

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H.-J. Freund

**Leptomeningeale Organkulturen als experimentelles Modell
der Cerebralen Amyloid Angiopathie**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Günther Edgar Wihl

2000

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Häussinger
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. H.-J. Freund

Koreferentin: Priv.-Doz. Dr. med. E. Neuen-Jacob

Inhaltsverzeichnis

A.	Einleitung	
1.	Pathomorphologie	2
	Makroskopisches Erscheinungsbild	2
	Mikroskopisches Erscheinungsbild	3
2.	Stand der Forschung	6
2.1	A β und APP	7
2.2	A β und Preseniline	9
2.3	A β und Apolipoprotein E	10
2.4	Neurotoxizität von A β	12
2.5	Cerebrale Amyloid Angiopathie	13
3.	Zielsetzung der eigenen Untersuchungen	14
B	Material und Methoden	16
4.	Material	16
4.1	Organkulturen	16
4.2	Arbeitsmaterialien	16
4.2.1	Geräte und Gefäße	16
4.2.2	Medien und Reagenzien	16
4.2.3	Puffer und Lösungen	19
5.	Methoden	20
5.1	Gewinnung der Gehirne	20
5.2	Präparation der Leptomeningen	20
5.3	Zellkultur	21
5.4	Immunhistologie	21
5.5	Biosynthetische Markierung und Immunpräzipitation von APP	22

5.6	Inkubation der Organkulturen mit A β	22
5.6.1	Analyse des Versuchsgewebes	23
5.6.2	Ablauf der Experimente	26
5.7	Quantifizierung von A β mittels direktem ELISA	27
C	Ergebnisse	29
6.	Gefäßviabilität	29
6.1	Viabilität und histologische Veränderung der Organkulturen	29
6.2	Immunpräzipitation von biosynthetisch markiertem APP	29
7.	Abbau von B-A β (1-40)	30
7.1	Abbau von B-A β (1-40) in Kulturmedium und Liquor cerebrospinalis durch Leptomeningen	30
7.2	Abbau von B-A β (1-40) in Kulturmedium und Liquor cerebrospinalis durch isolierte leptomeningeale Gefäße	30
7.3	Kontrollen	34
8.	Abbau von B-A β (1-42)	34
8.1	Abbau von B-A β (1-42) in Kulturmedium und Liquor cerebrospinalis durch Leptomeningen	34
8.2	Abbau von B-A β (1-42) in Kulturmedium und Liquor cerebrospinalis durch isolierte leptomeningeale Gefäße	36
8.3	Kontrollen	36
9.	Statistische Analyse der Ergebnisse	41
D	Diskussion	46
10.	Grundlagen des experimentellen Vorgehens	46
10.1	Etablierung der Organkulturen und Studien kultivierter Gefäße	47
10.2	Unterschiede zwischen A β (1-40) und A β (1-42)	48

10.3	Einfluß der Zeitachse	49
10.4	Kritikpunkte	50
10.4.1	Verhalten von Kontrollgewebe	50
10.4.2	Standardisierung der Membran-und Gefäßgröße	50
10.4.3	Übertragbarkeit auf den Menschen	51
10.5	Modell zur Pathogenese der CAA	51
10.6	Schlußfolgerung	57

E **Literaturverzeichnis**

F **Abkürzungsverzeichnis**

G **Danksagung**

H **Lebenslauf**

I **Zusammenfassung**

A. Einleitung

Alois Alzheimer berichtete im November 1906 auf der Jahrestagung der Südwestdeutschen Irrenärzte erstmals über „eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ bei einer 51jährigen Patientin.

Die im Jahr 1901 erstmalig untersuchte Frau litt an ausgeprägten Gedächtnis- und Orientierungsstörungen, assoziiert mit Aphasie, akustischen Halluzinationen und paranoiden Ideen (Alzheimer 1907). Die von Alzheimer post mortem durchgeführten neuropathologischen Untersuchungen stellen das bis heute gültige histopathologische Korrelat der Erkrankung dar: So beschrieb Alzheimer schon 1906 die „miliaren Herdchen, welche durch Einlagerung eines eigenartigen Stoffes in die Hirnrinde bedingt sind“. Damit gelang ihm die Erstbeschreibung des zentralen pathomorphologischen Elements der nach ihm benannten Erkrankung, des „senilen Plaques“ (Abb. 1, Abb. 2). Weiterhin wies er eine Verklumpung intrazellulärer Fibrillen in kortikalen Nervenzellen nach, und hatte somit das zweite definierende Kriterium, die „Alzheimerschen Fibrillenveränderungen“ (Abb. 3) beschrieben.

Bereits 1910 betrachtete Kraepelin die von Alzheimer beschriebene Demenzform als eine neue Krankheitsentität und prägte den Begriff „Alzheimersche Krankheit“ (Kraepelin 1910; historische Übersicht bei Frölich et al. 1997). Die folgende Unterscheidung in präsenile und senile Demenz, deren Kriterium der Krankheitsbeginn vor bzw. nach dem fünfundsechzigsten Lebensjahr ist, ist spätestens seit den 80er Jahren verlassen worden (Frölich et al. 1997), da sich die postulierten Formen pathomorphologisch nicht voneinander unterscheiden. Heute wird in Anlehnung an den ICD-10 Diagnoseschlüssel von der Demenz vom Alzheimer Typ (DAT) gesprochen. Alternativ wird auch der Begriff Alzheimer Demenz (AD) verwandt, auf den in der Folge Bezug genommen wird.

Als Hauptursache altersbedingter Demenzen ist die AD eine Erkrankung, deren Symptomatik eine unabhängige Existenz schwer beeinträchtigt. Es entwickeln sich progrediente Gedächtnis- und Orientierungsstörungen, in deren Verlauf das Denk- und Urteilsvermögen kontinuierlich schwinden. In späten Stadien verlieren die Patienten ihre sozialen Kompetenzen und ihre Persönlichkeitsstruktur. Sowohl die hohe Inzidenz (Bachmann et al. 1993), als auch die schwere Beeinträchtigung des Individuums bedeuten eine erhebliche soziale und finanzielle Belastung (Rice et al. 1993). Dies lässt sich an folgenden Beispielen verdeutlichen: Als Hauptursache altersverbundener

Demenz liegt die AD an vierter Stelle der Todesursachenstatistik der westlichen Welt (nach Myokardinfarkt, neoplastischen Erkrankungen und Hirninfarkt). Rund 50% der über 85jährigen Menschen in den Industrienationen erkranken an dieser Form der Demenz, in der Gruppe der 75-85jährigen sind es ca. 20% (Evans et al. 1989). Aufgrund steigender Lebenserwartung der Bevölkerung werden diese Zahlen weiter zunehmen. Schätzungen zufolge waren in den USA im Jahr 1980 2.9 Millionen Menschen erkrankt, nach Hochrechnungen wird die Prävalenz in den USA im Jahr 2050 10 Millionen übersteigen (Evans 1990).

Zur Zeit ist nur eine symptomatische Therapie möglich, da es an kausalen Ansätzen noch fehlt. Hierbei finden Acetylcholinesteraseinhibitoren (Wirkstoffe: Tacrin, Donepezil, Rivastigmin), Glutamatmodulatoren und sonstige Antidementiva Verwendung, wobei für Donepezil und den hirnselektiven Cholinesteraseinhibitor Rivastigmin eine signifikante Verbesserung kognitiver Fähigkeiten nachzuweisen ist (Anand und Gharabawi 1996; Rogers et al. 1998). Trotzdem ist eine vollständige Aufklärung ätiologischer Zusammenhänge vorrangig, um daraus ein kausales Therapieregime entwickeln zu können, zumal die klinische Diagnose der Erkrankung häufig erst viele Jahre nach Beginn des Krankheitsprozesses gestellt wird. Dies bedeutet, daß schon irreversible Hirnveränderungen eingetreten sind, die auf eine symptomatische Therapie kaum ansprechen.

