP besitzt „collagen-binding-sites“) kann das Expressionslevel erhöht werden. Die physiologischen APP Funktionen sind weitgehend unverstanden. Das Protein reguliert wahrscheinlich neuronales Zellüberleben, Zelladhäsion, Neuritenausprossung und moduliert Synapsenfunktionen. Warum es bei den sporadischen AD Formen zur APP Spaltung und damit zu vermehrten A β Ablagerungen in Hirnparenchym und zerebralen Gefäßen kommt, ist unklar (35, 36).

Bei den selteneren, hereditären Formen manifestiert sich die Krankheit oftmals sehr früh. 3 Gene werden mit dem Auftreten dieser autosomal-dominanten AD Formen in Verbindung gebracht. Entweder eine Mutationen im APP-Gen auf Chromosom 21 oder im Gen für Presenilin-1 (PS-1) auf Chromosom 14 oder im Gen für Presenilin-2 (PS-2) auf Chromosom 1. PS-1 Mutationen treten am häufigsten auf. Mit Ausnahme des Manifestationsalters präsentiert sich der klinische Phänotyp wie bei den sporadischen AD Formen. Die Mutationen führen zu einer gesteigerten Ablagerung von A β , besonders des A β 42 durch beschleunigte Spaltung von APP (32, 34).

Neben den autosomal-dominant erblichen AD Formen existiert ein weiterer Risikofaktor für AD, der APOE ϵ 4 Genotyp. Für Apolipoprotein E (APOE) gibt es 3 verschiedene Allele, APOE ϵ 2, - ϵ 3 und - ϵ 4. APOE ϵ 4 ist mit einer erhöhten A β Produktion assoziiert, wobei sowohl A β 40 als auch A β 42 gleichermaßen vermehrt exprimiert wird. Der Mechanismus für die A β Erhöhung scheint also ein anderer zu sein wie bei den autosomal-dominanten AD Formen. Interessanterweise hat die APOE ϵ 2 Isoform eine schützende Wirkung auf die AD Entstehung (38).

Spaltung von APP und Mechanismen der Amyloidogenese

Amyloid entsteht durch proteolytische Prozessierung von APP durch Sekretasen. Dabei entstehen zwischen 39 und 43 Aminosäure lange A β -Peptide, am häufigsten 40 (A β 40) oder 42 (A β 42) Aminosäure langes A β . A β -Peptide neigen zur Aggregation und lagern sich im weiteren Verlauf als höchst unlösliche Fibrillen in β -Faltblattstruktur ab (39, 46).

Initial erfolgt die Spaltung von APP durch die β -Sekretase. Dabei entsteht ein membranständiges C-terminales Fragment β (CTF- β), welches die gesamte A β Domäne (in Abb. 2 rot und blau markiert) enthält. CTF- β wird intramembranär von der γ -Sekretase gespalten, was in der Freisetzung von A β in den Extrazellulärraum resultiert. Alternativ kann APP auch von der α -Sekretase innerhalb der A β Domäne gespalten werden. Das dabei entstehende APPs- α hat neuroprotektive und gedächtnisfördernde Effekte (68). CTF- α ist ebenfalls Substrat der γ -Sekretase. Da die α -Sekretase jedoch innerhalb der A β Domäne spaltet, entsteht letztendlich kein A β , sondern das sogenannte p3 Protein (siehe Abb. 2) (72).

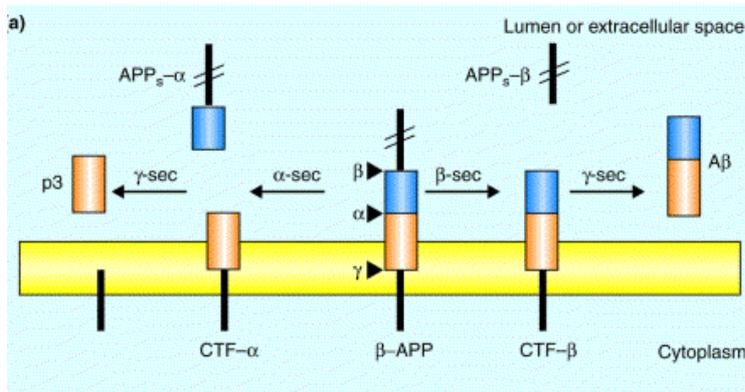


Abb. 2) Proteolytische Prozessierung von β -APP durch Sekretasen. Die Spaltungsstellen für die α -, β - und γ -Sekretase sind durch Pfeile gekennzeichnet. β -APP kann durch die α -Sekretase in der A β -Domäne gespalten werden. Es entsteht lösliches APPs- α und membrangebundenes CTF- α . Alternativ kann β -APP durch die β -Sekretase gespalten werden. Das dabei entstehende CTF- β enthält die gesamte A β Domäne. Sowohl CTF- α als auch CTF- β ist Substrat für die γ -Sekretase, es entsteht jedoch nur bei der Spaltung des CTF- β das für die Alzheimer Erkrankung bedeutsame A β (72).

Die γ -Sekretase kann innerhalb der Transmembrandomäne an mindestens 3 verschiedenen Stellen spalten und damit A β -Peptide unterschiedlicher Länge freisetzen. Es können prinzipiell 3 verschiedene A β -Peptide entstehen. A β 40 wird durch Spaltung nach der 40. Aminosäure von A β erzeugt, das in ca. 10% der Fälle entstehende A β 42 analog nach der 42.

Aminosäure. Auch ein 38 Aminosäure langes A β Peptid kann entstehen. Obwohl A β 42 seltener vorkommt, hat es eine stärkere Neigung zur Aggregation und ist Hauptbestandteil der Amyloid Plaques (69, 71).

Der γ -Sekretase Komplex besteht aus 4 verschiedenen Proteinen, dem Presenilin, Nicastrin, „anterior pharynx defective-1“ (Aph-1) und „presenilin enhancer-2“ (Pen-2) (siehe Abb. 3). Die Preseniline bestimmen die katalytische Aktivität des Komplexes. Durch Mutationen in den Presenilin Genen wird bei den hereditären AD Formen beschleunigt Amyloid, besonders A β 42 gespalten (32). Der γ -Sekretase Komplex hat neben APP weitere Substrate, wie z.B. apoER2 Lipoprotein Rezeptor, „low-density lipoprotein receptor-related protein“, ErbB4 Rezeptor Tyrosinkinase, CD44 und Notch-1. Viele dieser Proteine sind für die Entwicklung des zentralen Nervensystems von Bedeutung. Notch-1 ist ein für Zellentwicklung und Signaltransduktionswege wichtiges Transmembranprotein. Es ist sowohl während der Embryogenese als auch im Erwachsenenalter erforderlich. Durch Spaltung von Notch-1 entsteht ein C-terminales Fragment, welches im Zellkern als Koaktivator bei der Transkription seine Funktion hat (32, 68).

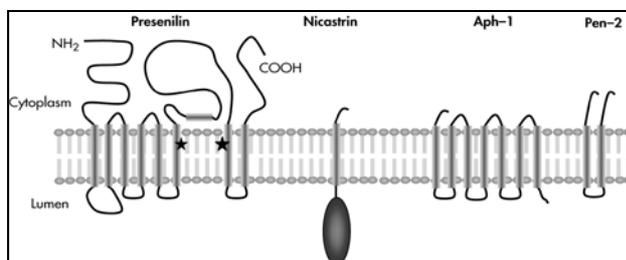


Abb. 3) Aufbau des γ -Sekretase Komplexes (32)

Sekretasen als Therapieziel bei der Alzheimer Erkrankung

Die Reduktion der A β -Produktion, entweder durch Hemmung der β - oder γ -Sekretase Aktivität bzw. durch Steigerung der α -Sekretase Aktivität und damit Förderung des nicht amyloidogenen Wegs der APP Prozessierung erscheint therapeutisch sinnvoll.

γ -Sekretase Aktivität kann durch Inhibitoren wie z.B. „compound STI571“ (Gleevec) oder JLK Inhibitoren, aber auch durch „non-steroidal antiinflammatory drugs“ (NSAIDs) gehemmt werden. Da die γ - Sekretase neben APP viele andere Substrate hat, ergeben sich durch ihre Inhibition zahlreiche Nebenwirkungen. PS-1 defiziente Mäuse, welchen damit die katalytische Aktivität der γ - Sekretase fehlt, entwickeln skelettale und neurologische, letztlich letal endende Fehlbildungen (50). Wurden Mäusen im Erwachsenenalter mit einem γ -

Sekretase Inhibitor therapiert, traten ungünstige Effekte bei der Lymphozytenreifung und der intestinalen Zelldifferenzierung auf (75). Diese Beobachtungen wurden auf eine inhibierte Notch Prozessierung zurückgeführt. Trotzdem bleibt die Hemmung der γ -Sekretase ein favorisiertes Therapieziel bei AD (68).

Mitglieder der „a disintegrin and metalloprotease“ (ADAM) Familie, besonders ADAM-10 und ADAM-17 scheinen α -Sekretase Aktivität zu haben. Mäuse mit neuronaler Überexprimierung der ADAM 10 produzierten mehr neuroprotektives APPs- α , weniger A β , bildeten verzögert Plaques aus und zeigten einen langsameren kognitiven Abbau (45). Muscarinagonisten, Östrogene und Cholesterinsenker (Statine) können die α -Sekretase Aktivität erhöhen. Da auch die α -Sekretase andere Substrate, wie z.B. „Tumor Nekrose Faktor α “ (TNF- α), Notch, Kollagen Typ IV, „transforming growth factor β (TGF- β)“ hat, sind durch Inhibition ebenso Nebenwirkungen zu erwarten (68).

Das Enzym für die Spaltung des APP an der β -Sekretase Stelle ist das sogenannte „ β -site APP cleaving enzyme“ (BACE-1) (72). Knockout Mäuse für BACE-1 zeigten geringere A β Produktion bei phenotypisch normalem Habitus und normaler Fortpflanzung (33). BACE-1 Inhibition scheint also ein attraktives therapeutisches Ziel zu sein. Das Enzym hat jedoch eine sehr große Substratbindungsstelle, so dass passende und selektive Inhibitoren für BACE meist zu groß sind, um die Blut-Hirn-Schranke erfolgreich zu überwinden (68).

Die „Amyloid Kaskaden Hypothese“

Amyloid Ablagerungen gelten als typisch pathomorphologisches Korrelat für AD. Es gibt verschiedene Erklärungsmodelle, welche Substrate und Mechanismen letztendlich die klinische Symptomatik, die Demenz hervorrufen.

Die „Amyloid Kaskaden Hypothese“ nimmt als entscheidendes Ereignis in der AD Pathogenese die Entstehung von A β Plaques mit konsekutiver Neuriten- und Synapsendysfunktion, Ausbildung neurofibrillärer „tangles“, letztendlich die Induktion von Neuronenuntergang und dadurch die Entwicklung einer Demenz an (36, 16). Für die „Amyloid Kaskaden Hypothese“ spricht die Tatsache, dass aggregiertes A β in vitro auf kultivierte Neurone toxisch wirkt, die Hyperphosphorylierung von Tau-Protein triggert und schließlich zum Neuronentod führt (78). Auf der anderen Seite korreliert die Dichte post mortem nachweisbarer fibrillärer Amyloid Plaques kaum mit der Schwere der Demenz (71, 16).

Kurz gesagt, die klassische „Amyloid Kaskaden Hypothese“ untersucht die Wirkung von fibrillärem, aggregiertem A β (16). Es gibt jedoch kürzlich viele Daten, dass nicht nur extrazellulär in Fibrillen abgelagertes A β , sondern auch prä-fibrilläre Formen schädigenden Einfluß auf die Umgebung ausüben können (71). Zu Beginn der Alzheimer Erkrankung sind nur monomere A β -Peptide vorhanden, welche sich zu Oligomeren und schließlich zu fibrillären Amyloid Plaques organisieren. Obwohl Monomere, Oligomere und das fibrilläre Amyloid gleiche Aminosäuresequenzen besitzen, weisen sie eine unterschiedliche Sekundärstruktur und damit andere physiologische Eigenschaften auf. Mono- und Oligomere sind löslich, Amyloid Fibrillen und Plaques hingegen durch Ausbildung einer β -Faltblattstruktur unlöslich und nur schwer von Proteasen spaltbar (40, 46).

A β ist beim Menschen ein natürliches Produkt und kommt physiologisch in Blut und Liquor vor. Die alleinige Anwesenheit von A β löst also noch nicht zwingend eine Demenz aus. Vielmehr scheinen die unterschiedlichen Grade der Aggregation von A β toxische Effekte zu besitzen (71). Es gibt mehrere Studien, welche die Wirkung der unterschiedlich aggregierten A β Formen untersucht haben:

Selkoe et al. zeigte, dass die Konzentration löslicher A β -Oligomere im Liquor sehr gut mit der Abnahme der Synapsendichte korreliert. In einem transgenen Mausmodell der AD konnte eine Reduktion präsynaptischer Enden um bis zu 30% zu einem Zeitpunkt festgestellt werden, zu dem nur lösliches A β und noch keine A β -Plaques vorhanden waren (49). In einer Arbeit von Cleary et al. wurden Ratten humane A β -Oligomere intrazerebroventrikulär injiziert. Die Gedächtnisleistung wurde danach anhand des „lever cyclic ratio test“ (ALCR) bestimmt. Dabei mussten die Ratten in einer bestimmten Reihenfolge 2 Hebel zum Futtererwerb drücken. Nach der Injektion löslicher A β -Oligomere schnitten die Ratten im ALCR Test signifikant schlechter ab. Die Effekte traten zwar nur vorübergehend auf, deuten aber auf einen direkten Zusammenhang zwischen dem Verlust kognitiver Leistungen und der A β -Oligomer Quantität hin. Bei Injektion von A β -Monomeren resultierte kein Abfall von Gedächtnisleistungen (8). Tamagno et al. zeigte, dass Neurone in vitro nach Inkubation mit A β -Oligomeren signifikant mehr oxidative Stressprodukte ausschütten und eine höhere Apoptoserate zeigen als nach Inkubation mit fibrillärem A β . Interessanterweise konnte fibrilläres A β im Gegensatz zu den A β -Oligomeren die Expression der β -Sekretase auf Proteinebene verstärken und die Anzahl der APP Spaltprodukte im Medium erhöhen. Sowohl die fibrilläre wie auch die lösliche A β Form wirkt also auf verschiedene Art und Weise schädigend auf umgebendes Gewebe (59).

Interessant ist weiterhin, dass eine erhöhte Sekretion von A β mit einer gesteigerten neuronalen und synaptischen Aktivität zu korrelieren scheint. Diese Annahme passt zu der Beobachtung, dass AD Pathologie besonders in Hirnregionen auftritt mit hoher, basaler metabolischer Aktivität. Geistige Agilität scheint trotzdem vor AD Entstehung zu schützen, da dadurch wohl der erhöhte Stoffwechsel in Hirnregionen „umgeleitet“ wird, welche für die AD Entstehung nicht sehr vulnerabel sind (51).

Welche therapeutischen Konsequenzen lassen sich aus dem Gesagten ableiten? In Anlehnung an genannte Studienergebnisse, scheint A β auf jeder Stufe der Aggregation ungünstige Einflüsse auf die Zellfunktion zu haben. Wie in der Arbeit von Cleary et al. gezeigt, war im Tiermodell der auf A β -Oligomer Ablagerungen zurückzuführende kognitive Leistungsabfall reversibel (8). Es erscheint daher therapeutisch besonders sinnvoll, zu einem frühen Zeitpunkt die toxische A β -Oligomer Bildung zu unterbinden (71). Inhibition von Sekretasen würde in einem sehr frühen Schritt der Amyloidogenese eingreifen und bereits die Entstehung von A β -Monomeren verhindern. Die kritische Monomer Konzentration, ab welcher die Aggregation zu Oligomeren beginnt, würde idealerweise damit nicht erreicht werden. Ein „steady state level“ durch ein Gleichgewicht zwischen Abbau und Produktion von wenig toxischen Monomeren erscheint erstrebenswert. (siehe Abb. 4, Punkt 1) (71, 68).

Abb. 4 gibt eine Übersicht, an welcher Stelle der Amyloidaggregation der Einsatz therapeutischer Agentien sinnvoll erscheint. Die Entwicklung entsprechender Medikamente ist besonders an den Punkten 3 und 4, also bei der Stabilisierung oder Degradation von A β -Monomeren noch nicht weit fortgeschritten. Die Testung von Antikörpern, welche die Elimination von fibrillärem A β zum Ziel haben (Punkt 5), wurde durch schwere Komplikationen wie dem Auftreten von Enzephalitiden gestoppt (71).

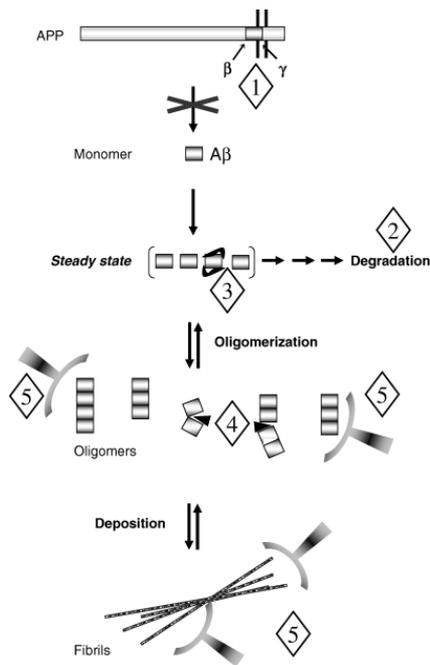


Abb. 4) Mögliche therapeutische Ansätze zur Unterbindung der Amyloid Bildung im Gehirn auf verschiedenen Stufen der Aggregation (71).

Die zerebrale Amyloidangiopathie (CAA)

Wie bereits erwähnt ist APP ein ubiquitäres Protein und kommt physiologisch in Plasma und Liquor vor (50, 71). Bei AD wird es zwar besonders stark in Neuronen exprimiert, aber auch durch das Endothel der Gehirngefäße wird APP gespalten und A β sezerniert. Im Laufe der Erkrankung kommt es zu strukturellen Veränderungen der Gefäßwand, der sogenannten zerebralen Amyloidangiopathie („cerebral amyloid angiopathy“, CAA), ein bei fast allen AD Patienten zu beobachtendes Phänomen. CAA ist gekennzeichnet durch eine Atrophie der glatten Gefäßmuskulatur, Endothelzelldegeneration mit „tight junction“ Verlust, Basalmembranverdickung und Akkumulation von Entzündungsmediatoren. Folgen der CAA sind hämorrhagische Läsionen der weißen Substanz infolge von Basalmembraneinrissen, eine Einengung des Gefäßlumens mit chronischer Hypoperfusion und gestörter Blut-Hirn-Schrankenfunktion (26). CAA tritt zwar häufiger bei AD, aber auch sporadisch in 10-40% während des Alterungsprozesses ohne dementielle Symptome auf. Häufiger ist das kürzere A β 40, seltener das A β 42 in der Gefäßwand nachweisbar. Zumeist handelt es sich dabei um fibrilläres A β , aber auch monomere und oligomere lösliche Formen werden zwischen und im Cytoplasma glatter Gefäßmuskulatur gefunden (46).