Die vorgelegte Arbeit knüpft an Forschungsergebnisse der letzten Jahre an, und untersucht auf molekularer Ebene den möglicherweise protektiven Einfluß der weichen Hirnhäute im Verlauf der AD und der häufig damit assoziierten „Cerebralen Amyloid Angiopathie“ (CAA).

1. Pathomorphologie

Makroskopisches Erscheinungsbild

Auffälligstes Merkmal ist die diffuse Atrophie des gesamten Hirnparenchyms, wobei der Kortex aufgrund der neurofibrillären Degeneration und des Neuronenuntergangs stärker betroffen ist, als das übrige Parenchym. Mit Hilfe der Computer-Tomographie (CT) und der Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) werden qualitative und quantitative Aussagen bezüglich des makroskopischen in vivo Erscheinungsbildes getroffen, um dieses in Bezug zum klinischen Verlauf zu setzen (Scheltens et al. 1992a;

Fox et al. 1996, 1999) Hierbei ist der schwere Befall des Temporallappens hervorzuheben (Mann 1991; Jack et al. 1998); die Atrophie des medialen Temporallappens, der aufgrund limbischer und hippokampaler Strukturen in enger funktionaler Beziehung zu Gedächtnisfunktionen steht, korreliert positiv mit neuropsychologischen Gedächtnistests (Scheltens et al. 1992b). Die graue und weiße Substanz sind gleichmäßig vom Neuronenverlust betroffen, wobei die Atrophie der weißen Substanz bei AD Patienten stärker ausgeprägt ist, als bei gleichaltrigen Kontrollpersonen (de la Monte 1989; Scheltens et al. 1994). Als Folge der kortikalen Atrophie entwickelt sich ein Hydrocephalus e vacuo mit Erweiterung der Seitenventrikel, des dritten Ventrikels und des Subarachnoidalraums.

Auch wenn die Hirnatrophie im Rahmen der AD im Mittel ausgeprägter ist als beim gleichaltrig Gesunden, so läßt sich die Diagnose aus der in vivo Konstellation nicht mit ausreichender Sicherheit stellen. Beweisend ist ausschließlich der histopathologische Befund.

Mikroskopisches Erscheinungsbild

Da die AD bis heute nur histopathologisch sicher diagnostiziert werden kann, ist dem mikroskopischen Erscheinungsbild besondere Bedeutung beizumessen. Daher wird das Erscheinungsbild der senilen Plaques und Alzheimerschen Fibrillenveränderungen skizziert. Weiterhin wird auf die Bedeutung zerebrovaskulärer Veränderungen eingegangen, die als „Kongophile Angiopathie“ (Pantelakis 1954) oder Cerebrale Amyloid Angiopathie bezeichnet werden, weil diese in enger Beziehung zur AD stehen (Glenner et al. 1981).

Senile Plaques sind unlösliche, extrazelluläre, kugelförmige Proteinablagerungen, welche die Mikroarchitektur des Kortex zerstören (Abb. 1). Diese als „Amyloid“ bezeichneten Ablagerungen bestehen aus einem zentral gelegenen, „ β -Amyloid“ oder „A β “ genannten Eiweißmolekül, welches erstmals 1984 aus angiopathisch veränderten Hirngefäßen (Glenner und Wong 1984) und 1985 aus isolierten kortikalen senilen Plaques sequenziert wurde (Masters et al. 1985). Der Begriff des Amyloids geht auf Virchow zurück, da das histochemische Färbeverhalten von Amyloid dem von Stärke entspricht (amylon = griechisch für Stärke; amyloid = stärkeähnlich). Amyloide sind eine heterogene Gruppe von Proteinen, deren Färbeverhalten sich als grün-rote Doppelbrechung im polarisierten Licht nach Kongo-Rot-Färbung manifestiert (Abb. 2).

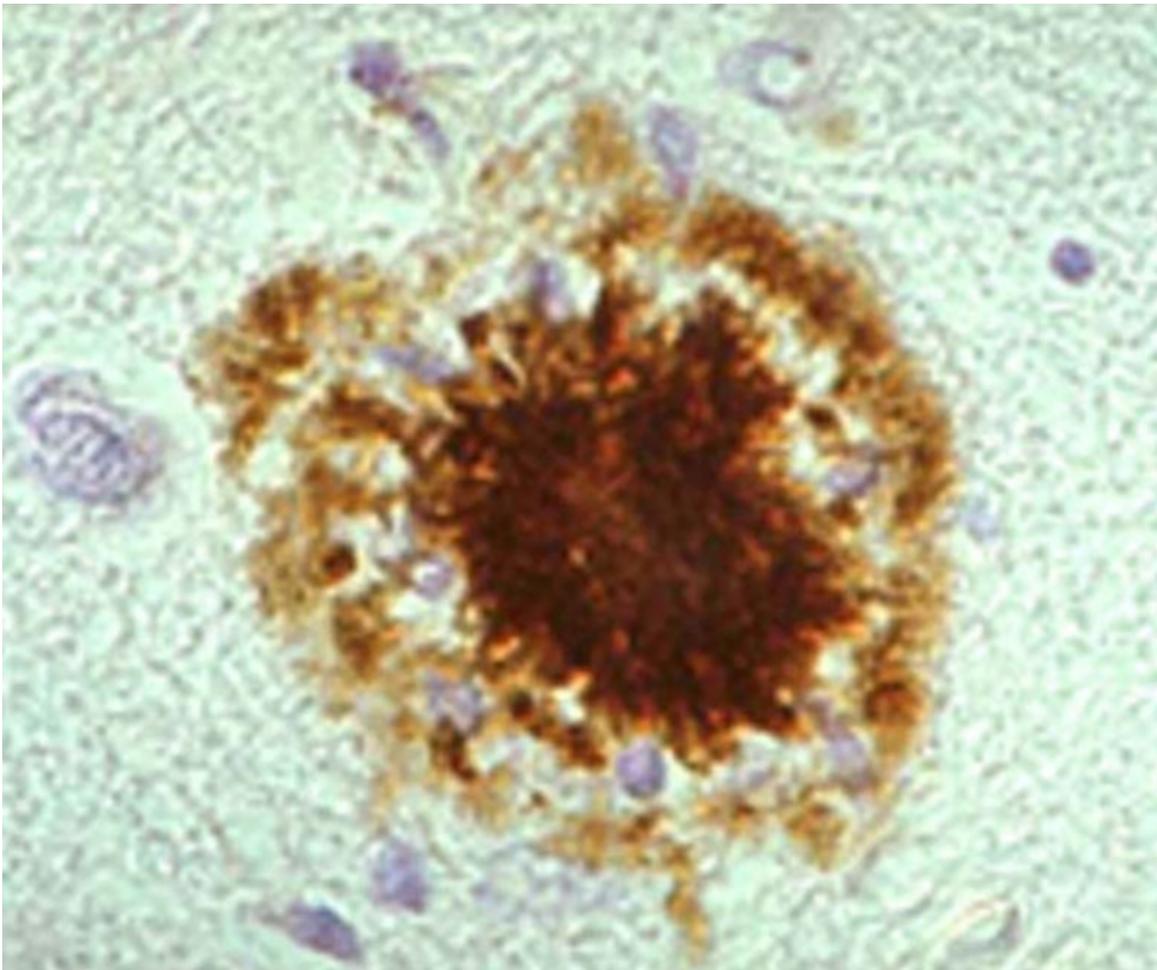


Abb. 1: Immunhistochemische Darstellung einer senilen Plaque mit einem polyklonalen Antiserum gegen A β

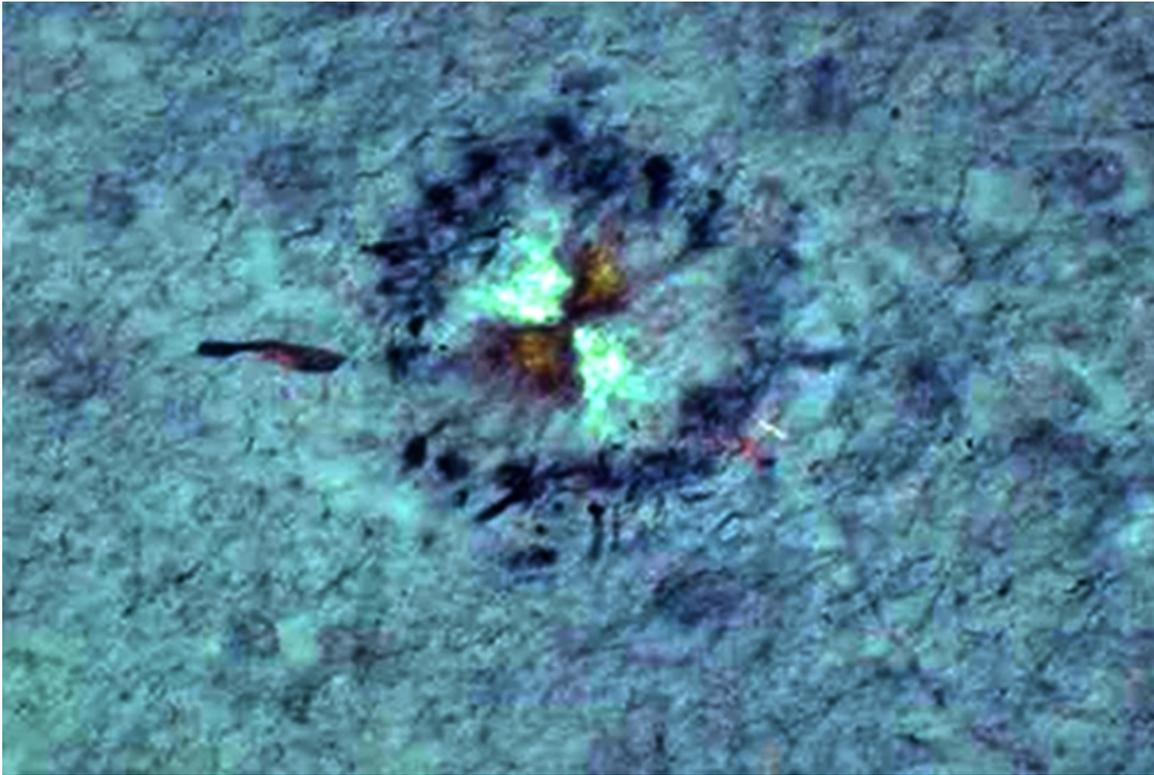


Abb. 2: Senile Plaque. β -Amyloid erscheint im polarisierten Licht nach Kongo-Rot-Färbung rot-grün (350fache Vergrößerung)

Die Alzheimerschen Fibrillenveränderungen (Abb. 3) sind - elektronenmikroskopisch betrachtet - abnorme Ansammlungen paariger helikaler Filamente (Wischik et al. 1988). Diese befinden sich im Gegensatz zu den senilen Plaques intrazellulär in Perikarien und Dendriten befallener Nervenzellen und sind als Aggregate in Form neurofibrillärer Bündel nachweisbar. Hauptkomponente der paarig helikalen Filamente ist das Mikrotubuli-assoziierte, abnorm phosphorylierte Protein Tau. In absterbenden Nervenzellen bilden sich Schollen aus diesen Fibrillen, deren Ablagerungen durch Silberimprägnation darstellbar sind. Die Ausbildung dieser Neurofibrillen wird als Epiphänomen der Neurodegeneration eingestuft, umso mehr als neurofibrilläre Ablagerungen bei verschiedenen anderen neurodegenerativen Erkrankungen ohne Amyloid-Ablagerungen nachweisbar sind (Goedert 1998).

Die CAA ist durch herdförmige A β Ablagerungen im Extrazellulärraum der Tunica media und Tunica adventitia mittelgroßer und kleiner Hirngefäße gekennzeichnet. Die Ablagerungen sind entsprechend kongophil und manifestieren sich als grün-rote Doppelbrechung im polarisierten Licht (Abb. 4).

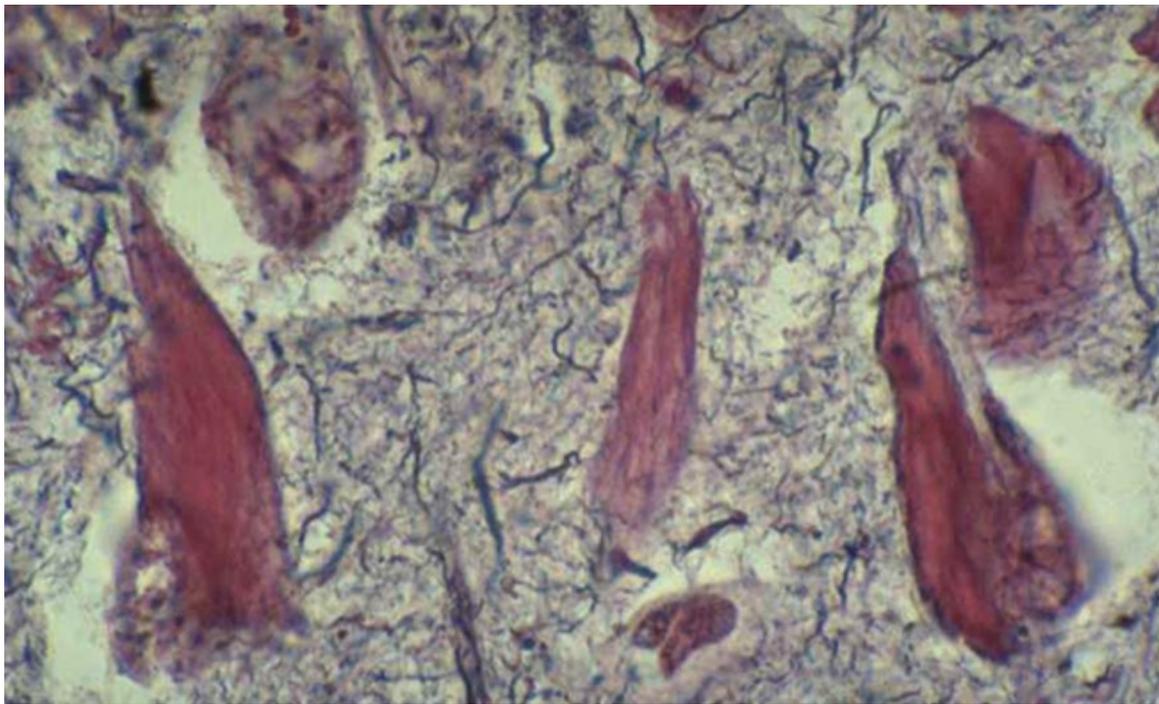


Abb. 3: Alzheimer-Fibrillenveränderungen, Bodian Silberfärbung (500fache Vergrößerung)

2. Stand der Forschung

Im folgenden Abschnitt wird ein Überblick über den aktuellen Forschungsstand gegeben. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf molekularbiologischen und molekulargenetischen Ansätzen, da diese die zentrale Rolle von A β Produktion und Ablagerung für die AD und CAA aufzeigen.