Initial lagert sich Amyloid im Bereich der glatten Muskulatur abluminal entlang der Tunica media und der Adventita ab (milde Form der CAA). Schließlich wird die glatte Muskulatur und damit die Gefäßarchitektur zerstört (moderate Form der CAA). Zuletzt entstehen infolge

fibrinoider Nekrosen Mikroaneurysmen mit kleinen perivaskulären Leckagen. Häufigste klinische Manifestationsform ist die spontane, intrazerebrale Blutung (schwere Form der CAA) (54, 46).

Beeinflussung der Gefäßfunktion durch A β

Es wurden bisher besonders die Effekte von Amyloid auf Neurone dargestellt; A β beeinflusst darüber hinaus auch die Funktion von Gefäßen und hat direkte Wirkungen auf das Endothel. A β kann die Schwelle für z.B. Serotonin vermittelte Vasokonstriktion herabsetzen und die z.B. durch Bradykinin vermittelte Vasodilatation vermindern. Diese Effekte konnten von Thomas et al. in vitro durch Inkubation boviner, cerebraler Arterien mit A β 1-40 (62) als auch von Iadecola et al. in vivo in einem transgenen Mausmodell gezeigt werden (20). In beiden Fällen konnte die verstärkte, A β -induzierte Vasokonstriktion durch die antioxidative Wirkung von Superoxiddismutase (SOD) geblockt werden. Dies lässt vermuten, dass die endotheliale Dysfunktion durch A β über reaktive O $_2$ Spezies ausgelöst wurde. Da in dem in vitro Versuch keine Effekte in Endothelium-freien Gefäßen induziert wurden, ist eine direkte Interaktion von A β mit dem Endothel naheliegend. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der bovinen Blutgefäße zeigten ausgeprägte, nekrotische Schäden des Endothels, welche in vivo normalerweise von einer entzündlichen Reaktion begleitet werden (siehe Abb. 5) (62)

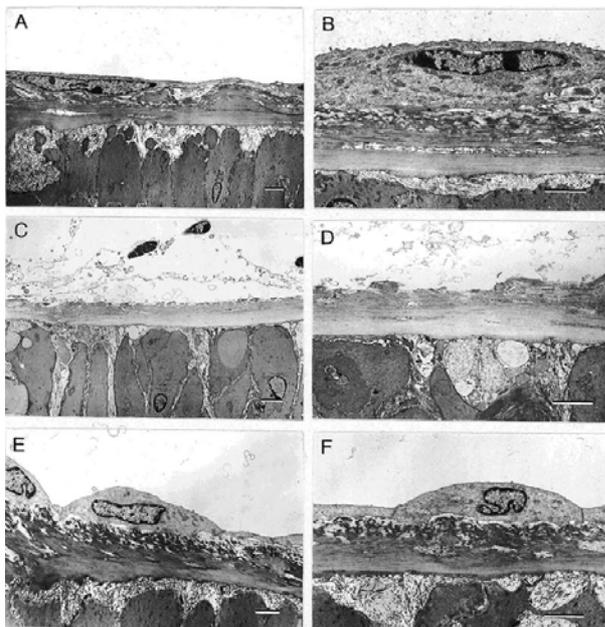


Abb. 5)

- (a) Intaktes Endothel
- (b) intakte Zell-, Kern- und mitochondriale Membrane und Bindegewebe zwischen Lamina elastica interna und glatter Muskulatur
- (c) Endothelialer Zellschutt und Kerntrümmer oberhalb der Lamina elastica interna nach A β Inkubation
- (d) zusätzlicher glatter Muskelzellschaden nach A β Inkubation
- (e) Intaktes Endothel in einem A β +SOD behandelten Gefäß
- (f) Intakte interzelluläre Brücken in einem A β +SOD behandeltem Gefäß (62)

Die Effekte von A β auf das Endothel wurden in vitro durch lösliches Amyloid hervorgerufen. Es ist eine mögliche Hypothese, dass durch das Auftreten endothelialer Nekrose sekundär in umschriebenen Hirnregionen ein Neuronenschaden durch ischämische oder entzündliche Prozesse induziert wird und damit die endotheliale Schädigung möglicherweise ein sehr frühes Ereignis in der AD Pathogenese darstellt (62).

Die Induktion von Apoptose, erhöhter Endothelzellpermeabilität sowie zytotoxischen Wirkungen von löslichem A β durch freie Radikale und oxidativen Stress konnte in vitro in Endothelzellen, Hirnperizyten und glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt werden (3, 17). Interessanterweise wurden diese Effekte durch stark aggregiertes, fibrilläres A β in vitro nicht mehr hervorgerufen (17).

Versuche an transgenen Tieren mit AD zeigen im Vergleich zu Kontrollmäusen eine Verminderung des physiologischerweise von der neuronalen Aktivität regulierten zerebralen Blutflusses („cerebral blood flow“, CBF) nach Stimulation des somatosensiblen Cortex. Zum Untersuchungszeitpunkt waren die transgenen Tiere so jung, dass der verringerte CBF nicht auf strukturelle Gefäßwandveränderungen durch CAA zurückgeführt werden konnte (41). Auch in vivo scheint es, als hätte die lösliche A β Form primäre, direkte Effekte auf das Endothel (41, 20). Endotheliale Dysfunktion ist nicht nur über die Auslösung von oxidativem Stress möglich. In der Literatur wird durch im Blutstrom zirkulierendes, lösliches A β eine Hemmung der eNOS („endothelial nitric oxide synthase“) Enzymaktivität in Endothelzellen durch eine Beeinträchtigung PKC (Protein Kinase C) abhängiger Signalwege beschrieben (11).

Amyloid kann in vivo endotheliale Dysfunktion oder in vitro sogar Endothelzellapoptose auslösen. Es ist eine mögliche Hypothese, dass aufgrund endothelialer Schädigung Reparaturmechanismen im Sinne von Angiogenese, welche eventuell die Pathogenese von AD beeinflusst, aktiviert werden.

Kardiovaskuläre Medikamente wirken präventiv auf die AD Entstehung

Einen weiteren Hinweis, dass das Gefäßsystem für die Pathogenese von AD von Bedeutung sein könnte, liefern die Ergebnisse epidemiologischer Studien. Diese zeigen, dass Patienten, die über längere Zeit NSAIDs einnahmen, welche neben antientzündlichen auch vaskuläre Effekte besitzen, ein geringeres Risiko für die Entwicklung von AD hatten (9, 74, 58). Die Studie von in't Veld et al. konnte dies insbesondere für Patienten mit einer NSAID Exposition

von über 24 Monaten zeigen; das relative Risiko wurde auf 0,2 reduziert. Wurden die NSAIDs nur zwischen 1 und 23 Monaten eingenommen, war die relative Risiko Reduktion mit 0,83 nicht signifikant. Patienten mit einer Expositionszeit unter 1 Monat profitierten überhaupt nicht (21). Die Bedeutung dieser Medikamente liegt in der präventiven Wirkung bei Langzeiteinnahme. Ergebnisse klinischer Studien zeigen zum momentanen Zeitpunkt keine therapeutischen Effekte von NSAIDs bei weit fortgeschrittener AD Pathologie (37). In transgenen Mausmodellen der AD konnte jedoch durch Ibuprofen Gabe sogar ein Rückgang der A β -Plaques Quantität und eine Verbesserung kognitiver Leistungen im Vergleich zur nicht therapierten Vergleichsgruppe nachgewiesen werden (29, 30).

Warum wirken NSAIDs überhaupt protektiv auf die AD Entstehung? Im Gehirn werden bei AD Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine, Zytokine, Complementfaktoren u.a. verstärkt ausgeschüttet. Aktivierte Mikroglia in der Umgebung der A β -Plaques produziert toxisches Material wie z.B. freie O $_2$ -Radikale. COX-1 (Cyclooxygenase 1), ein wichtiges Enzym der Entzündungskaskade, wird in aktivierter Mikroglia hochreguliert. Klassische NSAIDs hemmen die COX-1 und -2 Aktivität, können damit im Gehirn die Entzündung vermindern und so den Progress der Erkrankung möglicherweise eindämmen. Interessanterweise zeigen selektive COX-2 Inhibitoren keine präventive Wirkung (37).

Neben der anti-entzündlichen Wirkung hemmen NSAIDs die Angiogenese durch direkte Wirkung auf Endothelzellen in vitro. Dabei blockieren sowohl unselektive NSAIDs wie auch selektive COX-2 Inhibitoren direkt die mitogen-aktivierte-Protein (MAP) Kinase ERK1/2, welche notwendig für die Angiogeneseinduktion in vitro ist. MAP Kinase hat wichtige Funktionen bei der Signaltransduktion und der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die letztendlich für die Zellproliferation und -differenzierung nötig sind (24).

NSAIDs hemmen auch die COX in Blutplättchen. Damit verbunden ist eine verminderte Thrombozytenaggregation sowie eine verminderte Freisetzung von Plättchenfaktoren, aber auch von APP und A β . Es wird vermutet, dass die präventive Wirkung von NSAIDs nicht zuletzt auf die verringerte Freisetzung von A β aus Thrombozyten zurückzuführen ist (79).

In kultivierten Zellen sowie in Mausmodellen für AD vermindern NSAIDs die Sekretion des stark amyloidogenen A β 42 Peptids. Dieser Effekt tritt unabhängig von der Hemmung der COX Aktivität auf. Wahrscheinlich wird die γ -Sekretase Funktion durch NSAIDs so verändert, dass statt A β 42 kleinere, weniger zur Aggregation neigende A β -Peptide, vor allem 38 Aminosäuren langes A β sezerniert wird. Die dazu benötigte NSAID Konzentration ist so gering, dass die Prozessierung anderer Substrate der γ -Sekretase nicht beeinflusst wird.

NSAIDs haben somit gegenüber sich in Erprobung befindenden γ -Sekretase Inhibitoren einen entscheidenden Vorteil (73).

Aber nicht nur NSAIDs, sondern auch Medikamente ohne anti-entzündliche Wirkung wie H2 Blocker, Statine und Calciumkanalblocker zeigen präventive Effekte auf die Entwicklung von AD. Wahrscheinlich trägt also nicht vorrangig die Ausschaltung entzündlicher Aktivitäten im AD Gehirn zur schützenden Wirkung bei, sondern vielmehr eine für alle genannten Medikamente gleichermaßen bekannte anti-Angiogenese Wirkung (66).

Mechanismen der Angiogenese

Unter Angiogenese versteht man die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen. Beim Erwachsenen ist sie die häufigste Ursache für die Entstehung neuer Blutgefäße, meistens ausgelöst durch Entzündungsmediatoren oder Hypoxie. Letztere triggert das Gefäßwachstum durch die verstärkte Expression von Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren („hypoxia-inducible transcription factors“, HIF). HIFs vervielfachen die Expression von „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF), welcher die vaskuläre Permeabilität erhöht. Dadurch kommt es zur Extravasation von Plasmaproteinen wie Fibrin und Fibronectin, welche eine provisorische Matrix bilden, auf der Endothelzellen migrieren können. Notwendige Voraussetzung für die Migration ist die Auflösung von Kontakten zwischen den Endothelzellen und der extrazellulären Matrix („extracellular matrix“, ECM).

Die Zellen eines Gewebes sind in der ECM eingebettet. Sie besteht aus Kollagen IV, Laminin, Kollagen I, Elastin und anderen Proteinen. Die ECM ist wichtig für die Kontakte der Endothelzellen untereinander und zum umgebenden Gewebe. Die ECM verleiht den Blutgefäßen mechanische Stabilität.

Proteinasen, wie z.B. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), können Proteine der ECM für die Migration von Endothelzellen bei der Angiogenese spalten. Dabei werden auch neue Epitope („cryptic binding sites“) von ECM Proteinen freigelegt, Wachstumsfaktoren wie VEGF, „basic fibroblastic growth factor“ (bFGF) und TGF- β sowie Chemokine (z.B. IL-1 β) freigesetzt. Sie alle wirken als angiogene Stimuli, in deren Richtung proliferierende Endothelzellen migrieren.

Sich während der Angiogenese ausbreitende Endothelzellen müssen, um neue Gefäße bilden zu können, wieder Kontakt zur ECM bekommen. Dazu sind Moleküle wie die β 3-Integrine wichtig. Fehlen die Kontakte zur umgebenden Matrix, werden die Endothelzellen apoptotisch. Man spricht hier von Anoikis, einer Sonderform der Apoptose.

Es bilden sich unreife endotheliale Netzwerke aus. Angiopoietin 1, TGF- β und „platelet derived growth factor“ (PDGF) rekrutieren die Einwanderung glatter Muskelzellen, die das Gefäß stabilisieren und ausreifen lassen. Ohne den Kontakt zur ECM und der Rekrutierung glatter Muskelzellen gehen die unreifen, nur mit Endothelzellen gesäumten Gefäße zugrunde. Sobald die Organisation zu Zellverbänden abgeschlossen ist, können die Endothelzellen jahrelang überleben und differenzieren je nach den Erfordernissen des Ursprungsgewebes aus, so bilden z.B. Gefäße im Gehirn die Blut-Hirn-Schranke aus. Über den letzten Schritt der Angiogenese, dem sogenannten „remodeling“, d.h. der korrekten Ausbildung eines komplexen 3-dimensionalen Gefäßnetzwerkes und des Wiederanschlusses an bereits bestehende Gefäße, ist relativ wenig bekannt (6,7).

$\alpha_v\beta_3$ Integrin

Integrine sind heterodimere Zelloberflächenmoleküle, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit. Integrine sind wichtige Rezeptoren für Proteine der ECM und steuern somit die Zelladhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung von Zellen. Ohne den Kontakt zur ECM gehen Endothelzellen die sogenannte Anoikis ein.

Das $\alpha_v\beta_3$ Integrin wird während der Angiogenese auf Endothelzellen exprimiert. Sein Kontakt zur ECM stimuliert die Angiogenese, indem es die Endothelzellproliferation fördert, Signale der Apoptose unterdrückt, die Zellmotilität unterstützt und durch VEGF in seiner Funktion noch zusätzlich aktiviert wird. Antagonisten des β_3 -Integrins sind potente Inhibitoren der Tumor-, VEGF- und Hypoxie-induzierten Angiogenese. Interessanterweise haben die β_3 -Integrin Antagonisten auf ruhende Gefäße, die nicht von der Angiogenese betroffen sind, keine Effekte. Da die Ligation des β_3 -Integrins für das Überleben von Endothelzellen während der Angiogenese erforderlich ist, scheint β_3 -Integrin ein positiver Regulator der Angiogenese zu sein (4, 48).

Auf der anderen Seite zeigten Mäuse mit einem knock out für $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$, beides Integrine die während der Angiogenese verstärkt exprimiert werden, keine gestörte embryonale Gefäßentwicklung. Postnatal war durch Hypoxie, VEGF und Tumorzellen sogar eine verstärkte Angiogenese und beschleunigtes Tumorstadium auslösbar. Aufgrund dieses Ergebnisses wird β_3 -Integrin auch als ein negativer Regulator der Angiogenese diskutiert (47).

Die „Angiogenese Hypothese“

In vitro hat A β auf GefäÙe schädigenden Einfluss, möglicherweise kommt es zur Induktion von Ischämien und Entzündungsvorgängen in der Umgebung (62). Neuronenuntergang im Parenchym ist begleitet von Aktivierung der Mikroglia mit Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (37). Alle genannten Faktoren stellen potente Stimuli für die Angiogeneseinduktion dar (6, 7). Welche zusätzlichen Faktoren für Auslösung von Angiogenese im AD Hirn auftreten, wird im Folgenden diskutiert:

1.) CAA führt zu strukturellen Veränderungen der Mikrovaskulatur mit Hypoperfusion und Auslösung von Hypoxie (26). Hypoxie bewirkt die Ausschüttung des Angiogenese- und Permeabilitätsfaktors VEGF. Er hat seinen Rezeptor ausschließlich auf Endothelzellen und stellt so einen Proliferationsstimulus für Gefäßneubildung dar (52). Im AD Gehirn wird eine Akkumulation von VEGF in Astrozyten und Gefäßwänden beschrieben. Je stärker die CAA umso mehr VEGF ist nachweisbar. Es ist denkbar, dass VEGF gerade bei ausgeprägter CAA und daraus folgender Hypoperfusion als Reparaturmechanismus zur Erhöhung der vaskulären Permeabilität und Verbesserung der Nährstoffversorgung des Gehirns rekrutiert wird (25).

2.) Im Liquor von AD Patienten werden wahrscheinlich als Antwort auf endotheliale Schädigung Entzündungsmediatoren wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) hochreguliert. Dies korreliert mit erhöhten Konzentrationen der Angiogenesefaktoren VEGF und TGF- β , deren Ausschüttung von TNF- α getriggert wird. TGF- β kann als antiinflammatorisches Zytokin nicht nur die TNF- α Produktion und die Aktivierung von Mikroglia verhindern. TGF- β kann zusätzlich zur Angiogeneseinduktion in Mausmodellen auch die Amyloidogenese fördern (60). Entzündungsmediatoren werden auch aus der Mikrovaskulatur von AD Patienten freigesetzt. Kultivierte AD GefäÙe setzen signifikant mehr Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 und TNF- α im Vergleich zu KontrollgefäÙen frei (13).

3.) Die genannten Mediatoren könnten zusammen mit dem Amyloid der Gefäßwand zur Produktion von O₂ Radikalen anregen oder eine vermehrte A β Freisetzung aus GefäÙen triggern oder auch Angiogenese induzieren (13). Weiterhin ist bekannt, dass Heparansulfatproteoglykane in neurofibrillären „tangles“ bFGF (53) und Amyloid VEGF mit picomolarer Affinität bindet (77). Sowohl VEGF wie auch bFGF sind Wachstumsfaktoren der Angiogenese. Zusammenfassend kann man sagen, dass im AD Hirn genug Faktoren vorkommen, welche das Auftreten von Angiogenese ermöglichen könnten.