2.1 A β und APP

Im Zentrum der molekularbiologischen Untersuchungen steht heute der Hauptbestandteil der senilen Plaques, ein aus 39-43 Aminosäuren bestehendes Peptid, das A β (Glennner und Wong 1984; Masters et al. 1985; Sisodia und Price 1995; Maury 1995). A β ist hydrophob und neigt unter physiologischen Salzkonzentrationen zur Selbstaggregation und Fibrillenbildung (Harper und Landsbury 1997), wobei der Großteil des Peptids eine β -Faltblattstruktur ausbildet.

Es gilt heute trotz teilweise differierender Auffassungen (Roses 1994; Terry 1996) als gesichert, daß A β Ablagerungen das zentrale pathomorphologische Substrat der AD sind (Selkoe 1994), dies umso mehr, als die Anzahl seniler Plaques mit der Ausprägung der Erkrankung positiv korreliert, sobald sensitive volumetrische Messungen der Amyloidablagerungen und nicht alleine die Anzahl der Plaques zugrunde gelegt werden (Cummings et al. 1995). Von ebenso großer Bedeutung ist dessen 1987 identifiziertes Vorläuferprotein, das Amyloid Precursor Protein (APP) (Kang et al. 1987).

Die Biogenese und Lokalisation von APP, desweiteren die verschiedenen Mechanismen der Metabolisierung wurden von verschiedenen Gruppen untersucht (Weidemann et al. 1989; Haass et al. 1991; Haass und Selkoe 1993; Walter et al. 1997).

APP wird ubiquitär exprimiert, wobei seine Expression in Neuronen bei weitem am höchsten ist (Busciglio et al. 1993). Als Membranprotein wird es während der Metabolisierung gespalten. Im einzelnen konnten drei Sekretasen postuliert werden, die das Vorläuferprotein an verschiedener Stelle spalten (Tanzi et al. 1996). Die alpha-Sekretase spaltet APP extrazellulär innerhalb der A β Sequenz, und führt somit zur Sekretion eines Teiles von APP, verhindert jedoch gleichzeitig eine A β Ablagerung (Esch et al. 1990). Der Großteil des APP Spaltproduktes gelangt in intrazelluläre Kompartimente und wird auf endosomal-lysosomalem Weg von beta- und gamma-Sekretasen gespalten (Haass et al. 1992a; Kawai et al. 1992). Durch Angriff der beta-Sekretase wird APP erneut gespalten, wobei auch hier die A β Sequenz intakt bleibt. Erst die gamma-Sekretase ermöglicht die Freisetzung von A β (1-40) oder A β (1-42) und dessen Sekretion (Haass et al. 1992b; Tamaoka et al. 1992; Sisodia und Price 1995; Hardy 1997a). Der weitere Mechanismus der A β Aggregation zu unlöslichen Plaques ist hingegen noch ungeklärt.

Das auf Chromosom 21 lokalisierte Gen, welches für APP kodiert, stand ebenso im Zentrum der Forschung. Sowohl die Entdeckung von Mutationen in diesem Gen, als

auch die Analyse der Funktion und des Metabolismus von APP führten zu einem besseren Verständnis der Pathogenese sowohl der Familiären Alzheimer Demenz (FAD), als auch der sporadischen AD. Obwohl Mutationen im APP Gen für nur 2% aller Fälle der FAD verantwortlich sind (insgesamt beträgt der Anteil der FAD an der Gesamtheit der AD ca. 10%), ist die Aufklärung der Funktion von APP wegweisend (Tanzi et al. 1996). Eine Reihe pathogener Mutationen im APP Gen, die den Austausch von Aminosäuren in direkter Nähe zur A β Region zur Folge haben, sind identifiziert worden (Levy et al. 1990; Goate et al. 1991; Mullan und Crawford 1993; Hardy 1997a). So beispielsweise die Punktmutation an Kodon 693, wobei Glutaminsäure durch Glutamin substituiert wird. Diese Mutation ist Ursache von hereditären zerebralen Blutungen (HCHWA-D: hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, Dutch type). Die Erkrankung wird autosomal dominant vererbt und ist durch stark ausgeprägte A β Produktion und Ablagerungen in intrazerebralen Gefäßwänden und wiederkehrende spontane Blutungen gekennzeichnet, die schon im frühen bis mittleren Alter (41-55 Jahre) auftreten (Levy et al. 1990; Mann et al. 1996).

Eine weitere Mutation an Kodon 717 wodurch Valin entweder durch Isoleucin, Phenylalanin oder Glycin ersetzt wird, ist in einer kleinen Anzahl von Familien beschrieben worden (Chartier-Harlin et al. 1991). 1995 wurde durch Etablierung eines Modells transgener Mäuse, die diese humane Mutation überexprimieren, und daher die verschiedenen Merkmale der AD Pathologie aufweisen (Games et al. 1995), ein wichtiges Tiermodell geschaffen, anhand dessen der Verlauf der AD studiert werden kann. Da bei der FAD die Plasmakonzentration von A β (1-42) im Vergleich zur sporadischen AD signifikant erhöht ist (Kosaka et al. 1997), läßt sich folgern, daß eine vermehrte Produktion von A β (1-42) für die weitere Plaquebildung („seeding“) kritisch ist (Tamaoka et al. 1994). Ein ähnlicher Mechanismus wurde ebenso für alle anderen, hier nicht näher erläuterten Mutationen beschrieben (Haass et al. 1994, 1995; Selkoe 1994).

A β lagert sich pathologischerweise nicht nur im Hirnparenchym, sondern auch in den kortikalen und leptomeningealen Gefäßen ab. Somit ist es nicht nur für die senilen Plaques sondern auch für die CAA das zentrale pathologische Element (Wong et al. 1985; Vinters 1992; Vinters et al. 1996).

Ein pathogenetisch wichtiger Aspekt ist die Lokalisation des APP Gens auf dem langen Arm von Chromosom 21. Patienten mit Trisomie 21 (Down-Syndrom) besitzen aufgrund einer chromosomalen Aberration ein zusätzliches Chromosom 21, und somit

pro Zelle ein weiteres APP Gen. Die hieraus resultierende vermehrte APP Synthese manifestiert sich im Sinne eines Gen-Dosis-Effektes in erhöhten APP- und erhöhten A β Blutspiegeln (Rumble et al. 1989, Tokuda et al. 1997). Daher entwickeln alle vom Down-Syndrom Betroffenen das neuropathologische Vollbild der AD (Masters et al. 1985; Mann 1988), und zwar bereits ab dem 4. Lebensjahrzehnt (Wisniewski et al. 1985). Ein Großteil der Betroffenen entwickelt mit zunehmendem Alter demzufolge die Symptomatik der AD. Daraus leitet sich die Hypothese ab, daß eine vermehrte APP Produktion und die resultierende vermehrte A β Produktion, insbesondere das erhöhte Auftreten des löslichen A β (1-42), Ursache der AD bei Patienten mit Trisomie 21 ist (Teller et al. 1996; Takashima 1997).

2.2 A β und Preseniline

Der größte Teil der autosomal dominant vererbten Fälle der AD mit frühzeitigem Beginn (FAD) wird durch Mutationen in zwei erst 1995 entdeckten Genen verursacht. Presenilin 1 (PS1) konnte auf Chromosom 14 (St George-Hyslop et al. 1992; Sherrington et al. 1995), Presenilin 2 (PS2) auf Chromosom 1 (Levy-Lahad et al. 1995) lokalisiert werden, beide kodieren für homologe Transmembranproteine. Mutationen dieser Gene führen über einen noch unbekanntem Mechanismus zu einer Veränderung im APP Metabolismus dergestalt, daß eine erhöhte A β (1-42) Produktion in Zellkulturen mit konsekutiver Ablagerung des Proteins die Folge sind (Citron et al. 1997; Hardy 1997a; Tomita et al. 1997; Mehta et al. 1998). In vivo manifestiert sich dieser Zusammenhang zwischen A β und den Presenilinen bei Familienmitgliedern, die solche Mutationen tragen, als Erhöhung der A β Spiegel im Plasma vor Beginn der Erkrankung (Scheuner et al. 1996). Wie auch APP werden die zueinander homologen Gene PS1 und PS2 ubiquitär exprimiert (Sherrington et al. 1995; Levy-Lahad et al. 1995; Lee et al. 1996), wobei die Preseniline die Zellmembran achtfach umspannen (Doan et al. 1996; Hardy 1997a). Fünfzig verschiedene Mutationen, die jeweils zum Austausch nur einer Aminosäure führen, sind bekannt, die meisten davon in der genannten Transmembranregion (Cruts und Van 1998). Klinisch manifestieren sie sich als früh einsetzende und schwer verlaufende Erkrankung.

Der Effekt dieser Mutationen ist nicht nur in Zellkulturen, sondern auch im Tiermodell nachgewiesen. Transgene Mäuse, die eine mutierte Form von PS1 überexprimieren, als auch mit einer PS1-Mutante transfizierte Zellen zeigen eine verstärkte Produktion des

fibrillogenen und frühzeitig deponierten A β (1-42) (Duff et al. 1996; Borchelt et al. 1996). Obwohl die genaue Funktion von PS1 und PS2 noch zu bestimmen bleibt (Tanzi et al. 1996), ist festzustellen, daß sowohl Mutationen im APP Gen, als auch Mutationen in PS1 und PS2 alle in die gemeinsame Endstrecke gesteigerter A β (1-42) Produktion aufgrund eines veränderten APP Metabolismus münden (Hardy 1997b; Tomita et al. 1997; Weidemann et al. 1997; Citron et al. 1998).

Auch neuere Arbeiten unterstreichen diesen Zusammenhang, indem sie demonstrieren, daß PS1 als Regulator der gamma-Sekretase fungiert (De Strooper et al. 1998). Die gamma-Sekretase ist diejenige Protease, welche zu einer intrazellulären Abspaltung von A β aus APP führt. Mäuse, in denen die Funktion von PS1 unterbunden wird („knock out mice“), zeigen eine fünffache Reduktion der A β (1-42) Produktion im Vergleich zu Kontrollen (De Strooper et al. 1998). Dies impliziert, daß Mutationen in PS1 zu einem Anstieg der gamma-Sekretase („gain of function“) und somit zu verstärkter A β (1-42) Produktion führen (Haass und Selkoe 1998).

In der Zusammenfassung bedeuten diese Ergebnisse, daß die pharmakologische Inhibition von PS 1 eine Möglichkeit darstellt, präventive Therapieansätze zu entwickeln.

2.3 A β und Apolipoprotein E

Ein wichtiger genetischer Risikofaktor, der das relative Risiko erhöht, an der spät beginnenden (late-onset) Form der AD zu erkranken, ist die Präsenz des e4-Genotyps von Apolipoprotein E (ApoE) auf Chromosom 19 (Strittmatter et al. 1993a, b; Saunders et al. 1993; Corder et al. 1993; Roses 1994; Strittmatter und Roses 1995, 1996). ApoE ist Bestandteil der very low density lipoproteins (VLDL) und high density lipoproteins (HDL) genannten Transportproteine, welche die zelluläre Aufnahme von Cholesterin steuern (Mahley 1988; Kang et al. 1997). Es existieren drei Allelformen von ApoE: e2, e3 und e4; dabei ist ApoE e3 die häufigste Allelform (Saunders et al. 1993), gefolgt von ApoE e4. Die Differenzierung dieser Isoformen erlaubt eine Unterteilung bezüglich des Risikos und der Vorhersage der AD (Saunders et al. 1996).

Patienten mit spät beginnender, familiär gehäufte AD weisen einen höheren Anteil des e4-Genotyps auf als gleichaltrige gesunde Kontrollen (Strittmatter et al. 1993a). Weiterhin zeigt sich auch bei der Analyse sporadischer AD Fälle eine erhöhte ApoE e4 Allelfrequenz im Vergleich zu einer geringeren Ausprägung bei Kontrollen (Saunders et

al. 1993). Diese Ergebnisse sind hochsignifikant und weisen den e4-Genotyp als Risikofaktor für die AD aus. Dies umso mehr, als bei Homozygotie für ApoE e4 ein im Vergleich zu Heterozygoten fünffach erhöhtes Risiko besteht, an der FAD zu erkranken, und dies zu einem frühen Zeitpunkt und einhergehend mit ausgeprägtem progredienten kognitiven Abbau (Corder et al. 1993; Craft et al. 1998).

Auch der Einfluß des e2-Genotyps auf den Verlauf der FAD wurde untersucht. Demzufolge verhält sich diese Form entgegengesetzt zum e4-Genotyp, da Patienten dieser Ausprägung ein geringeres Risiko aufweisen, überhaupt zu erkranken, und mit einem späteren Zeitpunkt des Erkrankungsbeginns rechnen können (Corder et al. 1994); allerdings ist das e2-Allel ein Risikofaktor für die Manifestation einer Hirnblutung (Roses 1996). Beispielsweise beginnt die Erkrankung bei Homozygotie für das e4-Allel im Mittel vor dem siebzigsten Lebensjahr, bei Heterozygotie für das e2-Allel hingegen erst jenseits des neunzigsten Lebensjahres (Corder et al. 1994; Roses 1996). Zusätzlich ist Homozygotie für das e4-Allel neben einem frühen Krankheitsbeginn mit einem signifikanten Anstieg seniler Plaques korreliert (Rebeck et al. 1993, Schmechel et al. 1993).

Pathogenetisch fördern die verschiedenen Isoformen von ApoE, hier insbesondere der e4-Genotyp in zellfreien in vitro Experimenten die Ausbildung Alzheimerscher Fibrillen (Ma et al. 1994; Castano et al. 1995) und sind in senilen Plaques und vaskulären A β Ablagerungen nachweisbar (Wisniewski et al. 1993; Greenberg et al. 1995; Treves et al. 1996; Nicoll et al. 1997).

Weitere Untersuchungen demonstrieren einen direkten Zusammenhang zwischen ApoE und APP (Haass et al. 1997; Barger et al. 1997) und bestätigen eine ApoE Akkumulation in A β Ablagerungen auch in transgenen Mäusen (Igeta et al. 1997). Werden humanes APP überexprimierende transgene Mäuse, die eine zerebrale A β -Pathologie entwickeln, mit transgenen Mäusen gekreuzt, denen das ApoE-Gen ausgeschaltet wurde, werden hierdurch die zerebralen A β Ablagerungen stark reduziert (Bales et al. 1997), wobei auch hier die enge Verknüpfung zwischen A β , APP und Apolipoprotein E deutlich wird.

Die Liquordiagnostik von ApoE und A β verdeutlicht, daß Patienten mit AD signifikant niedrigere ApoE-Spiegel aufweisen (Pirttila et al. 1996; Skoog et al. 1997; Hahne et al. 1997), wobei noch offen bleibt, ob hier ein ursächlicher Zusammenhang besteht oder es sich nur um ein Epiphänomen eines fortgeschrittenen Krankheitsbildes handelt.

All diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von ApoE als Risikofaktor für die FAD und die enge Assoziation zu A β . Zusammenfassend betrachtet könnte ApoE in den kommenden Jahren ein wichtiger Bestandteil in der Früherkennung von Risikopatienten werden.

Molekulargenetische Untersuchungen der letzten Jahre haben somit vier verschiedene Gene identifizieren können, die in direktem Zusammenhang mit der AD stehen. Defekte der drei Gene, die auf Chromosom 1, 14 und 21 lokalisiert sind, führen zu einem frühen Beginn der Familiären Alzheimer Demenz (FAD), während der e4-Genotyp von ApoE (Chromosom 19) einen Risikofaktor darstellt (Tanzi et al. 1996).

Insgesamt zeigt sich bei allen bisher bekannten genetischen Ursachen der AD eine enge Assoziation zu A β , dessen zerebrovaskuläre und intrazerebrale Ablagerung als gemeinsame pathogenetische Endstrecke einer durch verschiedene Faktoren auslösbaren Erkrankung interpretiert werden kann.

2.4 Neurotoxizität von A β

A β verhält sich gegenüber in Kultur gehaltenen Nervenzellen toxisch und verursacht deren Absterben. Dabei aktivieren und sekretieren Gliazellen Zytokine, die wiederum die Expression und Sekretion von APP hochregulieren; dies führt zu erhöhten A β Spiegeln mit konsekutiver A β Ablagerung und Nervenzelltod (Maury 1995, Jen et al. 1998). Diese Hypothese erklärt die durch massiven Zelltod begünstigte progrediente Hirnleistungsstörung. Die molekularen Mechanismen sind jedoch unklar.

Weitere Untersuchungen zeigen die Fähigkeit von A β , endosomale und plasmatische Membranen zu desintegrieren (McLaurin und Chakrabarty 1996, 1997) und somit direkt toxisch auf Neuronen zu wirken. Andere Daten verweisen auf den Einfluß von Transglutaminase, einem Katalysator, der auf intermolekularer Ebene mit A β Oligomere-Komplexe bildet und somit neurotoxisch wirkt (Ikura et al. 1997). Glutaminase beeinflusst daher nicht nur die neuronale Degeneration, sondern auch die Formation seniler Plaques.

2.5 Cerebrale Amyloid Angiopathie

Die Cerebrale Amyloid Angiopathie tritt sowohl isoliert als häufigste Ursache einer zerebralen Marklagerblutung im Alter auf (Yamada et al. 1993; Itoh et al. 1993), als auch als neuropathologisches Charakteristikum der AD (Glennner et al. 1981; Joachim et al. 1988; Olichney et al. 1995). Sie wird dadurch verursacht, daß sich A β in unlöslicher, fibrillärer Form im Zusammenspiel mit weiteren, noch näher zu definierenden Faktoren in den Wänden kortikaler und leptomeningealer Arteriolen (Abb. 4) abgelagert (Wisniewski et al. 1992; Shinkai et al. 1995, 1997; Hamano et al. 1997). Diese Ablagerungen führen zu einer fibrinoiden Nekrose der Gefäßwand mit konsekutiver Ausbildung von Mikroaneurysmen, so daß es zur Ruptur und Blutung aus diesen Gefäßen kommen kann (Vonsattel et al. 1991). Die parenchymatösen und vaskulären A β Ablagerungen können parallel verlaufen (Uchida et al. 1993). Daher gelten die kleinen kortikalen und leptomeningealen Gefäße als gutes Modell für das biologische Verständnis von A β Aggregationen, und dienen dem Studium der Pathogenese der AD. Offen bleibt jedoch, warum die CAA auf kortikale und leptomeningeale Gefäße begrenzt ist. Eine Möglichkeit besteht darin, daß sich systemisch zirkulierendes A β erst nach Permeabilitätsstörungen der Blut-Hirn-Schranke sowohl zerebrovaskulär als auch parenchymal abgelagert (Zlokovic et al. 1993). Weiterhin ist denkbar, daß dem von glatten Muskelzellen der Gefäßwand in situ produzierten A β (Tagliavini et al. 1990; Wisniewski et al. 1994, 1995; Wegiel et al. 1995; Frackowiak et al. 1995) in Verbindung mit in Liquor cerebrospinalis enthaltenen Faktoren eine zentrale Bedeutung zukäme. In dieselbe Richtung zielen Beobachtungen, die Mikroglia und perivaskuläre Zellen als Entstehungsort der A β Fibrillen postulieren (Wisniewski et al. 1992). Das von glatten Muskelzellen sezernierte lösliche A β (Frackowiak et al. 1995) soll in der Umgebung der Basalmembran zu fibrillärem A β umgewandelt werden (Wisniewski und Wegiel 1994; Wisniewski et al. 1995). Andererseits kommt A β auch in relativ hoher Konzentration im Liquor cerebrospinalis und Extrazellulärraum gelöst vor (Vigopelfrey et al. 1993; Pirttila et al. 1996), und könnte an Oberflächenmoleküle der glatten Muskelzellen binden.

Zusammenfassend handelt es sich bei der CAA um einen altersassoziierten Prozeß, der erstens häufig mit der AD einhergeht, zweitens den senilen Plaques der AD

vergleichbare histochemische Eigenschaften aufweist und drittens durch Ablagerung von A β die Tunica media und adventitia kleiner kortikaler und pialer GefäÙe zerstört.

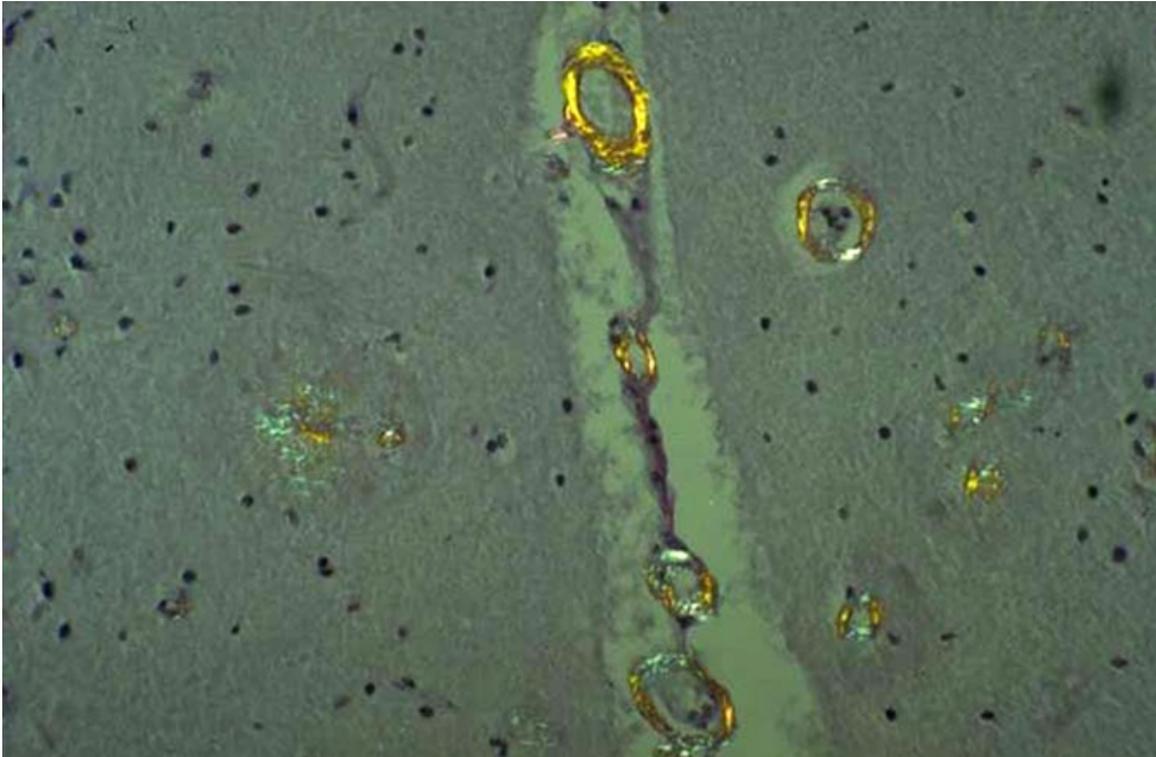


Abb. 4: Leptomeningeale GefäÙe mit grün-rot-doppelbrechenden A β Ablagerungen. Polarisiertes Licht nach Kongo-Rot-Färbung (30fache Vergrößerung)