Es wurde eine Hypothese, wie die endotheliale Aktivierung und Angiogeneseinduktion das Krankheitsgeschehen von AD beeinflussen könnte, formuliert. Amyloid Plaques setzen reaktive O₂ Spezies frei, welche das Endothel schädigen. Dabei entsteht eine thrombogene Region an der Gefäßwand mit Thrombinakkumulation. Thrombin wird in der Literatur als ein potenter Angiogeneseinduktor beschrieben. Möglicherweise hat Thrombin synergistische Effekte mit VEGF durch die (in vitro gezeigte) verstärkte Expression von VEGF Rezeptoren auf Endothelzellen (64). Thrombinbehandlung von kultivierten Endothelzellen erhöht die β3-Integrin Expression auf mRNA und Proteinebene und potenziert die Endothelzellmigration. Außerdem ist immobilisiertes Thrombin ein Ligand des β3-Integrins und stimuliert dadurch die Angiogenese (65). Endothelzellen können durch Thrombin aber auch zu APP und Aβ Ausschüttung veranlasst werden, was wiederum die Plaque Bildung im Hirnparenchym unterstützt. Damit beginnt mit der Ausschüttung reaktiver O₂ Metabolite aus Aβ Plaques der „circulus vitiosus“ von vorne. Ein weiterer postulierter Mechanismus ist die Freisetzung eines löslichen, neurotoxischen Proteins aus dem Endothel (66). Isoliert man Gefäße von AD Patienten, so können diese tatsächlich in vitro den Zelltod von Neuronen provozieren (12). Paradoxe Weise ist es damit möglicherweise die eigentlich als Reparaturmechanismus gedachte Angiogenese, welche den Untergang von Neuronen und so die Progression von AD vorantreibt.

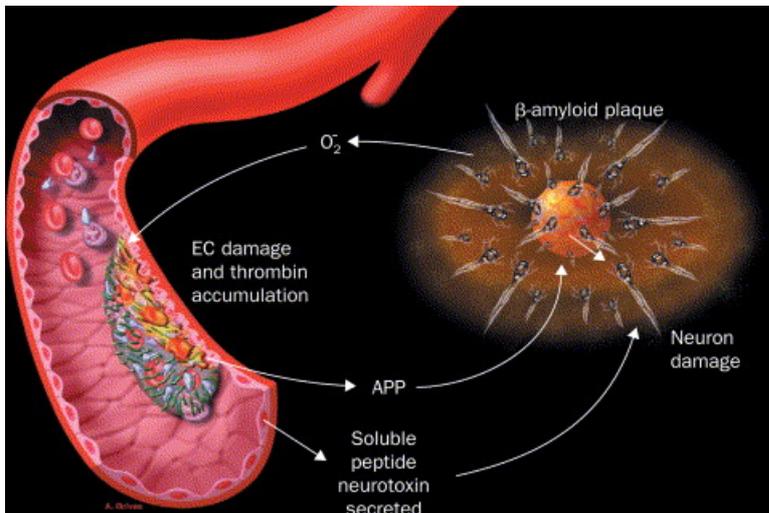


Abb. 6) Ausschüttung von O₂ Spezies aus den Aβ Plaques schädigt das Gefäßendothel. Dadurch kommt es zur Expression von APP und Aβ in Endothelzellen und zur Freisetzung eines neurotoxischen Peptids. Beide Mechanismen tragen möglicherweise zum Neuronentod und zur Progression von AD bei (66).

Hemmung der Angiogenese durch A β

Durch in vitro Studien wurde gezeigt, dass A β -Peptide die Angiogenese auch hemmen können. Je höher die Konzentration an A β , desto stärker wird die β -Faltblattstruktur ausgebildet und umso potenter ist die Angiogenesehemmung. In sehr hohen Konzentrationen konnte auch endotheliale Apoptose beobachtet werden. Die Mechanismen, durch die A β die Angiogenese beeinflusst sind unklar. Möglich wäre z.B., dass die endotheliale Apoptose als limitierender Faktor auftritt oder die Zellzyklusprogression bzw. die Zelladhäsion beeinträchtigt werden. Im Gegensatz dazu kann A β in geringer Konzentration die Ausbildung von Mikrogefäßen sogar fördern. Ist A β niedrig konzentriert, ist auch die β -Faltblattstruktur geringer ausgebildet (44). Überdies ist bekannt, dass VEGF an extrazelluläre Matrixproteine (63) sowie an Amyloid mit hoher Affinität bindet (77). Es wäre denkbar, dass VEGF über diese Mechanismen nach seiner Ausschüttung immobilisiert und inaktiviert wird und damit für Angiogeneseinduktion im AD Hirn nicht mehr zur Verfügung stehen kann.

Das APP23 Maus Modell

In der transgenen APP23 Mauslinie wird humanes APP751 mit der schwedischen Doppelmutation unter der Kontrolle des Thy-1 Promotors siebenmal stärker verglichen mit endogenen Maus APP exprimiert. Die ersten A β -Plaque Ablagerungen bei den Tieren finden sich im Alter von 6 Monaten. Plaques lagern sich zunächst im Frontalhirn ab, breiten sich mit zunehmendem Alter auf den gesamten Neocortex und den Hippocampus aus. Nur das Kleinhirn bleibt von den Plaque Ablagerungen verschont. Assoziiert mit der Plaque Bildung sind Neuronenuntergang, Entzündungsreaktionen mit Aktivierung von Mikroglia, Synapsendegeneration und Tau Hyperphosphorylierung. Ab dem 1. Lebensjahr werden auch Amyloidablagerungen in Gefäßen gefunden (56, 57). Mit fortschreitendem Krankheitsprozess breitet sich das Gefäßamyloid vom Endothel bis ins umgebende Neuropil aus. Die Basalmembran wird dabei zerstört. Ab diesem Zeitpunkt kann in der Umgebung betroffener Gefäße ebenfalls Neuronenuntergang, Synapsendystrophie und aktivierte Mikroglia verzeichnet werden, was als Hinweis für die Beteiligung des Gefäßsystems in der Pathophysiologie von AD gewertet werden darf. Ausgelöst wird diese Veränderungen entweder durch toxische Effekte von A β oder infolge einer beeinträchtigten Diffusion von Nährstoffen durch das beschädigte Gefäßsystem ins Parenchym (5).

APP wird unter physiologischen Bedingungen ubiquitär exprimiert (35). Im APP23 Maus Modell wird das transgene APP jedoch nur im Gehirn, genauer nur in Neuronen exprimiert. Trotzdem wird bei diesen Tieren CAA beobachtet, obwohl in den Gefäßen selbst kein APP überexprimiert wird (5).

Es gibt drei Haupthypothesen bezüglich des Ursprungs von Gefäßamyloid:

Die systemische Hypothese geht davon aus, dass Gefäßamyloid aus dem Blutstrom stammt. Da APP ubiquitär vorkommt und beim Menschen A β auch im Blut nachgewiesen werden kann, wird angenommen, dass A β rezeptorvermittelt die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und so die Ablagerung im Gefäß gelingt. Bei APP23 Mäusen ist keine erhöhte A β Quantität im Blutstrom nachweisbar; die systemische Hypothese als Ursache für die CAA damit unwahrscheinlich (17).

In der Gefäßwandhypothese nimmt man an, dass CAA auf eine lokale Produktion von A β durch Endothelzellen zurückzuführen ist. Im Tiermodell ist diese Hypothese so nicht haltbar. Bisher gibt es kein Modell, in dem A β ausschließlich in der Gefäßwand und nicht auch in anderen Geweben produziert wird (17).

Die neuronale Hypothese ist am weitesten verbreitet und gilt auch für das APP23 Tiermodell. Bei APP23 Mäusen wird, wie bereits erwähnt, A β lediglich aus Neuronen freigesetzt. Die wahrscheinlichste Erklärung für die Ausbildung von CAA ohne lokale A β Produktion im Endothel ist, dass das transgene APP/A β axonal transportiert und sezerniert wird und dann entweder durch Diffusion oder aktiven Transport in die Gefäßwand gelangt. A β konnte in APP23 Mäusen auch in Liquor nachgewiesen werden; möglicherweise spielt der Transport von A β aus Neuronen über Gefäße in den Liquor eine Rolle bei der A β Akkumulation in Gefäßen (5).

Existiert ein Ungleichgewicht zwischen monomerer A β Produktion und Elimination, tritt ab einem gewissen A β Überschuss die Aggregation auf; dies resultiert in Plaque Ablagerungen oder in der CAA (71). Man nimmt an, dass ein niedriges Verhältnis von A β 40/A β 42 die parenchymatöse Ablagerung, eine größere A β 40/A β 42 Ratio das Auftreten von CAA begünstigt (siehe Abb. 7) (17). Neprilysin, „insulin-degrading-enzyme“ (IDE), Plasmin u.a. können monomere und oligomere A β Formen abbauen. Plasmin scheint sogar A β Fibrillen zu spalten (68).

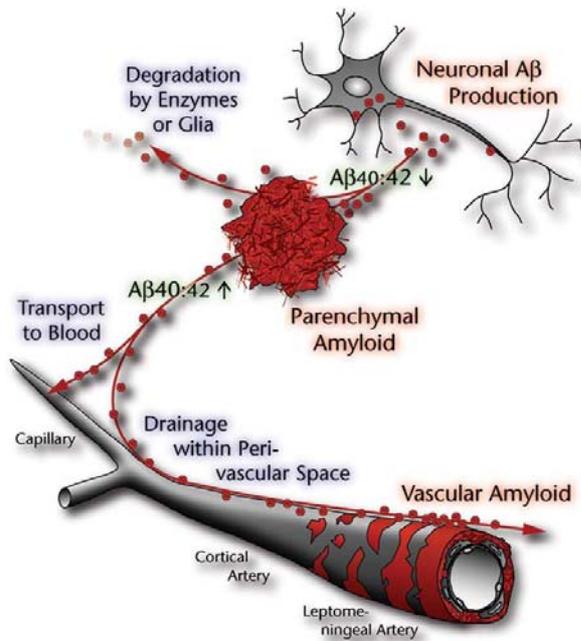


Abb. 7) Neuronal produziertes, lösliches Aβ wird axonal oder auch über interstitielle Flüssigkeit zu den Blutgefäßen transportiert. Es wird angenommen, dass ein Ungleichgewicht zwischen Aβ Produktion und Elimination, z.B. durch Gliazellen oder auch Enzymen wie Neprilysin, zur Akkumulation von Aβ führen. Ein niedriges Verhältnis von Aβ40/Aβ42 begünstigt die parenchymatöse Ablagerung, ein größeres Aβ40/Aβ42 Verhältnis fördert die vaskuläre Ablagerung (17).

In MRT-Angiographie Studien werden bei APP23 Mäusen mit zunehmendem Alter Turbulenzen und Lücken im cerebralen Blutfluss beobachtet. Es wäre denkbar, dass diese durch Amyloid(transport) in Hirngefäßen ausgelöst werden. Mit 3-dimensionalen Aufnahmen können bei alten APP23 Mäusen strukturelle Schädigungen, Gefäßverluste und -neubildung in den im MRT auffälligen Regionen beobachtet werden. Es gibt also im APP23 Tiermodell Hinweise auf eine zerebrale Angiogenese (1).

Kurz gesagt, APP23 Mäuse zeigen damit die für AD typischen Läsionen sowohl im Hirnparenchym wie auch in den Gefäßen und stellen damit ein geeignetes Tiermodell dar um die vaskuläre Pathologie von AD zu untersuchen.

Neuropsychologische Veränderungen in APP23 Mäusen

Kognitive Defizite treten bei APP23 Mäusen ab einem Alter von 3 Monaten auf. Zu diesem Zeitpunkt sind im Gehirn zwar noch keine Aβ Plaques, aber lösliche Aβ-Peptide vorhanden, welche am ehesten mit der beginnenden Demenz in Zusammenhang stehen. Interessanterweise bleibt die Konzentration löslicher Aβ-Peptide im Alter von 6-8 Wochen, 3 und 6 Monaten bei APP23 Mäusen konstant. Da aber in der 6-8 Wochen Gruppe noch keine Gedächtniseinbußen auffallen, kann lösliches Aβ alleine folglich nicht die einzige Ursache für die beginnende Demenz im Alter von 3 Monaten sein. Unlösliche Plaque-assoziierte Aβ-

Peptide sind im Alter von 6 Monaten zum ersten Mal auffällig; ab diesem Zeitpunkt wurden bei den transgenen Tieren zudem Unregelmäßigkeiten im zirkadianen Rhythmus beobachtet. Welcher pathophysiologische Prozess und vor allem welche A β Form (lösliches A β oder unlösliche Plaques) mit dem Gedächtnisdefizit korreliert, ist immer noch nicht komplett erforscht (67).

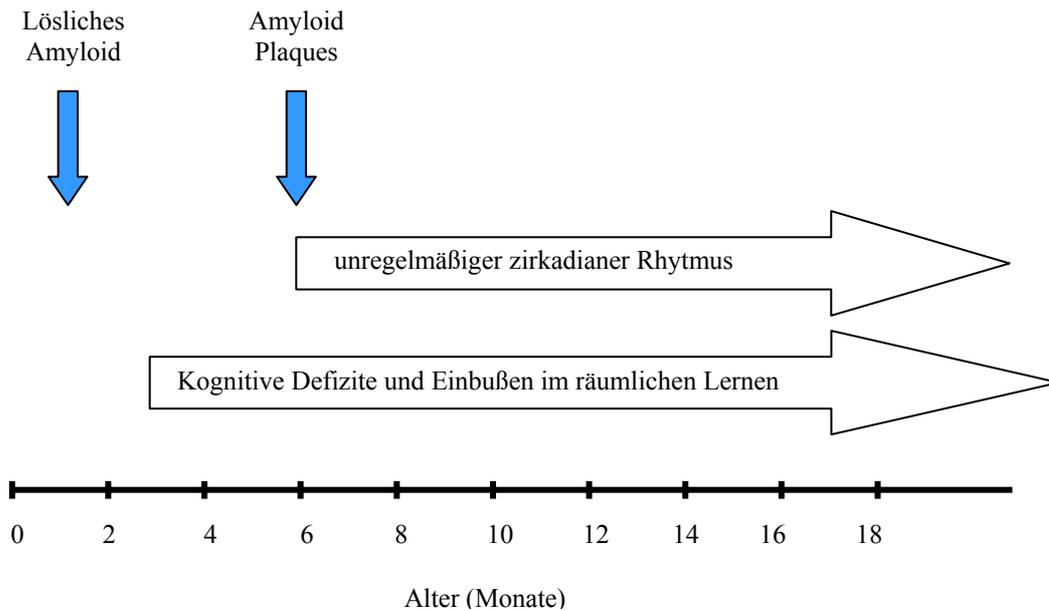


Abb. 8) Im Alter von 3 Monaten treten im APP23 Tiermodell kognitive Defizite auf. Zu diesem Zeitpunkt sind zwar lösliche A β -Peptide, aber noch keine A β Plaques vorhanden. Die Plaques treten erst ab dem 6. Lebensmonat zusammen mit Veränderungen des zirkadianen Rhythmus auf.

Ziel der Arbeit

Die Pathogenese und die Ätiologie von AD sind nicht vollständig aufgeklärt. Das Gefäßsystem könnte für den Progress von AD eine bedeutende Rolle spielen. In dieser Arbeit wurde anhand des APP23 Mausmodells die „Angiogenese Hypothese“ mit folgenden Zielen genauer untersucht.

1. Es sollte getestet werden, ob es im Gehirn von APP23 Mäusen zur Expression von Markern der Angiogenese und Apoptose kommt.
2. Es sollte eine Korrelation solcher Veränderungen mit Amyloid (Plaque) Ablagerungen im APP23 Gehirn hergestellt werden.
3. Es sollte untersucht werden, ob in den Gehirnen von APP23 Mäusen Faktoren vorhanden sind, die in vivo Angiogenese induzieren.
4. Es sollte getestet werden, ob diese Angiogenese medikamentös moduliert werden kann.

Materialien

Tiere

Männliche APP23 sowie altersentsprechende männliche Wildtyp Kontrollmäuse wurden von Novartis Chemical Co. zur Verfügung gestellt. Es wurden Tiere im Alter von 11, 17, 19, 21 und 23 Monaten verwendet. Für die „Matrigel plug“ Versuche wurden 11 Wochen alte, weibliche CD1 Auszucht Mäuse von Charles River geliefert.

Substanzen, Verbrauchsmittel und Geräte für:

Immunhistochemie

Sofern notwendig wurde für alle Versuche Millipore Q gereinigtes Wasser verwendet.