3. Zielsetzung der eigenen Untersuchungen

Der Cerebralen Amyloid Angiopathie kommt nach den Forschungsergebnissen der letzten Jahre eine bedeutende Rolle als Modell für das biologische Verständnis der AD zu (Maury 1995; Hamano et al. 1997). Eine Klärung pathogenetischer Zusammenhänge mit Hilfe geeigneter Tiermodelle oder Zellkulturen ist daher notwendig.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung leptomeningealer Organkulturen als experimentelles Modell für die CAA. Es sollte untersucht werden, ob derartige Kulturen lebensfähig sind und Moleküle synthetisieren, die mit der Pathogenese der AD in Zusammenhang stehen. Weiterhin sollte durch Inkubation dieser Kulturen mit in Medium oder Liquor cerebrospinalis gelösten A β Peptiden überprüft werden, ob

leptomeningeale Gefäße und leptomeningeales Gewebe in toto Aβ in vitro aufnehmen. Dabei ist es außerordentlich wichtig, daß das gewählte Tiermodell der menschlichen Pathologie nahe kommt. So entwickeln Hunde im Alter zerebrovaskuläre Pathologien im Sinne einer CAA (Giaccone et al. 1990; Ishihara et al. 1991; Shimada et al. 1992; Uchida et al. 1993), weiterhin sind die Leptomeningen des Hundes speziell im Hinblick auf die hohe Anzahl kleiner Arteriolen, die als typischer Ausbildungsort der CAA gelten, den menschlichen Hirnhäuten sehr ähnlich. Entscheidend ist jedoch, daß die Aminosäuresequenz von Aβ bei Mensch und Hund identisch ist (Johnstone et al. 1990),so daß das Hundemodell als erste Wahl gilt (Cummings et al. 1993, 1996). Dieser Versuchsaufbau simuliert die Topographie des Subarachnoidalraums, in dem leptomeningeales Gewebe und darin enthaltene Gefäße von Aβ enthaltendem Liquor cerebrospinalis umspült werden und bietet somit eine Möglichkeit, die zur zerebrovaskulären Aβ Ablagerung beitragenden Faktoren zu analysieren und hieraus Hypothesen zur Entstehung der CAA und zur Rolle leptomeningealer Gefäße für die Pathogenese der AD zu formulieren.

B Material und Methoden

4. Material

4.1 Organkulturen

Die Versuchshirne konnten sowohl von der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf als auch von der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie der Bayer AG (Forschungszentrum Wuppertal) bezogen werden. Die Versuchstiere (Rasse: Beagle) wurden in beiden Instituten für kardiovaskuläre Experimente benötigt, so daß eigene Versuchstiere nicht erforderlich waren. Insgesamt wurden die Gehirne von 80 Hunden im Alter zwischen 12 und 15 Monaten präpariert.

4.2 Arbeitsmaterialien

4.2.1 Geräte und Gefäße

Brutschrank	Typ BB 6220, Heraeus, Hanau
Spectrophotometer	Typ EAR 400 AT, SLT Salzburg, Österreich
Zentrifuge	µ-Centrifuge, Biometra, Göttingen
Knochensäge	Oszillant, Aesculap, Tuttlingen
Mikrotiterplatten	Nunc-Immunoplate, MaxiSorp™, Intermed, Wiesbaden-Biebrich
Gewebekulturplatten	Multiwell™ TM, Falcon, Heidelberg
Petrischalen	Qualität TC 85mm, Greiner, Frickenhausen
Sterilfilter	Minisart N, Porengröße 0,2 µm, Sartorius, Göttingen

4.2.2 Medien und Reagenzien

Dulbecco`s modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Eggenstein
DMEM mit 5ml/l Ciprofloxacin	

DMEM mit 20 % Fetales Kälber Serum (FCS)
4 ug/mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin
100 ug/ml Streptomycin

Minimal Essential Medium (MEM),
ohne L-Methionin

Gibco

Smooth Muscle Cell Basal Medium (SmBM)
mit Epidermal Growth Factor (0,5ng/ml)
Human Fibroblast Growth Faktor-B (2ng/ml)
Insuline, Bovine (5µg/ml)

Clonetics, Taufkirchen

Transportmedium: Amphotericin B (2,5µg/ml)
Oxacillin (100mg/l)
Tobramycin (4mg/ml)
Ciprofloxacin (5ml/l)
Ceftazidim (2ml/l)
ad 1l Periplasmal

(³⁵S) Methionin

Hartmann,
Braunschweig

Biotiniliertes Aβ-Peptid (1-40),
Biotiniliertes Aβ-Peptid (1-42)

Prof. Frank
Zentrum Molekulare
Biologie, Universität
Heidelberg (ZMBH),
Heidelberg

(Verdünnung jeweils 1:100)

Monoklonaler Antikörper, gegen
glattes Muskelzell-Aktin, Klon 1A4
Monoklonaler Mausantikörper,

Dako,
Hamburg
Boehringer

gegen APP, Klon 22C11 (Verdünnung jeweils 1:100)	Mannheim, Mannheim
Polyklonales Kaninchen-Antiserum, gegen synthetisches A β -Peptid (1-43)	Prof. Beyreuther, ZMBH, Heidelberg
Polyklonales Kaninchen-Antiserum, gegen gesamt-APP	Prof. Beyreuther, ZMBH, Heidelberg
Monoklonaler Antikörper, Klon 4G8 (Verdünnung 1:100)	Senetek, USA
Streptavidin-Alkalische Phosphatase	Amersham, Freiburg
Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex	Vector, Grünberg
3,3 diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz (PnPP)	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Diethanolamin (DEA)	Riedel de Haen, Seelze
Fluoreszein Diacetat (FDA)	Sigma-Aldrich
Kaliumzyanid (KCN)	Merck
Protein A Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Haematoxylin-Eosin	Merck
Masson Trichrom	Merck
Thioflavin S	Merck
Hydrogenperoxid (H ₂ O ₂)	Merck
Tween 20	Serva, Heidelberg
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich

Neuroblastomzellen (SY5Y)

Dr. Weidemann,
ZMBH, Heidelberg

4.2.3 Puffer und Lösungen

PBS-Puffer: 8g NaCl
0,2g KCl
1,15g Na₂HPO₄
0,2g KH₂PO₄
ad 1l aqua bidest (pH 7,55)

STEN-Puffer: 50mM Tris-HCL
150mM NaCl
2mM EDTA

Laemmli-Puffer: 1,875M Tris HCL, pH 8,8
H₂O
Acrylamid
10% SDS
10% Ammoniumpersulfat

PBS mit 0,1% Tween 20 (pH 7,55)