Einbettmaterial Tissue Tek®, Sakura Finetek

Mikrotom Kryostat HM 500 OM

Superfrost® Objektträger, Sigma

Aceton, Merck

5% H₂O₂, Merck

Methanol, Merck

Phosphor-Buffered-Saline (PBS), Sigma

Bovines Serumalbumin (BSA), Sigma

Antibody diluent, Gibco

Rat anti-mouse CD31 (PECAM-1) IgG monoklonal, BD Biosciences

Hamster anti-mouse CD61 (Integrin β_3 chain) IgG, BD Biosciences

Mouse anti-hamster IgG Cocktail, biotinyliert, BD Biosciences

Rabbit anti-human beta amyloid IgG polyklonal, Chemicon

Goat anti-rabbit IgG, biotinyliert, Chemicon

Vectastain ABC Kit, Vector laboratories

AEC bzw. DAB Substrat Kit für Peroxidase, Vector laboratories

Meyer's Haemalaun, Merck

Kaisers Glyceringelatine

Mikroskopische Deckgläser, Cellocate glass coverslips, Eppendorf

Wärmeofen, Typ Memmert

Mikroskop BH-2, Olympus

Peroxidase Blockierlösung

| | |
|----------------------------------|--------|
| 5% H ₂ O ₂ | 50µl |
| Aqua dest. | 450µl |
| Methanol | 2000µl |

Masson Trichrom Färbung

Färbekit von Dako Cytomation (Code Nr. SL018)

Tc-99m Annexin V Biodistribution

Hynic-Annexin V, von Dr. Jean- Luc Vanderheyden, Theseus Co., Boston, MA, USA

Tc-99m

Diethylether

Rompun 2%, Bayer

Ketavet 100mg/ml, Pfizer

Wallac γ -scintillation counter Typ Wizard 1480

Waage LA 230 S, Sartorius

i.v. Narkoselösung

| | |
|---------|------|
| NaCl | 82ml |
| Rompun | 8ml |
| Ketavet | 10ml |

“Matrigel plug” Injektion

Lysepuffer für die Hirne:

| | |
|--------|--------|
| Hepes | 20 mM |
| KCl | 135 mM |
| EDTA | 1 mM |
| EGTA | 1 mM |
| Triton | 0,5% |
| pH | 7,4 |

Glas-Glas Homogenisator

pH-Meter (pH 522), WTW

Growth factor reduced (GFR) BD Matrigel™ Matrix, BD Biosciences

Recombinant human fibroblast growth factor-basic (rh FGF-basic), ImmunoTools

Recombinant human vascular endothelial growth factor (rh VEGF), ImmunoTools

PBS steril, Gibco

dotMetric® protein assay, GenoTech

Acetylsalicylic acid (ASS), Sigma

Mevinolin von Aspergillus sp. (98% HPLC), Sigma

Thalidomide, Sigma

VEGF Rezeptor Inhibitor 3-(4-Dimethylaminobenzylidene)-1,3-dihydroindol-2-one (SU 4312), Biomol research laboratories

Hb Bestimmung aus dem „Matrigel plug“

CO₂ Kammer

Waage LA 230 S, Sartorius

PBS steril, Gibco

Ultraschallhomogenisator UP 200s

Photometer Uvikon 931, Kontron Instruments

Bovines Hämoglobin, Sigma

Drabkin´s solution (Sigma):

Drabkin´s reagent 1 vial

30% Brij 35 solution 0,5 ml

Aqua dest. 1000 ml

Western blot

Proteaseinhibitor Cocktail, EDTA-free, Roche

Zentrifuge (Biofuge fresco), Heraeus

HUVEC Zellysate

Eppendorf Thermomixer

Acrylamid, Sigma

Bromphenolblau
Sodiumdodecylsulfat (SDS), Sigma
TEMED, Sigma
Ammoniumpersulfat (APS), Sigma
Wide Molecular weight range Marker, M4038, Sigma
PBST Puffer (PBS steril, 0.3% Tween 20)
Tween 20, Sigma
Methanol, Merck
Nitrocellulosemembran, Amersham
Blotting tank
Non-fat dry milk (5% in PBST), Biomol
Anti-VE-Cadherin IgG polyklonal, Cayman chemical
Horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG, Amersham
Peroxidase Substrat, Amersham
Entwickler- und Fixierlösung, Kodak
Filme, Kodak

4x Probenpuffer:

| | |
|-----------------|--------|
| Tris HCl pH 6,8 | 200 mM |
| DTT | 400 mM |
| SDS | 8% |
| Glycerin | 20% |
| Bromphenolblau | 0,2% |

10x Laufpuffer:

| | |
|--------|---------|
| Tris | 29 g/l |
| Glycin | 144 g/l |
| SDS | 10 g/l |

10x Blotpuffer:

| | |
|----------|--------|
| Tris | 58 g/l |
| Glycin | 29 g/l |
| Methanol | 20% |

Western blot Gele:

| | Sammelgel (5%) | Trenngel (10%) |
|---------------------------------|-----------------|-------------------|
| Acrylamid | 1,25 ml | 5 ml |
| Bromphenolblau | 300 µl | - |
| SDS (10%) | 0,1 ml | 0,2 ml |
| Tris/Cl | 0,1 ml (pH 6,8) | 7,467 ml (pH 8,8) |
| Autoklaviertes H ₂ O | 7,09 ml | 7,34 ml |
| TEMED | 50 µl | 50 µl |
| 10% APS | 100 µl | 100 µl |

Methoden

Präparation von APP23 Gehirnen

Die APP23 Mäuse sowie die altersentsprechenden Wildtyp Tiere wurden in einer CO₂ Kammer getötet. Mit einer Schere wurde die Halswirbelsäule der Tiere durchtrennt. Die Eröffnung der Schädelkalotte erfolgte durch zwei Schnitte vom Foramen magnum aus zum Os temporale links und rechts. Mit einem Spatel wurde die Kalotte abgehoben und das Gehirn aus der Schädelbasis luxiert. Das Hirngewebe wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte bei -80°C.

Herstellung von Kryo- bzw. Paraffinschnitten

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurde das Hirngewebe im Kryostaten bei -20°C mit dem Einbettmaterial Tissue Tek® bedeckt. Es wurden 7 µm dicke Schnitte hergestellt, auf Superfrost® Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Schnitte wurden bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Material, welches in Paraffin ausgegossen werden sollte, wurde sofort nach Entnahme über Nacht in 5% Formalin eingelegt. Mittels aufsteigender Alkoholreihe wurden das Material anschließend entwässert und in Paraffin eingedeckt. Es wurden 2 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Superfrost® Objektträger aufgezogen. Vor der Färbung erfolgte die Deparaffinierung im Brutschrank bei 37°C für etwa 10-20 Minuten.

Masson Trichrom Färbung

Die Masson Trichrom Färbung wurde an Paraffinschnitten durchgeführt. Die Färbung ist zur histologischen Darstellung von Kollagen, Muskelfasern und Erythrozyten besonders gut geeignet. Muskel und Erythrozyten stellen sich dabei rot dar, Kollagen wird blau und Zellkerne schwarz gefärbt. Aufgrund der genannten Eigenschaften eignet sich die Masson Trichrom Färbung sehr gut, die Einsprossung von Gefäßen in dem aus Kollagen bestehenden Matrigel plug zu quantifizieren. Nach der Deparaffinierung wurden die Präparate für 30min in 55-60° C warmer Bouin'sche Lösung inkubiert. Anschliessend wurden die Präparate gründlich mit Leitungswasser gespült und für ca. 5min in Special Stains Waschpuffer eingeweicht. Im nächsten Schritt wurde Weigert'sche Lösung auf die Schnitte aufgetragen.

Nach einem erneuten Waschschrift wurde Biebrich Scharlachrot verwendet, gefolgt von der Differenzierung der Kollagenfasern mit einem Phosphormolybdän/Phosphortungstensäure-Gemisch. Anschließend wurde Anilinblau und 1%ige Essigsäure aufgetragen. Zum Schluß wurden die Objektträger kurz in 100%igen Alkohol getaucht, mit Xylol oder Xylol-Ersatzstoff gereinigt und mit Eindeckmedium bedeckt.

CD31 Immunhistochemie

Für immunhistochemische Färbungen wurden ausschließlich Kryoschnitte verwendet. Die Fixierung aller Schnitte erfolgte für 10 Minuten in -20°C kaltem Aceton; anschließend 3x2 minütige Spülung mit PBS. Bei der CD31 Färbung wurden unspezifische Bindungen 20 Minuten lang mit der Blockierlösung aus dem ABC Kit abgesättigt. Die Blockierlösung wurde auch zur Verdünnung von Primär- und Sekundärantikörper und zur Bedeckung der Negativkontrollen verwendet. Der rat anti-mouse CD31 Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:100 für eine Stunde, der biotinylierte anti-rat Sekundärantikörper (aus dem ABC Kit) in einer Verdünnung von 1:6000 für 30 Minuten aufgetragen. Nach jeder Antikörperinkubation dreimalige Spülung der Schnitte mit PBS. Anschließende Inkubation der Schnitte für 10 Minuten in Peroxidase Blockierlösung und erneute dreimalige Spülung mit PBS. Als Detektionssystem wurde die ABC Methode, welche sich die Affinität von Avidin zu Biotin zunutze macht, gewählt. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein (Tetramer) mit vier Bindungsstellen für Biotin. Bei der ABC Methode verwendet man einen biotinylierten Brückenantikörper, welcher an den Primärantikörper gebunden ist. An diesen Brücken- oder Sekundärantikörper bindet der (Strept)Avidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC Komplex). Dabei wird an drei von vier möglichen Bindungsstellen des Avidins ein Molekül Biotin gebunden (15). An den ABC Komplex ist das Enzym, in diesem Fall die Peroxidase, gekoppelt. Der ABC Komplex wurde laut Herstellerangaben angefertigt und für 30 Minuten auf die Schnitte aufgetragen, anschließend 3x2 Minuten mit PBS abgewaschen. Als Substrat wurde 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC), welches von der an den ABC Komplex gekoppelten Peroxidase enzymatisch zu einem roten Farbstoff umgesetzt wird, verwendet. Das AEC Substrat wurde laut Herstellerangaben angefertigt und für 30 Minuten inkubiert; 3x2 minütige Waschung mit PBS. Für die Gegenfärbung wurde Mayer's Haemalaun verwendet, zuletzt erfolgte 5 Minuten lang die Bläuung der Schnitte unter fließendem Leitungswasser. Für die Auszählung positiver Gefäße pro Gesichtsfeld wurde die 10er Vergrößerung gewählt. Wie bei allen immunhistochemischen Färbungen sind die Daten repräsentativ für 3 voneinander

unabhängigen Experimenten. Für die Auswertungen wurde die Anzahl positiver Gefäße \pm SEM („standard error of mean“) angegeben.

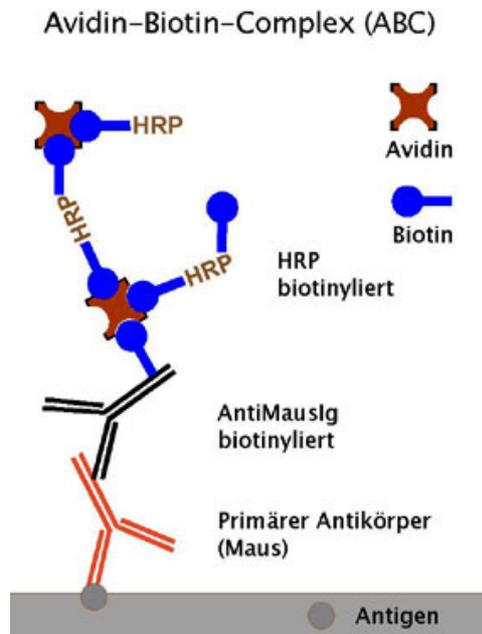


Abb. 9) Die ABC Methode: ein biotinylierter Sekundärantikörper bindet an einen unkonjugierten Primärantikörper. Der ABC Komplex besteht aus einem (Strept)Avidin und biotinmarkierten Enzymkomplex. Der ABC Komplex bindet über das (Strept)Avidin an das Biotin des Sekundärantikörpers.

Amyloid Immunhistochemie

Es wurde mit einigen Ausnahmen dasselbe Protokoll wie eben beschrieben verwendet. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde 1%iges bovines Serumalbumin verwendet. Der rabbit anti- β -Amyloid Primärantikörper wurde 1:200, der biotinylierte anti-rabbit Sekundärantikörper 1:500 aufgetragen. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte dabei mit antibody diluent von Gibco. Negativkontrollen wurden ausschließlich mit antibody diluent ohne zusätzlichen Primärantikörper bedeckt. Zur Detektion wurden ebenfalls die ABC Methode und als Substrat AEC benutzt.

β_3 -Integrin Immunhistochemie

Die Vorgehensweise entspricht dem Protokoll der Amyloid Färbung. Der hamster anti-mouse CD61 Primärantikörper wurde 1:10, der biotinylierte mouse anti-hamster Sekundärantikörper 1:100 verdünnt aufgetragen.

Amyloid/ β_3 -Integrin Doppelimmunhistochemie

Es wurde prinzipiell nach demselben Protokoll wie bei den Einzelfärbungen vorgegangen. Im ersten Färbedurchgang wurde Amyloid detektiert; als Substrat wurde allerdings DAB statt AEC benutzt. Amyloidablagerungen wurden dabei braun gefärbt. Im zweiten Durchgang wurde die $\alpha_v\beta_3$ Färbung wie im obigen Protokoll durchgeführt, wohingegen der Primärantikörper hier statt einer Stunde bei Raumtemperatur für 24 Stunden bei 4°C inkubiert wurde. Als Substrat wurde hier AEC verwendet, welches ein rotviolettes Farbergebnis lieferte. Bei der Doppelimmunhistochemie erfolgte keine Gegenfärbung mit Mayer's Haemalaun. Für die Auszählung doppelt positiver Gefäße pro Gesichtsfeld wurde wieder die 10er Vergrößerung gewählt.

Tc-99m Annexin V Biodistribution

15 mCi Tc-99m Pertechetat wurden zu einem Röhrchen mit 100µg Annexin V zugegeben. Zinn Tricine (4 mg in 0.2 ml) wurde mit Aqua dest. auf 1 ml aufgefüllt. 50 bis 100 µl wurden davon entnommen und zu dem Tc-99m Annexin V Röhrchen hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 15 Minuten inkubiert. 11, 17, 19, 21 und 23 Monate alten APP23 sowie altersentsprechenden Wildtyp Kontrollmäusen wurde über die Schwanzvene Tc-99m markiertes Annexin V injiziert (100 µCi in 200 µl Gesamtvolumen). Das Tc-99m gelabelte Annexin V zirkulierte 21h lang im Körperkreislauf der Mäuse. Danach wurden die Tiere in der CO₂ Kammer getötet und Hirn, Leber, Nieren, Milz, Muskel und Blut entnommen. Die in den verschiedenen Organen enthaltene Aktivität wurde im γ -Counter bestimmt. Die Radioaktivität, welche in den Geweben nachweisbar war wurde in % injizierter Dosis (ID)/Gramm Gewebe angegeben.

Angiogeneseinduktion durch APP23 bzw. Kontrollhirn im „Matrigel plug assay“

Die Gehirne von 23 Monate alten APP23 und gleichaltrigen Wildtyp Kontrollmäusen wurden mit 2ml Lysepuffer im Glas-Glas-Homogenisator auf Eis bei 4°C homogenisiert. 150µl des Alzheimer- bzw. Kontrollhirn-Homogenats wurden mit 500µl Matrigel gemischt und mit sterilem PBS auf 700µl aufgefüllt. Die Negativkontrolle enthielt nur 500µl Matrigel + 200µl PBS; für die Positivkontrolle wurde 500µl Matrigel, 200µl PBS und VEGF oder bFGF in einer Konzentration von 200ng/ml verwendet. Diese Mischung wurde 11 Wochen alten,

weiblichen CD1 Mäusen subkutan inguinal injiziert und für 11 Tage in vivo belassen. Nach dieser Zeit wurden die Mäuse in einer CO₂ Kammer getötet, die „plugs“ entnommen und gewogen. Die Menge der in den „plug“ eingesprossenen Gefäße wurde entweder photometrisch, histologisch oder mittels Western blot quantifiziert.

Angiogenesehemmung durch Medikamente im „Matrigel plug assay“

In diesem Experiment wurde getestet, ob die durch APP23 Gehirnhomogenate induzierte Angiogenese durch Medikamente modulierbar ist. Dazu wurden Gehirne 23-25 Monate alter APP23 Mäuse bei 4°C auf Eis mit 2ml Lysepuffer homogenisiert. Der Proteingehalt des Homogenats wurde mit dem dotMetric® protein assay bestimmt. Für jeden Versuch wurden 2700µg Protein des APP23 Homogenats mit 500µl Matrigel vermischt. Zusätzlich wurde entweder Aspirin (ASS), Mevinolin (ein HMG-CoA Reduktasehemmer), VEGF Rezeptorinhibitor oder Thalidomid hinzugefügt. Mit sterilem PBS wurde auf eine Gesamtmenge von 700µl pro „plug“ aufgefüllt. Dieses Volumen wurde weiblichen, 11 Wochen alten CD1 Mäusen für 11 Tage subkutan injiziert.

Die Hemmstoffe erreichten folgende Konzentrationen im plug:

| | |
|-------------------------|---------------|
| ASS | 17ng/µl plug |
| VEGF Rezeptor Inhibitor | 107ng/µl plug |
| Mevinolin | 15ng/µl plug |
| Thalidomid | 43 ng/µl plug |

Nach 11 Tagen wurden die „plugs“ entnommen. Die Menge eingesprossener Gefäße wurde photometrisch bestimmt.

Photometrische Hämoglobin (Hb) Bestimmung aus „Matrigel plugs“

Eine Möglichkeit zur Quantifizierung eingesprossener Gefäße im „Matrigel plug“ ist die Hb Bestimmung. Man darf davon ausgehen, dass die Menge neugebildeter Gefäße im „plug“ mit dem objektiv messbaren Hb Gehalt korreliert. Der „plug“ wurde nach Entnahme gewogen, mit 2ml sterilem PBS vermischt und im Ultraschallhomogenisator bei 4°C auf Eis lysiert. 500µl dieses Lysats wurden mit 500µl „Drabkin’s solution“ vermischt und für 5 min im 56°C warmen Wasserbad inkubiert. „Drabkin’s solution“ reagiert enzymatisch mit allen Hb Formen außer Sulfhämoglobin und setzt es in Cyanmethämoglobin um, welches bei einer Wellenlänge

von 540nm quantitativ im Photometer bestimmt werden kann. Als Leerwert, gegen welchen die Proben gemessen wurden, wurden 500µl Aqua dest. + 500µl „Drabkin’s solution“ verwendet. Die Proben wurden solange mit PBS verdünnt bis die Absorptionswerte im linearen Bereich der Eichkurve lagen. Die Angabe des Hb Gehalts als Maß für die Gefäßdicke erfolgte in Hb(mg)/plug. Für die Erstellung der Eichkurve wurde in Aqua dest. gelöstes bovines Hb in einer Konzentration von 180µg/ml verwendet.

Für alle Messungen wurde eine Eichkurve nach folgendem Schema erstellt:

| | | | | | | | | |
|------------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| µl der Hb Lösung | 1 | 2 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 |
| Hb (µg) | 180 | 360 | 720 | 1440 | 2160 | 2880 | 3600 | 4320 |

Mit den angegebenen Hb Konzentrationen ließ sich eine lineare Eichkurve im Absorptionsbereich von 0 bis 1,5 erstellen; bis in diesen Absorptionsbereich hinein erfolgte auch die Verdünnung der Proben.

Anti-VE-Cadherin Western blot

Es wurde von 23 Monate alten APP23 und Wildtyp Mäusen wie bereits beschrieben Gehirnhomogenat hergestellt. 150µl des Homogenats wurde mit 500µl Matrigel vermennt, mit sterilem PBS auf ein Gesamtvolumen von 700µl aufgefüllt und 11 Wochen alten CD1 Mäusen für 11 Tage subkutan injiziert. Als Negativkontrolle wurden 500µl Matrigel mit entweder 200µl PBS oder 200µl Lysepuffer vermischt. Nach 11 Tagen wurden die Tiere getötet, die „plugs“ entnommen und gewogen. Entsprechend dem Gewicht wurden die „plugs“ mit einer äquivalenten Menge an Lysepuffer vermennt, mit dem Ultraschallhomogenisator auf Eis lysiert und anschließend bei 13.000 G bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Für den Western blot wurden 7,5µl des Überstands mit SDS Probenpuffer vermennt, 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht und anschließend auf ein 10%iges Western blot Gel geladen. Das Gel wurde in der mit Laufpuffer gefüllten Kammer bei konstanter Spannung von 200 Volt laufen gelassen bis die Proben vom Sammel- ins Trenngel eingetreten waren, danach wurde auf 100 Volt heruntergeschaltet. Als Positivkontrolle wurde ein Lysat aus „human umbilical venous endothelial cells“ (HUVEC) verwendet. Das Gel wurde dann eine Stunde lang bei 4°C und 100 Volt in einem mit blotting buffer gefüllten tank auf eine Nitrocellulose Membran geblottet. Unspezifische Bindungen wurden anschließend mit Milchpulverlösung (5g auf 100ml A.d.) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt.

Der „rabbit anti-mouse“ VE Cadherin Antikörper wurde mit einer Konzentration von 2µg/ml für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde 3x5 Minuten mit PBST (0,5% Tween 20 in PBS) gewaschen. Ein Stunde lang wurde „horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit“ Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 aufgetragen, danach 3x5 Minuten lang mit PBST abgewaschen. Der Blot wurde mit Amersham Peroxidase Substrat für eine Minute inkubiert. In der Dunkelkammer erfolgte die Entwicklung des Western blot Films.

Statistische Signifikanz

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die statistischen Signifikanzen mit dem Student's t-test berechnet. Unterschiede mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 95% ($p < 0,05$) wurden als statistisch signifikant gewertet.

Ergebnisse

Amyloid Plaque Ablagerungen im Gehirnparenchym von APP23 Mäusen

Im APP23 Mausmodell sind A β -Plaque Ablagerungen ab dem 6. Lebensmonat im gesamten, besonders aber im frontotemporalen Cortex sowie in Hippocampus und Amygdala erkennbar (57). Mittels immunhistochemischer Färbung mit einem anti-Amyloid Antikörper waren in Gehirnschnitten von 11, 17, 21 oder 23 Monate alten APP23 Mäusen Plaques in typischer Lokalisation nachweisbar (s. Abb. 10, Abb. 11b). Wie in der Literatur beschrieben, fanden sich keine Plaques im Kleinhirn (57). In der APP23 Gruppe stieg die Anzahl Amyloid positiver Plaques mit zunehmendem Alter an. In den Hirnen altersentsprechender Wildtyp Mäuse waren keine Plaques detektierbar. In der 23 Monate alten APP23 Gruppe sind im Vergleich zur Wildtyp Kontrollgruppe ca. 400x mehr Plaques vorhanden. Die Anzahl an Amyloid Plaques +/- „standard error of mean“ (SEM) wurde pro Gesichtsfeld ausgezählt und in % zum Mittelwert aller Kontrollgruppen auf der linken y-Achse des Diagramms angegeben. Die Daten stammen aus pro Altersgruppe 3 voneinander unabhängigen Färbungen (s. Abb.10).

Bei 17 Monate alten Tieren wurde das Auftreten von Amyloid Plaques im Kleinhirn und im Cortex miteinander verglichen. In diesem Alter sind bei APP23 Mäusen im Cortex Plaques nachweisbar, nicht jedoch im Kleinhirn. Wildtyp Mäuse hatten weder im Cortex noch im Cerebellum Plaque Ablagerungen. Im Diagramm wurde die Anzahl an Amyloid Plaques \pm SEM pro Gesichtsfeld angegeben (s. Abb.12).

Amyloid positive Blutgefäße im Gehirn von APP23 Mäusen

Für die Auszählung Amyloid positiver Gefäße und der Amyloid Plaques wurden dieselben Hirnschnitte von 11, 17, 21 oder 23 Monate alten APP23 Mäusen sowie altersentsprechender Kontrollen verwendet. Amyloidablagerung in Gefäßen tritt im APP23 Tiermodell ab ca. 1 Jahr auf (57). Von der 11 Monate Gruppe an wurde ein altersabhängiger Anstieg Amyloid positiver Gefäße beobachtet. Die Anzahl Amyloid positiver Gefäße im APP23 Hirn +/- SEM wurde pro Gesichtsfeld ausgezählt und in % zum Mittelwert aller Kontrollgruppen angegeben. Die Ergebnisse sind auf der rechten y-Achse des Diagramms abgebildet. Auch hier stammen die Daten aus 3 voneinander unabhängigen Färbungen pro Altersgruppe (s. Abb.10, Abb.11a).

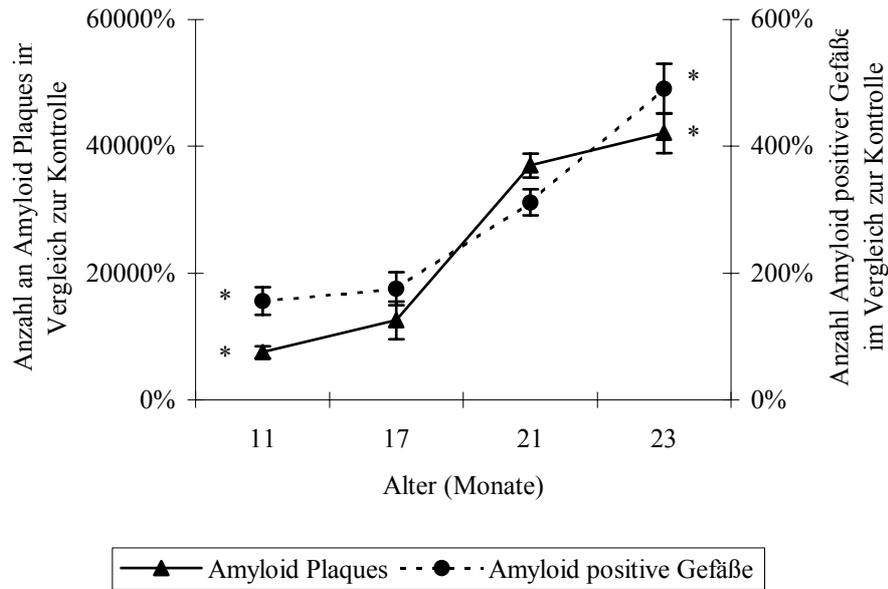


Abb. 10) Amyloid Ablagerungen in Hirngefäßen und Hirnparenchym von APP23 Mäusen. Die Anzahl Amyloid positiver Gefäße (rechte y-Achse) sowie die Anzahl an Amyloid Plaques (linke y-Achse) \pm SEM im APP23 Gehirn wurde pro Gesichtsfeld ausgezählt und in % zum Mittelwert positiver Gefäße/Plaques aller Wildtyp Kontrollgruppen angegeben. * Der Unterschied zwischen der 11 und der 23 Monate alten APP23 Gruppe war statistisch signifikant ($p < 0,001$).

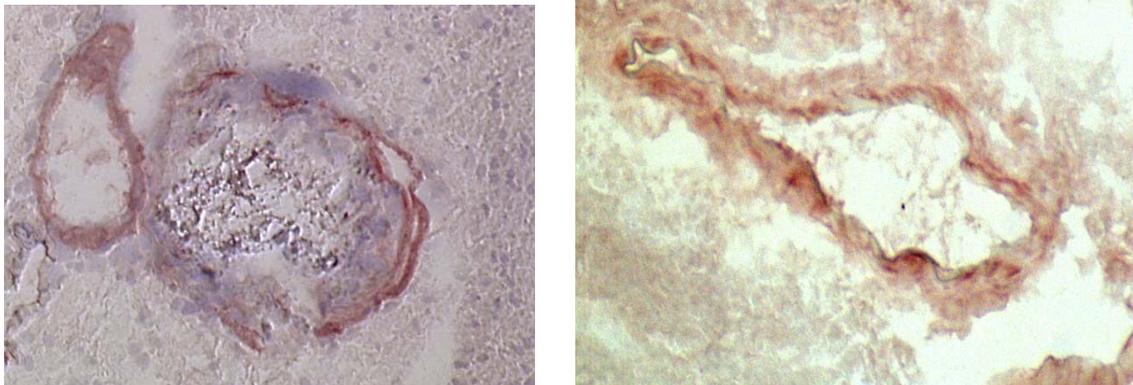


Abb. 11a) Bilder der immunhistochemischen Färbung mit anti-Amyloid Antikörper von APP23 Mäusen. Gefäßamyloid ist durch homogenes, rotes Material in der Gefäßwand charakterisiert.

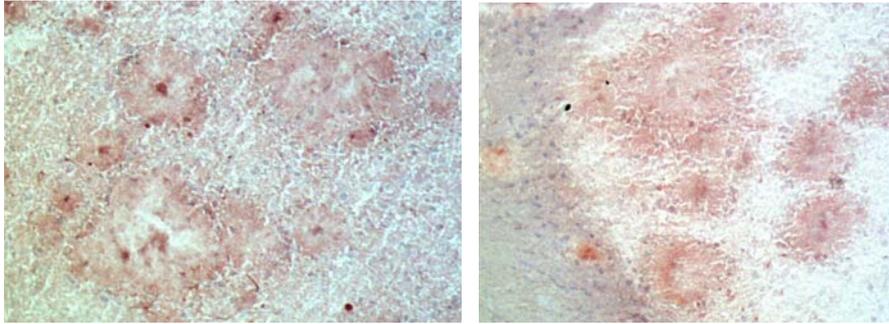


Abb. 11b) Amyloid Plaques im Gehirnparenchym von APP23 Mäusen.

Zur Testung der Spezifität des anti-Amyloid Antikörpers wurde eine immunhistochemische Färbung an Herzmuskulatur unternommen. Positive Gefäße konnten dabei nicht nachgewiesen werden, was gegen eine unspezifische Reaktion des Antikörpers gegen Strukturen der Gefäßwand spricht (s. Abb. 11c)

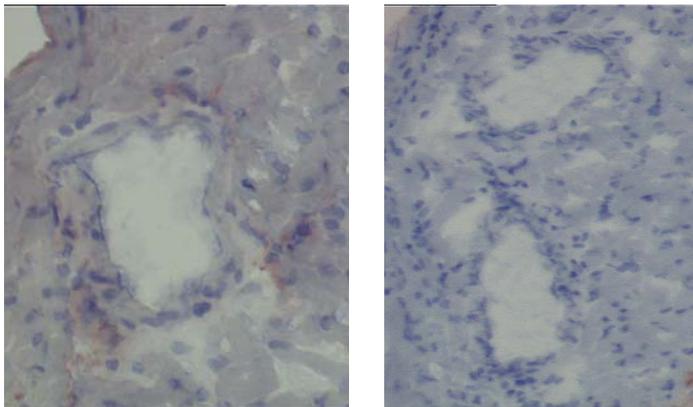


Abb.11 c) Anti-Amyloid Färbung auf Herzmuskulatur-Schnitten. Es gelang kein Nachweis Amyloid positiver Gefäße als Zeichen der Spezifität des Antikörpers

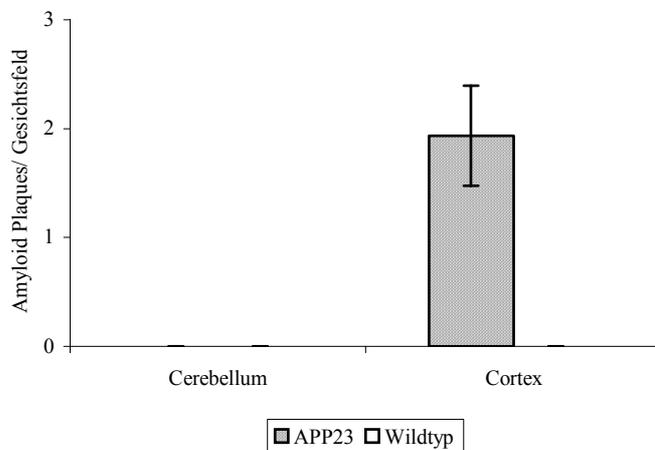


Abb. 12) Amyloid Plaque Ablagerungen in Cerebellum und Cortex bei 17 Monate alten Mäusen. In der Wildtyp Gruppe waren weder im Cerebellum noch im Cortex Plaques detektierbar. Bei der APP23 Gruppe war im Cortex eine deutliche Plaque Pathologie nachweisbar, welche im Kleinhirn fehlte. Es wurde die Anzahl an Amyloid Plaques pro Gesichtsfeld bestimmt.

β3-Integrin Expression in APP23 Gehirngefäßen

In dieser Arbeit wurde die Hypothese, dass Amyloidablagerungen in Gefäßen zu endothelialer Aktivierung und eventuell zu Angiogenese führen, untersucht. Zur Klärung dieser Frage wurde die Gefäßdichte und die Expression des Angiogenesemarkers β3-Integrin immunhistochemisch quantifiziert. Dazu wurden Gehirnschnitte von 11, 17, 21 oder 23 Monate alten APP23 Mäusen und altersentsprechenden Kontrollgruppen mit anti-β3-Integrin und anti-CD31 Antikörper gefärbt. CD31 oder PECAM-1 („platelet endothelial cell adhesion molecule-1“) ist ein panendothelialer Marker und damit ein gutes Maß für die Gefäßdichte. CD31 vermittelt interendotheliale Zellkontakte, welche wichtig für das Überleben von Endothelzellen sind (2). β3-Integrin hingegen ist ein Marker für endotheliale Aktivierung und wird selektiv in Gefäßen während der Angiogenese exprimiert. Er ist für die Migration, Proliferation und das Überleben von Endothelzellen von entscheidender Bedeutung (4).

Die Anzahl β3-Integrin positiver Gefäße stieg im APP23 Hirn von der 11 zur 23 Monate alten Gruppe signifikant an. In Wildtyp Kontrollmäusen war keine β3-Integrin Expression zu beobachten. Die Anzahl CD31 positiver Gefäße, d.h. die Gefäßdichte, blieb sowohl bei der APP23 wie auch bei der Kontrollgruppe in allen Altersstufen unverändert.

Das Ergebnis dieses Experiments ist interessant, so zeigt es doch, dass im APP23 Gehirn zwar Marker der Angiogenese exprimiert werden, die echte Neubildung von Gefäßen und damit eine Erhöhung der untersuchten Gefäßdichte jedoch unterbleibt.

Aus dem Diagramm wird ersichtlich, dass die β3-Integrin Expression erst ab einem Alter von 17 Monaten beginnt, also zu einem Zeitpunkt, zu dem bereits deutlich Amyloidangiopathie und Amyloid Plaque Ablagerungen vorhanden sind.

Sowohl für die CD31 als auch für die β3-Integrin Färbung wurde die Anzahl positiver Gefäße in APP23 Mäusen \pm SEM ausgezählt und in % zur Anzahl positiver Gefäße der jeweiligen Kontrollgruppen angegeben (s. Abb.13).

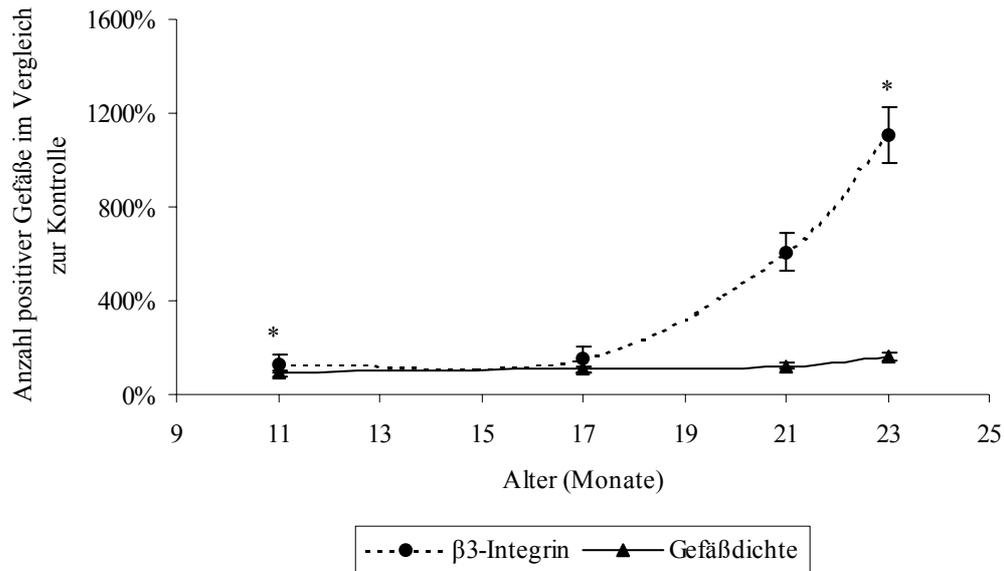


Abb. 13) Expression von β 3-Integrin im Gehirn von APP23 Mäusen. Die Anzahl positiver Blutgefäße \pm SEM für β 3-Integrin sowie für CD31 in APP23 Mäusen wurde bestimmt und in % zu den positiven Gefäßen der jeweiligen Wildtyp Kontrollen angegeben. CD31 repräsentiert als panendothelialer Marker die Gefäßdichte, β 3-Integrin ist ein Angiogenesemarker. * Die Anzahl β 3 Integrin positiver Gefäße war bei der 23 Monate alten APP23 Gruppe im Vergleich zur 11 Monate alten APP23 Gruppe signifikant erhöht ($p < 0.001$).

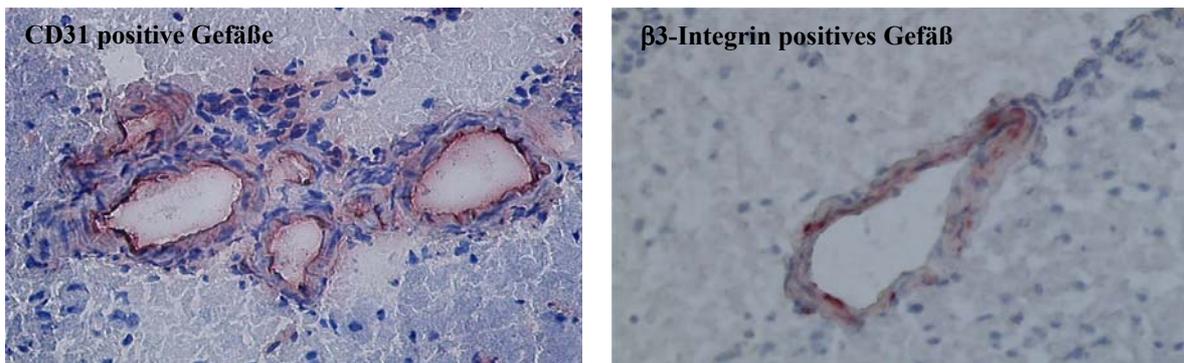


Abb. 14) Repräsentative Bilder CD31 bzw. β 3-Integrin positiver Gefäße. Die rote Farbe markiert CD31 bzw. β 3-Integrin; die Gegenfärbung erfolgte mit Haematoxylin, wodurch die Zellkerne blau erscheinen.

Amyloid/ β 3-Integrin Doppelimmunhistologie

Mit der immunhistochemischen Doppelfärbung von Hirnschnitten 23 Monate alter APP23 Mäuse konnte nachgewiesen werden, dass ungefähr 50% der Amyloid-positiven Gefäße auch positiv für β 3-Integrin waren. Die Expression von β 3-Integrin war ausschließlich in Amyloid-positiven Gefäßen nachweisbar. Kein Gefäß in den APP23 Hirnschnitten war β 3-Integrin positiv und Amyloid negativ. Die Vermutung, dass β 3-Integrin Hochregulation an das Vorhandensein von Amyloid in der Gefäßwand gebunden ist, scheint damit sehr wahrscheinlich. (s. Abb.15).

A)

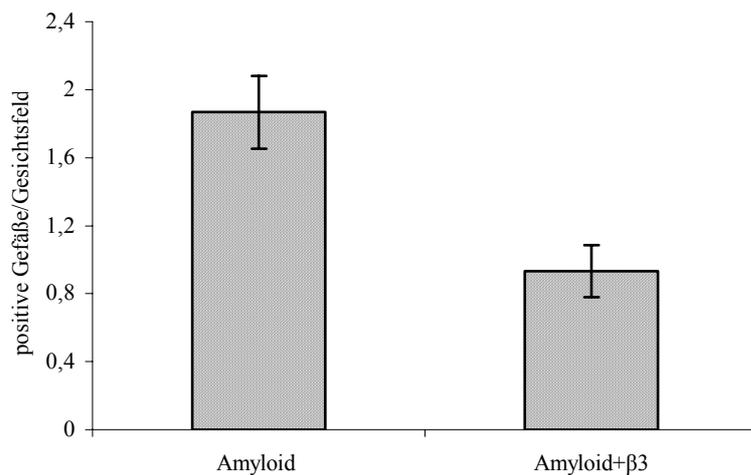
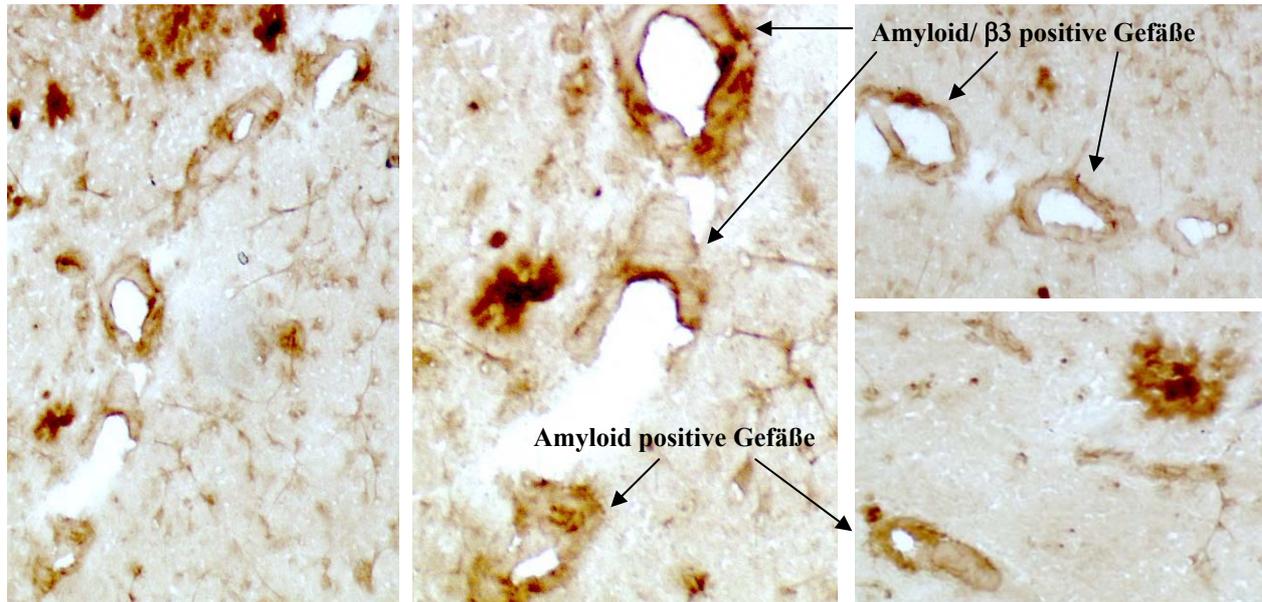


Abb. 15) (A) Amyloid/ β 3-Integrin Doppelfärbung von Schnitten 23 Monate alter APP23 Mäuse. Die Anzahl positiver Gefäße \pm SEM pro Gesichtsfeld wurde bestimmt.

B)



(B) Amyloid wurde mit DAB als Substrat (braun) entwickelt und ist als homogene Ablagerung in der Gefäßwand erkennbar. Die lumenseitige, lila Linie repräsentiert Integrin- $\beta 3$, welches mit AEC (lila) entwickelt wurde.

Apoptose in GehirngefäÙen von APP23 Mäusen

In der beschriebenen Serie von Experimenten konnte die verstärkte Expression des Angiogenesemarkers $\beta 3$ -Integrin ausschließlich in Amyloid-positiven GefäÙen gezeigt werden. Es ist denkbar, dass dies nicht nur eine Folge der Amyloidangiopathie, sondern eventuell auch endothelialer Schädigung oder Apoptose ist. Zur Aufklärung dieser Frage wurde folgender Versuch zur in vivo Detektion apoptotischer Endothelzellen durchgeführt: Annexin V, ein Molekül, welches spezifisch an Phosphatidylserinreste auf der Oberfläche apoptotischer Zellen bindet, wurde mit Tc-99m radioaktiv markiert und 11, 17, 19, 21 oder 23 Monate alten APP23 Mäusen und altersentsprechenden Kontrolltieren über die Schwanzvene injiziert (28). Nach 21 Stunden Zirkulationszeit wurden die Mäuse getötet und die in den Gehirnen akkumulierte Aktivität, welche der Bindung von Annexin V an apoptotische Endothelzellen entspricht, im γ -Counter gemessen. Tc-99m markiertes Annexin V war im Gehirn von APP23 Mäusen mit zunehmendem Alter vermehrt nachweisbar. Im Alter von 19 und 23 Monaten war der Unterschied zur Kontrollgruppe signifikant, was indirekt die erhöhte

endotheliale Apoptoserate in Hirngefäßen von APP23 Mäusen beweist. Die Werte stammen aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten pro Altersgruppe (s. Abb.16).

In γ -Kamera Aufnahmen konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden, da Annexin V stark im blutbildenden Knochenmark der Schädelkalotte anreichert.

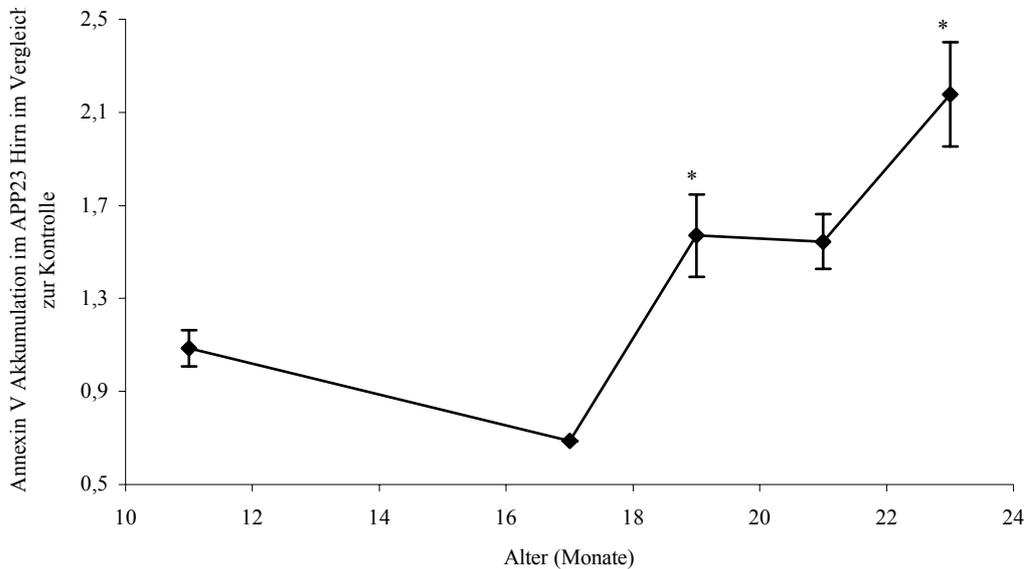


Abb. 16) Detektion von Apoptose in zerebralen Blutgefäßen von APP23 Mäusen. Tc-99m gelabeltes Annexin V wurde 11, 17, 19, 21 und 23 alten APP23 sowie Wildtyp Mäusen i.v. injiziert. Nach 21h Zirkulationszeit wurde die Aktivität in den Hirnen im γ -counter bestimmt. Die Berechnung der Radioaktivität erfolgte als % injizierter Dosis/g Gewebe. Sie wurde für die APP23 Hirne im Verhältnis zur altersentsprechenden Kontrollgruppe angegeben (siehe y-Achse). * Der Unterschied zur altersentsprechenden Kontrollgruppe war signifikant ($p < 0,05$; Statistiktest nach Lord).

Untersuchungen zum Nachweis von funktionell wirksamen Angiogenesefaktoren im Gehirn von APP23 Mäusen

Die immunhistochemischen Studien zeigen, dass trotz der endothelialen Aktivierung und der Expression des Angiogenesemarkers $\beta 3$ -Integrin, im Gehirn der APP23 Mäuse keine neuen Gefäße gebildet werden und die Gefäßdichte unverändert bleibt. Im Weiteren wurde nun getestet, ob Hirnhomogenate von APP23 Mäusen Faktoren enthalten, welche in vivo Angiogenese induzieren können. Dazu wurde der in vivo „Matrigel plug assay“ verwendet: Matrigel ist ein Extrakt aus dem „Engleberth-Holm-Swarm“ Tumor und enthält Kollagen IV, Laminin, Nidogen/Entacin und Heparansulfatproteoglykane. In dieser Arbeit wurde „growth factor reduced“ Matrigel verwendet, welches Ammoniumsulfat behandelt ist und keine

zusätzlichen Wachstumsfaktoren mehr enthält. Matrigel ist bei 4°C flüssig und kann daher gut subkutan gespritzt werden. Bei Raum- oder Körpertemperatur verfestigt es sich und bildet einen gelartigen „plug“. Wird das Matrigel mit pro-angiogenetischen Substanzen vermengt und subkutan injiziert, wachsen in vivo Endothelzellen in den „Matrigel plug“ ein und bilden dort Gefäße (42).

Für diesen „Matrigel plug assay“ wurden aus den Hirnen 23 Monate alter APP23 Mäusen und altersentsprechender Kontrollen Homogenate hergestellt, mit „growth factor reduced“ Matrigel vermengt und 11 Wochen alten CD1 Mäusen subkutan injiziert. Nach 11 Tagen wurden die „plugs“ entnommen und die Gefäßeinsprossung entweder durch Hb Bestimmung, histologisch oder mittels Western blot quantifiziert. Interessanterweise konnte mit allen 3 Methoden gezeigt werden, dass APP23 Hirnhomogenat im Vergleich zu Kontrollhirnhomogenat in der Lage ist, Angiogenese sowie die Ausbildung perfundierter Gefäße im „Matrigel plug“ zu induzieren.

Quantifizierung der neugebildeten Blutgefäße im „Matrigel plug“

Nach der Entnahme wurden die „Matrigel plugs“, wie im Methodenteil beschrieben, für die photometrische Hb Bestimmung vorbereitet. Die Anzahl neu in den „plug“ eingesprosseter, erythrozytenhaltiger Blutgefäße korreliert dabei mit dem photometrisch bestimmten Hb. Als Positivkontrolle wurde Matrigel mit dem Wachstumsfaktor bFGF vermengt. Als Negativkontrolle wurde Matrigel lediglich mit PBS vermischt und injiziert. Das APP23 Hirnhomogenat war in der Lage, im „Matrigel plug“ signifikant mehr Gefäßneubildung im Vergleich zum Wildtyp oder auch der bFGF Positivkontrolle zu induzieren. Im Diagramm wurden die Hb-Werte des APP23- bzw. Wildtyp Hirnhomogenats in Hb(mg)/plug \pm SEM berechnet und in % zum Mittelwert der PBS-Negativkontrollen angegeben (s. Abb.17).

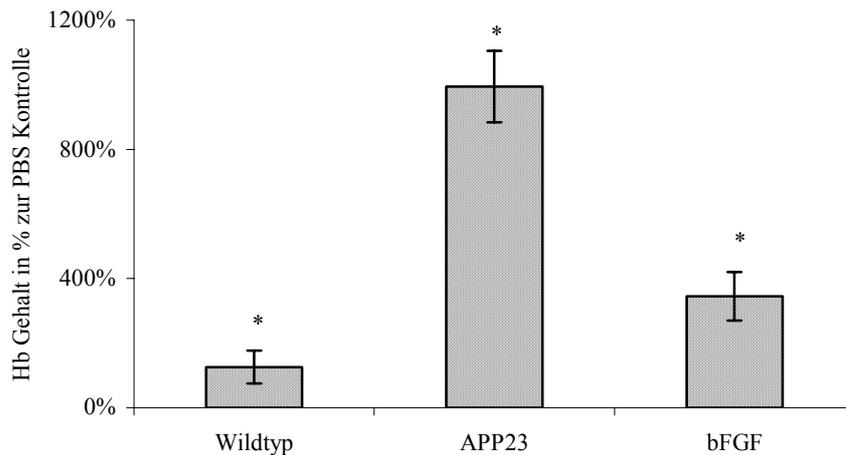


Abb. 17) Photometrische Hb Bestimmung aus „Matrigel plug“. Der mit der Anzahl neugebildeter Gefäße korrelierende Hb Gehalt wurde mittels „Drabkin’s assay“ bestimmt. Der Hb-Gehalt in (mg)/plug \pm SEM von Wildtyp und APP23 Homogenat sowie bFGF Positivkontrolle wurde in % zum Mittelwert des Hb-Gehalts aller PBS Negativkontrollen angegeben. * APP23 Gehirn induzierte signifikant mehr Angiogenese wie Wildtyp Hirnhomogenat oder auch wie die bFGF Positivkontrolle ($p < 0,02$).

Morphologischer Nachweis von Blutgefäßen in „Matrigel plugs“ mit der Masson Trichrom Färbung

Für die histologische Färbung wurden die „plugs“ nach der Entnahme über Nacht in Formalin fixiert und am nächsten Tag in Paraffin ausgegossen. Die Schnitte wurden Masson Trichrom gefärbt. Dabei stellen sich kollagenhaltige Strukturen wie das Matrigel blau dar; Muskulatur und Blutgefäße sowie Erythrozyten erscheinen rot und Zellkerne werden schwarz gefärbt (s. Abb.19).

Zur Quantifizierung der Angiogenese wurden die Gefäße pro Gesichtsfeld im „plug“ gezählt. Berücksichtigt wurden dabei nur erythrozytenhaltige Blutgefäße. APP23 Hirnhomogenat induzierte deutlich mehr Gefäßeinsprossung wie das Wildtyp Hirnhomogenat und die PBS Negativkontrolle (s. Abb.18).

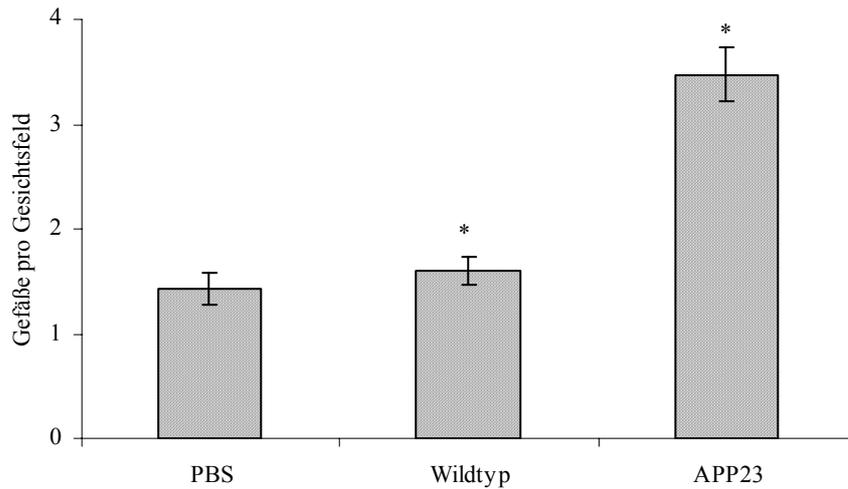


Abb. 18) Masson Trichrom Färbung des „Matrigel plugs“. Erythrozytenhaltige Gefäße wurden pro Gesichtsfeld ausgezählt. * Die Unterschiede zwischen Wildtyp und APP23 Hirnhomogenat waren signifikant ($p < 0.01$).

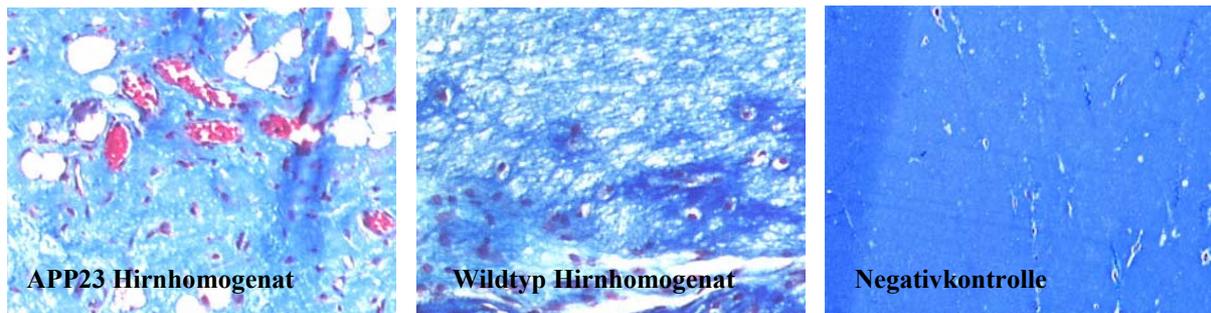


Abb. 19) Bilder der Masson Trichrom Färbung. Matrigel stellt sich blau dar, Erythrozyten erscheinen rot. APP23 Hirnhomogenat induzierte im Gegensatz zu Wildtyp Hirnhomogenat und der Negativkontrolle deutliche Gefäßeinsprossung im „Matrigel plug“.

Nachweis von VE-Cadherin in „Matrigel plugs“

„Vascular endothelial (VE) Cadherin“ ist ein auf ruhenden Endothelzellen vorkommendes Protein. Es trägt durch den Aufbau interendothelialer Zellkontakte zur Abdichtung des Gefäßes und zum Aufbau einer Permeabilitätsbarriere bei (7). Mittels Western blot wurde die Menge an VE-Cadherin im „Matrigel plug“ mit APP23- bzw. Kontroll-Hirnhomogenat bestimmt. Als Negativkontrolle wurde Matrigel mit PBS oder Lysepuffer vermengt, als Positivkontrolle wurden HUVEC Zellysate verwendet. In den Kontrollgehirn „plugs“ war nur sehr wenig VE-Cadherin enthalten, wohingegen die APP23 „plugs“ eine gut sichtbare Bande im Western blot bildeten (s. Abb.20).

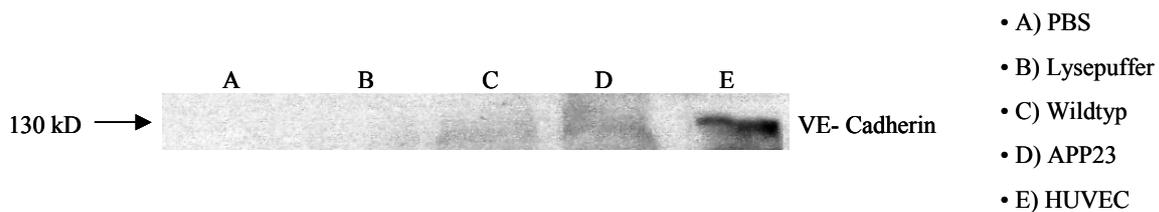


Abb. 20) Anti-VE-Cadherin Western blot aus „Matrigel plug Lysaten“. APP23 Hirnhomogenat enthielt im Gegensatz zu Wildtyp Hirnhomogenaten deutlich erkennbare Mengen an VE-Cadherin. Als Positivkontrolle wurde ein HUVEC Zellysat verwendet.

Angiogenesehemmung im „Matrigel plug“ durch Medikamente

Ergebnisse epidemiologischer Studien zeigen, dass Medikamente aus der kardiovaskulären Medizin die Prognose von AD Patienten verbessern. Wie bereits diskutiert, ist ein Angiogenese hemmender Effekt dieser Medikamente eine denkbare Erklärung (9, 74, 58, 66). In vorliegender Arbeit wurde diese Hypothese getestet. In den vorherigen Experimenten wurde gezeigt, dass APP23 Hirnhomogenat im Matrigel plug Angiogenese induzieren kann. Es wurde in diesem Versuch nun getestet, ob durch die Hinzugabe entweder von Aspirin (ASS), Mevinolin, Thalidomid oder den Inhibitor der VEGF Rezeptortyrosinkinase SU 4312 die durch APP23 Hirn induzierte Angiogenese modulierbar ist. Der Mechanismus, wie NSAIDs, also auch das Aspirin, die Angiogenese beeinflussen können wurde bereits diskutiert. Der Angiogenese hemmende Effekt von Thalidomid ist seit langem bekannt und wird therapeutisch z.B. für die Behandlung des multiplen Myeloms genutzt. Unklar ist allerdings, wie Thalidomid die Angiogenese hemmt. Mevinolin ist ein HMG-CoA Reduktasehemmer (Statin). Als mögliche Angiogenese hemmende Effekte dieser Medikamentengruppe werden eine Beeinflussung Rho-abhängiger Signaltransduktionswege, eine Hemmung der β 3-Integrin Expression und eine Modifikation von Genen für die Regulation der Angiogenese diskutiert (70). Da mit Lovastatin inkubierte neurale Zelllinien eine Vermehrung von APPs- α im Medium beobachtet wurde, könnte auch eine Induktion des α -Sekretase Aktivität und damit die Förderung des anti-amyloidogenen Wegs der APP Prozessierung für den protektiven Effekt der Statine verantwortlich sein (68). SU 4312 ist ein kleines Molekül, welches an den VEGF Rezeptor bindet und so die Proliferation, Migration und das Überleben von Endothelzellen und damit die Angiogenese stoppen kann.

Die genannten Medikamente reduzierten die Angiogenese in den „plugs“ signifikant. Nur Thalidomid konnte die Gefäßneubildung nicht signifikant vermindern. Die Ergebnisse stammen aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Die Gefäßeinsprossung im „plug“ wurde photometrisch mit dem „Drabkin´s assay“ bestimmt und in der Auswertung als Hb(mg) ± SEM pro plug angegeben. Im abgebildeten Diagramm wurden alle Ergebnisse in % zum Mittelwert der PBS Negativkontrolle berechnet (s. Abb.21).

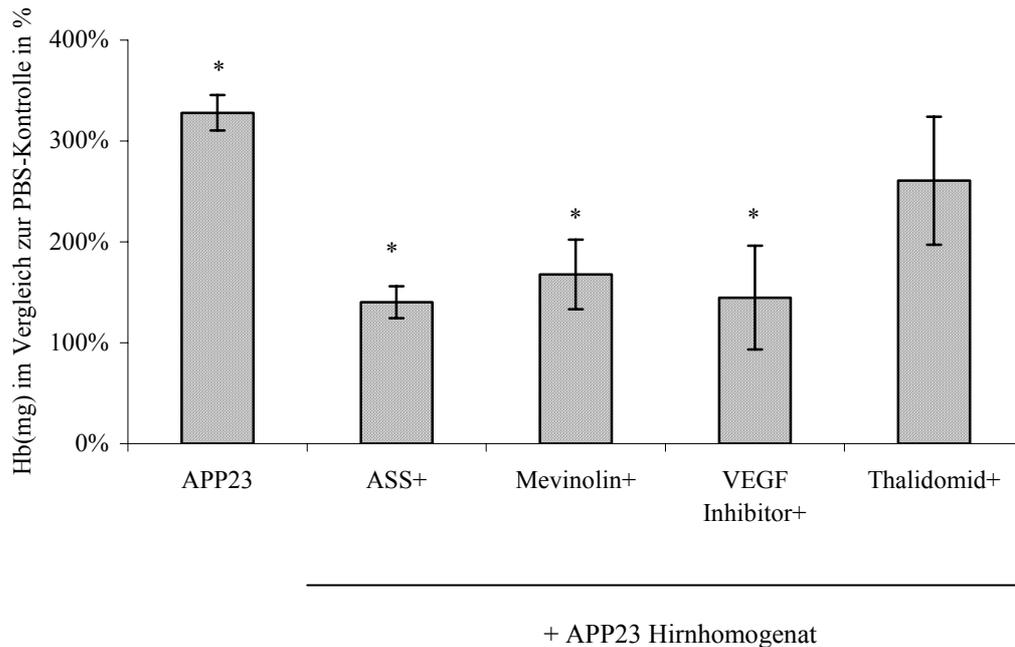


Abb. 21) Hemmung der durch APP23 Hirnhomogenat induzierten Angiogenese durch Medikamente. * ASS, Mevinolin und VEGF Rezeptotyrosinkinaseinhibitor konnten die APP23 Hirnhomogenat induzierte Angiogenese signifikant verringern ($p < 0,05$).

Thalidomid reduzierte die Gefäßeinsprossung nicht signifikant. Die Ergebnisse wurden in Hb(mg)/plug ± SEM angegeben und prozentual auf die Angiogeneseinduktion durch die Negativkontrolle bezogen.

Diskussion

In dieser Arbeit wurde das Auftreten von Angiogenese sowie die Korrelation von vaskulärer Pathologie mit Amyloidablagerungen in Gehirngefäßen in einem transgenen Tiermodell für AD untersucht. CAA sowie Amyloidablagerungen im Gehirnparenchym waren bereits bei den jungen, 11 Monate alten APP23 Mäusen vorhanden und stiegen mit zunehmendem Alter signifikant an. Plaques sind ein pathognomisches Merkmal der AD Erkrankung. Bei den APP23 Tieren konnten sie in typischer Lokalisation nachgewiesen werden, Wildtyp Mäuse blieben von der Plaque Pathologie verschont.

In geringerer Anzahl wie bei den APP23 Mäusen konnte auch bei den Wildtyp Tieren eine altersabhängige, diskrete CAA festgestellt werden. Es ist beim Menschen bekannt, dass CAA auch ohne dementielle Symptome sowie post mortem fehlenden typischen AD Korrelaten wie Plaques und „tangles“ auftreten kann. Die Prävalenz für CAA in Autopsiestudien liegt im Bereich von 10-40%. Im Falle von AD tritt die CAA häufiger, in etwa 80% auf. CAA scheint im Laufe des Alterungsprozesses ein häufiges Phänomen zu sein (10, 14, 22). Es gibt Daten, dass bei schwerer CAA im Rahmen von AD sogar weniger Plaques und „tangles“ nachweisbar sind. Trotzdem können klinisch keine Unterschiede in der Schwere der kognitiven Einbußen bei AD Patienten mit und ohne CAA erhoben werden. Inwieweit die CAA klinisch die Schwere oder das Auftreten der Demenz beeinflusst, bleibt ein Rätsel (23). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass A β sowohl bei APP23 als auch bei Wildtyp Mäusen im perivaskulären Raum nachweisbar ist, was infolge eines Abtransportes von A β aus dem Gehirn interpretiert werden kann (61). Möglicherweise ist der positive Amyloid Nachweis in Gefäßen einiger Wildtyp Mäuse bei vorliegenden Experimenten nicht als CAA, sondern als das Ergebnis der Eliminierung von A β aus dem Gehirn zu sehen.

Die Expression des Angiogenesemarkers β 3-Integrin konnte erst später, ab einem Alter von 17 Monaten, in den Gefäßen der APP23 Mäuse beobachtet werden. Wie in der Doppelimmunhistochemie gezeigt, war die Expression von β 3-Integrin nur in Amyloid-positiven Gefäßen detektierbar. Damit liegt die Vermutung nahe, dass die CAA mit ihren Folgen wie Hypoperfusion und Hypoxie kausal für die β 3-Integrin Expression ist. Lösliches Amyloid ist bei APP23 Mäusen sehr früh ab einem Alter von 6 Wochen (67), CAA erst ab einem Alter von 1 Jahr nachweisbar (56, 57). Lösliches A β alleine kann damit als Stimuli für die β 3-Integrin Expression nicht ausreichend sein, scheinbar ist eine strukturelle Schädigung der Gefäßwand durch Ablagerung fibrillärer A β -Peptide zusätzlich nötig.

Da in der Tc-99m Annexin V Biodistribution in vivo endotheliale Apoptose in APP23 Mäusen nachgewiesen wurde, könnte die β 3-Integrin Expression auch als Reparaturmechanismus infolge endothelialer Schädigung und nicht als direkte Folge der Amyloidangiopathie verstanden werden. Es wäre gut denkbar, dass z.B. Thrombin, welches an Stellen endothelialer Schädigung akkumuliert, in diesem Fall für die Angiogeneseinduktion im AD Hirn in Frage kommt (65).

Endotheliale Apoptose tritt auch während der Angiogenese auf. Sie kann direkt induziert werden durch Thrombospondin-1, Angiostatin, TNF und viele andere Faktoren oder indirekt durch eine verminderte Anzahl an Stimulatoren des endothelialen Zellüberlebens, wie z.B. VEGF oder Integrine. VEGF schützt endotheliale Zellen vor der TNF induzierten Apoptose durch die Hochregulation von β 3-Integrin und Fibronectin, welche die Adhäsion zur ECM vermitteln und damit das Überleben von migrierenden Endothelzellen sichern (43). Es wäre daher denkbar, dass die in der Tc99m-Annexin V Biodistribution detektierte Apoptose im Rahmen der Angiogenese bei APP23 Mäusen aufgetreten ist. Für diese Vermutung spricht, dass β 3-Integrin Hochregulation und endotheliale Apoptose ungefähr zeitgleich, ab dem 17. Lebensmonat der APP23 Mäuse, auftrat. Ein Gegenargument dieser These ist, dass in der CD31 Immunhistochemie keine Zunahme der Gefäßdichte gezeigt werden konnte und damit Angiogeneseinduktion mit echter Blutgefäßneubildung im APP23 Gehirn unwahrscheinlich erscheint.

Wie und ob die endotheliale Aktivierung zur Demenzentwicklung beiträgt, ist unklar. Wie bereits diskutiert, beginnt im APP23 Tiermodell der Abfall geistiger Leistungen bereits zu einem Zeitpunkt von 3 Monaten, wo nur lösliches A β und noch keine morphologisch fassbaren Veränderungen im APP23 Gehirn vorhanden sind (67, s. Abb. 8). Die Expression von β 3-Integrin ist deutlich später, ab 17 Monaten, nachweisbar. Es ist also unwahrscheinlich, dass die endotheliale Pathologie die neuropsychologischen Veränderungen bei den APP23 Mäusen hervorruft. Möglicherweise trägt sie aber zu deren Verschlimmerung bei.

In der Literatur wird immer wieder die Akkumulation von VEGF in der Gefäßwand bzw. in der Nähe von Amyloidablagerungen des AD Hirns beschrieben (25, 77). Möglicherweise wird die endotheliale Aktivierung im AD Gehirn durch VEGF, welches sich in unmittelbarer Nähe zu den Blutgefäßen befinden kann, ausgelöst. Dafür spricht auch das Ergebnis des „Matrigel plug assays“, in dem die von APP23 Hirnhomogenat induzierte Angiogenese mit VEGF Rezeptortyrosinkinase gehemmt werden konnte.

Die Mechanismen der in der Literatur beschriebenen Angiogenese blockierenden Wirkung von Thalidomid sind unklar. Als mögliche Ursachen wurde die Hemmung des

Transkriptionsfaktors NF-kappaB und damit verbundene antiinflammatorische Effekte, aber auch eine Verringerung von VEGF Rezeptoren auf der Oberfläche von Endothelzellen mit daraus resultierenden Defekten in Blutgefäßen diskutiert (76, 27). Eine andere, sehr interessante These führt die anti-angiogenetischen und teratogenen Effekte von Thalidomid auf eine Hemmung der Wachstumsfaktoren FGF-2 und IGF-1 zurück, welche besonders in der Umgebung embryonaler Extremitätenknospen hochreguliert werden. Ohne IGF und FGF wird die Produktion von β 3-Integrin verhindert und die Angiogenese gehemmt (55). Im „Matrigel plug assay“ konnte Thalidomid als einziges getestetes Medikament die Angiogenese nicht signifikant vermindern. Es ist eine mögliche Schlussfolgerung, dass FGF als Wachstumsfaktor im AD Hirn nur eine untergeordnete Rolle spielt und damit Thalidomid, welches möglicherweise besonders die FGF induzierte Angiogenese hemmt, keine signifikante Wirkung erzielen konnte.

Es wurde gezeigt, dass APP23 Hirnhomogenate isoliert in der Lage waren, im „Matrigel plug“ in vivo Angiogenese zu induzieren. Auf der anderen Seite, konnte in der CD31 Immunhistochemie keine Zunahme der Gefäßdichte in Schnitten von APP23 Mäusen beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass VEGF durch seine Bindung an Amyloid bzw. an Proteine der ECM (77, 63) zumindest teilweise inaktiviert wird und so zwar noch in der Lage ist, Endothelzellen zu aktivieren, aber keine echte Gefäßneubildung zu induzieren. Für die Durchführung des „Matrigel plug assays“ wurden die APP23 Gehirne homogenisiert. Möglicherweise war das VEGF durch diesen Vorgang nicht mehr an bestimmte Strukturen gebunden und konnte so im „Matrigel plug“ wieder als Angiogenesefaktor wirken und die Einwanderung neuer Blutgefäße in den „plug“ verursachen. Wie bereits erwähnt, wurde gezeigt, dass die Angiogenese im „plug“ durch Medikamente aus der kardiovaskulären Medizin hemmbar ist. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten epidemiologischer Studien überein, dass Medikamente wie NSAIDs oder Statine die Prognose von AD Patienten verbessern können. Die Bedeutung dieser Medikamente liegt eventuell in der Blockierung der endothelialen Zellaktivierung und nicht in der Angiogenesehemmung, da ja die Gefäßdichte in APP23 Mäusen unverändert war im Vergleich zu Kontrolltieren. Da AD Patienten im Vergleich zu den APP23 Mäusen, welche das APP 7-fach stärker als Kontrolltiere exprimieren, keinen so hohen Amyloid (Plaque) load besitzen, ist anzunehmen, dass auch bei ihnen die Gefäßdichte unbeeinflusst bleibt.

Die Diagnose von AD gestaltet sich immer noch schwierig. In den meisten Fällen ist erst post mortem durch die Histopathologie die definitive Diagnosestellung möglich. Die Entwicklung bildgebender Verfahren ist wichtig für die (Früh)Erkennung von AD zu Lebzeiten des

Patienten. Es sind mehrere Methoden bereits im Einsatz. Mit dem PET kann bei AD Patienten nicht nur ein verringerter ^{18}F -Fluordesoxyglucose Stoffwechsel besonders in frontotemporalen Hirnregionen nachgewiesen werden, sondern es können gezielt auch radioaktiv markierte Liganden zum Imaging von Amyloid Ablagerungen verabreicht werden. Dazu gehören ^{18}F FDDNP, welches an unlösliche A β -Plaques und neurofibrilläre „tangles“ bindet oder auch „Pittsburgh Compound-B“ (PBC), welches selektiver an A β -Plaques und weniger an die „tangles“ bindet. Auch das MRT ist in der Bildgebung von AD von Nutzen. Ein großer Vorteil gegenüber dem PET besteht in der besseren räumlichen Auflösung des MRTs. Sogar Strukturen des Hippocampus, welcher zu einem frühen Zeitpunkt im AD Verlauf betroffen ist, können sichtbar gemacht werden. Der Nachteil des MRTs ist, dass sich Amyloid Plaque Imaging schwerer gestaltet. In früheren MRT Studien wurde meist A β als Ligand verwendet, mit Gadolinium oder Eisenpartikeln gekoppelt und i.v. verabreicht. Man dachte, dass A β , welches eine hohe Affinität zu bereits aggregierten Amyloid Plaques besitzt, sich im Hirnparenchym anreichern würde und z.B. durch das Gadolinium sichtbar gemacht werden könnte. Die Blut-Hirn-Schranke konnte jedoch von den A β -Liganden nicht überschritten werden (19). Erfolge im Imaging von Amyloid Plaques mittels MRT konnten mit dem MRT sensitiven ^{19}F gemacht werden, welches Blut-Hirn-Schranken Permeabilität besitzt und Liganden, welche ^{19}F enthalten und an Amyloid gebunden sind, detektieren kann (18). Wie eingangs erwähnt, scheinen die löslichen A β Oligomere jedoch toxischer zu wirken und mit der Pathogenese und der Demenzzentwicklung von AD in engerem Zusammenhang zu stehen wie die A β Plaques. Eine Imaging Methode, welche das lösliche A β detektiert ist laut meinem Kenntnisstand noch nicht bekannt.

Integrine werden als Zielstrukturen in der Diagnostik und Therapie von Tumoren genutzt. β 3-Integrin, welches während der Tumorangio-genese überexprimiert wird, ist ein Rezeptor für extrazelluläre Matrixproteine mit der Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) Tripeptid Sequenz. Radiogelabelte RGD Peptide, wie z.B. das $[^{18}\text{F}]$ Galacto-RGD, sind als β 3-Integrin detektierende Radiotracer in klinischer Erprobung. In SPECT oder PET Untersuchungen kann also mit Hilfe von RGD Peptiden die β 3-Integrin Hochregulation sichtbar gemacht werden oder auch als Zielstrukturen für die Verabreichung von Medikamenten dienen (31). Möglicherweise könnte die β 3-Integrin Expression in Endothelzellen bei AD für ähnliche Zwecke in Zukunft genutzt werden.

Wie sich die Angiogenese auf die Progression von AD auswirkt, bleibt nach wie vor ein Rätsel. In dieser Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass spezifische Angiogenese Marker im Endothel von APP23 Mäusen hochreguliert werden. Diese Marker könnten in Zukunft

ebenfalls interessante Zielstrukturen für die Bildgebung oder für die Verabreichung von Medikamenten bei AD Patienten darstellen. Es ist auch möglich, dass neue endotheliale Marker stärker im Gehirn von AD Patienten exprimiert werden als β 3-Integrin und somit als Zielstruktur für Imaging Verfahren noch besser geeignet sind.

Zusammenfassung

AD ist die häufigste Demenzerkrankung weltweit. Senile Plaques, bestehend aus aggregierten A β -Peptiden und neurofibrilläre „tangles“ im Gehirnparenchym sind genauso histopathologisches Korrelat der Erkrankung wie die zerebrale Amyloidangiopathie. Es wird angenommen, dass die Toxizität von A β eine führende Ursache für die Neurodegeneration und damit die Entwicklung der klinischen Symptomatik ist.

Amyloid hat nicht nur Effekte auf Neurone, sondern auch auf zerebrale Blutgefäße. A β induziert in Gefäßen Hypoxie, Blutflussturbulenzen und in vitro sogar Endothelzellapoptose. Die Induktion eines Reparaturmechanismus im Sinne von Angiogenese ist denkbar. Passend dazu zeigen auch die Ergebnisse epidemiologischer Studien, dass Medikamente aus der kardiovaskulären Medizin mit einem bekannten anti-Angiogenese Effekt die Prognose von AD Patienten entscheidend verbessern.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei APP23 Mäusen- einem transgenen Tiermodell für AD- mit zunehmendem Alter vermehrt Ablagerung von Amyloid im Gehirnparenchym und in Gehirngefäßen auftrat. Ab einem Alter von 17 Monaten konnte endotheliale Apoptose sowie endotheliale Aktivierung, gekennzeichnet durch die Expression von β 3-Integrin, einem Marker der Angiogenese beobachtet werden. β 3-Integrin Expression war an das Vorhandensein von Amyloid in der Gefäßwand gebunden.

In einem in vivo Matrigel-Angiogenese-assay waren Gehirnhomogenate von APP23 Mäusen in der Lage, Blutgefäßneubildung zu induzieren. Die Gefäßneubildung konnte durch den VEGF Rezeptortyrosinkinaseinhibitor SU4312 wie auch durch ASS und Statine geblockt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Medikamente mit der endothelialen Zellaktivierung in AD interferieren.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Amyloidablagerungen in Gefäßen, endotheliale Apoptose und endotheliale Zellaktivierung, welche durch Angiogenese hemmende Medikamente moduliert werden kann, miteinander assoziiert sind.

Literaturverzeichnis

- (1) Beckmann N, Schuler A, Mueggler T et al. Age-dependent cerebrovascular abnormalities and blood flow disturbances in APP23 mice modeling Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 23(24): 8453-9 (2003)
- (2) Bird IN, Taylor V, Newton JP et al. Homophilic PECAM-1 (CD31) interactions prevent endothelial cell apoptosis but do not support cell spreading or migration. *J Cell Sci.* 112 (Pt 12): 1989-97 (1999)
- (3) Blanc EM, Toborek M, Mark RJ et al. Amyloid beta-peptide induces cell monolayer albumin permeability, impairs glucose transport, and induces apoptosis in vascular endothelial cells. *J Neurochem.* 68(5): 1870-1881 (1997)
- (4) Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA et al. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science.* 264 (5158): 569-71 (1994)
- (5) Calhoun ME, Burgermeister P, Phinney AL et al. Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(24):14088-93 (1999)
- (6) Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 6 (4): 389-395 (2000)
- (7) Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 9 (6): 653-660 (2003)
- (8) Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ et al. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci.* 8(1): 79-84 (2005)
- (9) Etminan M, Gill S, Samii A. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ.* 327(7407): 128 (2003)
- (10) Esiri MM, Nagy Z, Smith MZ et al. Cerebrovascular disease and threshold for dementia in the early stages of Alzheimer's disease. *Lancet.* 345: 919-20 (1999)
- (11) Gentile MT, Vecchione C, Maffei A et al. Mechanisms of soluble beta-amyloid impairment of endothelial function. *J Biol Chem.* 279(46): 48135-42 (2004)
- (12) Grammas P, Moore P, Weigel PH. Microvessels from Alzheimer's disease brains kill neurons in vitro. *Ann J Pathol.* 154(2): 337-42 (1999)
- (13) Grammas P, Ovase R. Inflammatory factors are elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 22(6): 837-42 (2001)
- (14) Greenberg S, Gurol ME, Rosand J et al. Amyloid angiopathy-related vascular cognitive impairment. *Stroke.* 35: 2616-2619 (2004)

- (15) Handbuch Immunchemische Färbemethoden, 3. Auflage. Dako Cytomation Corp. (2003)
- (16) Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 297(5590): 353-356 (2002)
- (17) Herzig MC, Van Nostrand WE, Jucker M. Mechanisms of cerebral β -amyloid angiopathy: murine and cellular models. *Brain Pathol*. 16: 40-54 (2006)
- (18) Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y et al. 19F and 1H MRI detection of amyloid beta plaques in vivo. *Nat Neurosci*. 8(4): 527-33 (2005)
- (19) Huddleston DE, Small SA. Technology insight: imaging amyloid plaques in the living brain with positron emission tomography and MRI. *Nat Clin Pract Neurol*. 1(2): 96-105 (2005)
- (20) Iadecola C, Zhang F, Niwa K et al. SOD1 rescues cerebral endothelial dysfunction in mice overexpressing amyloid precursor protein. *Nat Neurosci*. 2(2): 157-161 (1999)
- (21) In't Veld BA, Ruitenber A, Hofman A et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *New Engl J Med*. 345: 1515-21 (2001)
- (22) Jellinger KA. Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update. *J Neural Transm*. 109: 813-36 (2002)
- (23) Jellinger KA, Attems J. Prevalence and pathogenic role of cerebrovascular lesions in Alzheimer disease. *J Neurol Sci*. 229-330: 37-41 (2005)
- (24) Jones MK, Wang H, Peskar BM et al. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med*. 5(12): 1418-23 (1999)
- (25) Kalaria RN, Cohen DL, Premkumar DR et al. Vascular endothelial growth factor in Alzheimer's disease and experimental cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res*. 62(1): 101-105 (1998)
- (26) Kalaria RN. Small vessel disease and Alzheimer's dementia: pathological considerations. *Cerebrovasc Dis*. 13 Suppl 2: 48-52 (2002)
- (27) Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP et al. Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of IkappaB kinase activity. *J Biol Chem*. 276 (25): 22382-7 (2001)
- (28) Lahorte CM, Vanderheyden JL, Steinmetz N et al. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 31: 887-919 (2004)

- (29) Lim GP, Yang F, Chu T et al. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 20(15): 5709-14 (2000)
- (30) Lim GP, Yang F, Chu T et al. Ibuprofen effects on Alzheimer pathology and open field activity in APPsw transgenic mice. *Neurobiol Aging.* 22(6): 983-91 (2001)
- (31) Liu S. Radiolabeled multimeric cyclic RGD peptides as integrin $\alpha v \beta 3$ targeted radiotracers for tumor imaging. *Mol Pharm.* 3(5): 472-87 (2006)
- (32) Lleo A, Berezovska O, Growdon J et al. Clinical, pathological and biochemical spectrum of Alzheimer disease associated with PS-1 mutations. *Am J Geriatr Psychiatry.* 12(2): 146-56 (2004)
- (33) Luo Y et al. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat. Neurosci.* 4: 231-232 (2001)
- (34) Mann DM, Pickering-Brown SM, Takeuchi A et al. Amyloid angiopathy and variability in amyloid beta deposition is determined by mutation position in presenilin-1-linked Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 158(6): 2165-75 (2001)
- (35) Mattson MP. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev.* 77(4):1081-1132 (1997)
- (36) Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 430(7000): 631-639 (2004)
- (37) McGeer PL, McGeer EG. NSAIDs and Alzheimer disease: Epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging.* 28(5): 639-47 (2006)
- (38) McNamara MJ, Gomez-Isla T, Hyman BT. Apolipoprotein E Genotype and Deposits of A β 40 and A β 42 in Alzheimer Disease. *Arch Neurol.* 55(7): 1001-4 (1997)
- (39) Merlini G, Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med.* 349: 583-96 (2003)
- (40) Mucke L, Masliah E, Yu GQ et al. High-level neuronal expression of abeta1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci.* 20(11): 4050-4058 (2000)
- (41) Niwa K, Younkin L, Ebeling C et al. A β 1-40 related reduction in functional hyperemia in mouse neocortex during somatosensory activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(17): 9735-9740 (2000)
- (42) Norrby K. In vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 10 (3): 588-612 (2006)
- (43) Nor JE, Polverini PJ. Role of endothelial cell survival and death signals in angiogenesis. *Angiogenesis.* 3(2): 101-116 (1999)

- (44) Paris D, Townsend K, Quadros A et al. Inhibition of angiogenesis by Abeta peptides. *Angiogenesis*. 7(1): 75-87 (2004)
- (45) Postina R et al. A disintegrin metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* 113: 1456- 1464 (2004)
- (46) Revesz T, Holton JL, Lashley T et al. Sporadic and familial cerebral amyloid angiopathies. *Brain Pathol.* 12:343-57 (2002)
- (47) Reynolds LE, Wyder L, Lively JC et al. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat. Med.* 8(1): 27-34 (2002)
- (48) Ruegg C, Mariotti A. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 60: 1135-57 (2003)
- (49) Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 298(5594): 789-791 (2002)
- (50) Selkoe DJ, Schenk D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43: 545-584 (2003)
- (51) Selkoe DJ. The ups and downs of Abeta. *Nat Med.* 12(7): 758-9 (2006)
- (52) Shweiki D, Itin A, Soffer D et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 359(6398): 843-845 (1992)
- (53) Siedlak SL, Cras P, Kawai M et al. Basic fibroblast growth factor binding is a marker for extracellular neurofibrillary tangles in Alzheimer disease. *J Histochem Cytochem.* 39(7): 899-904 (1991)
- (54) Soffer D. Cerebral amyloid angiopathy- a disease or age-related condition. *IMAJ*. 8: 803-805 (2006)
- (55) Stephens TD, Fillmore BJ. Hypothesis: thalidomide embryopathy-proposed mechanisms of action. *Teratology*. 61(3): 189-195 (2000)
- (56) Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94(24):13287-13292 (1997)
- (57) Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M. Pathogenic mechanisms of Alzheimer's Disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. *Ann N Y Acad Sci*. 920: 134-139 (2000)

- (58) Szekely CA, Thorne JE, Zandi PP et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease: a systematic review. *Neuroepidemiology*. 23(4): 159-69 (2004)
- (59) Tamagno E, Bardini P, Guglielmotto M et al. The various aggregation states of beta-amyloid 1-42 mediate different effects on oxidative stress, neurodegeneration, and BACE-1 expression. *Free Radic Biol Med*. 41(2): 202-12 (2006)
- (60) Tarkowski E, Issa R, Sjögren M et al. Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF- β in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiol Aging*. 23(2): 237-243 (2002)
- (61) Thal DR, Larionov S, Abramowski D et al. Occurrence and co-localization of amyloid β -protein and apolipoprotein E in perivascular drainage channels of wild-type and APP-transgenic mice. *Neurobiol of aging*. 28: 1221-1230 (2007)
- (62) Thomas T, McLendon C, Sutton ET et al. Cerebrovascular endothelial dysfunction mediated by β -amyloid. *NeuroReport*. 8(6): 1387-1391 (1997)
- (63) Tischer E, Mitchell R, Hartmann T et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon slicing. *J Biol Chem*. 266(18): 11947-11954 (1991)
- (64) Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *J Biol Chem*. 274(34): 23969-23976 (1999)
- (65) Tsopanoglou NE, Andriopoulou P, Maragoudakis ME. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis: involvement of α v β 3-integrin. *Am J Physiol Cell Physiol*. 283(5): C1501-C1510 (2002)
- (66) Vagnucci AH, Li WW. Alzheimer's disease and angiogenesis. *Lancet*. 361(9357): 605-8 (2003)
- (67) Van Dam D, D'Hooge R, Staufenbiel M et al. Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *Eur J Neurosci*. 17(2): 388-96 (2003)
- (68) Vardy E, Catto A, Hooper N. Proteolytic mechanisms in amyloid- β metabolism: therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*. 11(10): 464-72 (2005)
- (69) Vassar R, Citron M. A β -generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research. *Neuron*. 27(3):419-422 (2000)

- (70) Vincent L, Albanese P, Bompais H et al. Insights in the molecular mechanisms of the anti-angiogenic effect of an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Thromb Haemost.* 89 (3): 530-7 (2003)
- (71) Walsh DM, Selkoe DJ. A β Oligomers-a decade of discovery. *J of Neurochem.* 101:1172-1184 (2007)
- (72) Walter J, Kaether C, Steiner H et al. The cell biology of Alzheimer's disease: uncovering the secrets of secretases. *Curr Opin Neurol.* 11(5):585-590 (2001)
- (73) Weggen S, Eriksen J, Sagi S et al. Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid β 42 production by direct modulation of γ -secretase activity. *J Biol Chem.* 278: 31831-31837 (2003)
- (74) Wolozin B, Kellman W, Russeau P et al. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol.* 57(10): 1439-43 (2000)
- (75) Wong GT et al. Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411, 575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 279: 12876-12882 (2004)
- (76) Yabu T, Tomimoto H, Taguchi Y et al. Thalidomide-induced antiangiogenic action is mediated by ceramide through depletion of VEGF receptors, and is antagonized by sphingosine-1-phosphate. *Blood.* 106 (1): 125-34 (2005)
- (77) Yang SP, Bae DG, Kang HJ et al. Co-accumulation of vascular endothelial growth factor with beta-amyloid in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 25(3): 283-290 (2004)
- (78) Yankner BA. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron.* 16(5):921-932 (1996)
- (79) Zandi PP, Breitner JC. Do NSAIDs prevent Alzheimer's disease? And, if so, why? The epidemiological evidence. *Neurobiol Aging.* 22(6): 811-817 (2001)

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------------|--|
| Aβ | Amyloid β |
| AD | „Alzheimer´s disease“ |
| A.d. | Aqua destillata |
| ADAM | “a disintegrin and metalloprotease” |
| ALCR | “lever cyclic ratio test” |
| Aph-1 | “anterior pharynx defective-1” |
| APOE | Apolipoprotein E |
| APP | „amyloid precursor protein“ |
| BACE | “ β -site APP cleaving enzyme” |
| bFGF | „basic fibroblastic growth factor“ |
| CAA | Zerebrale Amyloidangiopathie |
| CBF | Zerebraler Blutfluß |
| COX | Cyclooxygenase |
| CTF | C-terminales Fragment |
| ECM | Extrazelluläre Matrix |
| eNOS | Endotheliale NO Synthase |
| FDDNP | [¹⁸ F] fluoroethyl-methyl-amino-2-naphthyl-ethylidene malononitrile |
| HIF | Hypoxie induzierbarer Transkriptionsfaktor |
| Hb | Hämoglobin |
| HUVEC | „human umbilical venous endothelial cells“ |
| ID | Injizierte Dosis |
| IDE | „insuline degrading enzyme“ |
| IL | Interleukin |
| MAP | Mitogen aktivierte Proteinkinase |
| MRT | Magnet Resonanz Tomographie |
| MMP | Matrix Metalloproteinase |
| NGF | „nerve growth factor“ |
| NSAID | Nicht steroidale antiinflammatorische Medikamente |
| PKC | Protein Kinase C |
| PECAM-1 | „platelet endothelial cell adhesion molecule-1“ |
| Pen-2 | „presenilin enhancer-2“ |

| | |
|---------------|---|
| PDGF | „platelet derived growth factor“ |
| PET | Positronen Emission Tomographie |
| PS | Preseniline |
| PBC | „Pittsburgh compound-B“ |
| SEM | „standard error of mean“ |
| SOD | Superoxiddismutase |
| SPECT | „single photone emission tomography“ |
| TGF- β | „transforming growth factor β “ |
| TNF- α | Tumor Nekrose Faktor α |
| Tricine | N-[Tris(hydroxymetyl)methyl]glycine; N-[2-Hydroxy- 1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine |
| VEGF | „vascular endothelial growth factor“ |

Danksagung

Mein Dank geht zunächst an die Mitglieder meiner Arbeitsgruppe Birgit Blechert, Florian Gärtner, Mario Vallon, Enken Drecolll und Jan Müller für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung bei zahlreichen Versuchen. Den „Jungs“ möchte ich besonders für die Lösung vieler meiner Computerprobleme danken. Besonders gerne erinnere ich mich an die Zeit, als Birgit und ich als Labor Neulinge so manche Stunden im Histo Kämmerchen zubrachten und uns gegenseitig immunhistochemische Färbemethoden beizubringen versuchten. Ich danke ihr ganz herzlich für die wirklich tolle und zuverlässige Unterstützung besonders bei den Biodistributionen, den γ -Kamera Aufnahmen und den Immunhisto Färbungen.

Mein ganz besonderer Dank geht aber an meinen Doktorvater Markus Essler. Ich danke ihm für die exzellente Betreuung, die tatkräftige Unterstützung bei Experimenten und auch für seine Geduld, besonders zu Zeiten, als wir unser paper in „Angiogenesis“ veröffentlichten. Ich hab mich während der ganzen Zeit meiner Doktorarbeit wirklich bestens von ihm unterstützt und nie alleine gefühlt. Es war ein echter Glücksgriff, dass ich meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen durfte.

Danken möchte ich natürlich auch dem Leiter der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik Prof. Markus Schwaiger und Frau Prof. Reingard Senekowitsch-Schmidtke für die Möglichkeit, die ich hatte meine Doktorarbeit in den Labors der Nuklearmedizin durchzuführen. Auch den Damen aus der Pathologie, Carmen Hartmann und Christine Kotthuber möchte ich für die Zeit, in der sie mich mit der Paraffin Immunhistochemie vertraut gemacht haben und mich geduldig an ihren Geräten herumprobieren ließen, danken.

Auch meinen Eltern und Geschwistern, sowie meinem Freund möchte ich für die Unterstützung und dafür, dass sie meine Launen bei misslungenen Versuchen während meiner Doktorarbeit tolerierten, ein herzliches Dankeschön aussprechen.

Lebenslauf

| | |
|------------------|--|
| Name | Caroline Schultheiß |
| Geburtsdatum | 28.03.1980 |
| Geburtsort | Landau |
| Nationalität | Deutsch |
| 1986-1990 | Grundschule Landau |
| 1990-1999 | Gymnasium Landau |
| 2000-2002 | Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität München |
| 2002-2006 | Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München |
| September 2003 | Beginn der Promotionsarbeit in der Klinik für Nuklearmedizin, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München |
| Seit Januar 2007 | Assistenzärztin in der Nephrologie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München |