PBSA 3%: PBS mit 3% Bovinem Serum Albumin

Farbreaktion (ELISA): 10mg PnPP ad
10ml DEA (10mM) mit MgCl₂ (0,5mM)

1M KCN: 1,6g KCN ad 25ml aqua bidest

FDA: 2µl ad 200µl DMEM

8% SDS-PAGE: 30% Acrylamidmix
10% SDS
10% Ammoniumpersulfat
1,5M Tris (pH 8,8)

TEMED (tetramethylethylendiamin)

H₂O

5. Methoden

5.1 Gewinnung der Gehirne

Die Entnahme des Gehirns beginnt fünf Minuten post mortem. Zunächst wird das Sägeblatt der Knochensäge in Ethanol eingelegt und der Kopf des Hundes mit Ethanol gespült. Daraufhin wird die Kopfhaut mit einem Skalpell in der Mittellinie gespalten, die Schwarten zur Seite geklappt und mit Klemmen befestigt. Mit einem Skalpell werden die beidseits gelegenen Muskelpakete so weit entfernt, daß die Kalotte zum Vorschein kommt. Nun wird der Kopf ein weiteres Mal mit Ethanol gespült. Nach Handschuhwechsel wird der Kopf in ein steriles Abdecktuch gewickelt in welches mit der sterilen Schere eine Öffnung hineingeschnitten wird, so daß die Kalotte mit der Knochensäge bearbeitet werden kann. Der Knochen wird horizontal durchtrennt und kann in der Folge samt großen Anteilen der Dura mater abgehoben werden, so daß das Gehirn zum Vorschein kommt. Währenddessen wird wiederholt mit PBS gespült.

Die verbliebene Dura mater wird vorsichtig abpräpariert um eine Verletzung der Leptomeningen zu vermeiden. Nun wird das Gehirn angehoben, um es am Hirnstamm und am Chiasma opticum mittels eines Skalpells abzutrennen. Nach einem weiteren Spülgang mit PBS wird das Gehirn in die Transportlösung verbracht, und in einer mit Trockeneis gefüllten Styroporbox in das Labor transportiert. Vom Zeitpunkt der Entnahme bis zum Beginn der Präparation der Leptomeningen vergehen im Mittel dreißig Minuten.

5.2 Präparation der Leptomeningen

Unter der sterilen Werkbank wird das Gehirn aus dem Transportmedium in eine sterile Petrischale überführt und sagittal durchtrennt. Eine Hemisphäre verbleibt in der Schale während die zweite zurück in das Transportmedium auf Eis gelangt, um die Leptomeningen vor Austrocknung zu bewahren. Nun wird die Hirnhaut mit der Pinzette an einer sulkusnahen Stelle angehoben und mit einer zweiten Pinzette abpräpariert. Ziel ist es, die weichen Hirnhäute möglichst atraumatisch und zusammenhängend vom Parenchym abzutrennen. Während der Präparation wird das Gehirn kontinuierlich mit

DMEM gespült; desgleichen werden die Pinzetten zwischendurch in Ethanol gespült. Die abpräparierten Leptomeningen werden in einer Petrischale mit DMEM gewaschen und in ein weiteres steriles Medium (DMEM mit 5ml/l Ciprofloxacin) überführt.

5.3 Zellkultur

Die Petrischale, in der die weichen Hirnhäute schwimmen, wird über Nacht im Brutschrank bei 37°C (wasserdampfgesättigte Atmosphäre, 95% Luft, 5% CO₂) inkubiert. Am folgenden Tag werden die Leptomeningen in frisches Medium überführt (DMEM mit 100µg/ml Streptomycin, 100U/l Penicillin). Die Kulturen bleiben über 4-8 Wochen mit erhaltener Viabilität in diesen Gewebekulturplatten.

5.4 Immunhistologie

Für immunhistologische Untersuchungen werden unmittelbar nach der Präparation der Leptomeningen Gewebeproben entnommen. Dies wird jeweils im Abstand von einer Woche wiederholt. Das Gewebe wird in 4% gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Paraffinschnitte (8µm) werden mit Haematoxylin-Eosin, Massontrichrom und Thioflavin S gefärbt. Für immunhistochemische Untersuchungen erfolgt die Inaktivierung der endogenen Peroxidase am entparaffinierten Schnitt (Xylol, absteigende Konzentrationsreihe) in Methanol mit 1% Hydrogenperoxid. Im folgenden Schritt wird mit PBS gewaschen und über Nacht mit monoklonalen Antikörpern gegen glattes Muskelzell-Aktin und gegen APP, weiterhin mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen synthetisches Aβ(2-43) inkubiert.

Nach einem folgenden Waschschrift werden die Schnitte mit biotinierten Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-Antikörpern 1h inkubiert. Nach dem anschließenden Waschgang erfolgt die Bindung mit Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex in 45min. Die Schnitte werden in 0.05%iger DAB-Lösung entwickelt und mit Haematoxylin gegengefärbt. Als Negativkontrolle dient die Auslassung des monoklonalen Primärantikörpers oder dessen Ersatz durch normales Kaninchenserum im Falle der polyklonalen Primärantikörper.

5.5 Biosynthetische Markierung und Immunpräzipitation von APP

Eine Woche in Kultur gehaltene Gewebeproben (ca. 1 cm² große Membranen) werden 3h in methioninfreiem MEM, unter Zusatz von radioaktivem Methionin (150 µCi (³⁵S)) inkubiert. Nach Entfernung des Mediums wird das Gewebestück zweifach in PBS gewaschen und in 200µl STEN Puffer, mit 2mM PMSF, 2% Nonidet P-40 und 2% Triton X-100 versetzt, homogenisiert. Nach 10min auf Eis werden die Gewebestücke bei 10000g 5min zentrifugiert, der Überstand für weitere Analysen bei -20°C gelagert. Für die Immunpräzipitation erfolgt eine Verdünnung der Probe im Verhältnis von 1:5 in STEN Puffer; daraufhin wird mit 7µl eines polyklonalen Kaninchen-Antiserums gegen Gesamt APP 2h bei Raumtemperatur unter konstantem Schütteln inkubiert. Als nächstes werden 10µl (1,5mg) Protein A-Sepharose für 1h hinzugefügt. Die unlöslichen Komplexe werden dreifach gewaschen und in 50µl 2x Laemmli Puffer gegeben, dann für jeweils 5min erhitzt und bei 10000g zentrifugiert. 20µg Gesamtprotein jeder Probe werden auf einem 8% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Als Positivkontrolle fungieren Neuroblastomzellen (SY5Y, 3x10⁵ Zellen), die endogen APP mit definierten Isoformen exprimieren (Ross et al. 1983, Weidemann et al. 1989). Diese werden parallel nach dem oben beschriebenen Protokoll prozessiert. Nach der Elektrophorese erfolgt die Fixierung und Trocknung des Polyacrylamidgels und am folgenden Tag wird das Gel mit einem Fuji Bas1000 Phosphoimaging-System analysiert.

5.6 Inkubation der Organkulturen mit Aβ

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe für Biopolymere des Zentrums für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (Prof. Frank) wurden folgende Peptide hergestellt: Aβ(1-40) und Aβ(1-42) (Aminosäuresequenz von Aβ(1-42) nach dem internationalen Ein-Buchstabencode: DAEFR HDSGY EVHHQ KLVFF AQDVG SNKGA IIGLM VGGVV-IA). Die Peptide wurden nach Standardprotokollen auf einem Applied Biosystems Peptid-Synthesizer hergestellt und noch während der Synthese mit aktiviertem Fluoreszein (5-und-6)-carboxyfluoresceinsuccinimidylester) oder durch PyBOP(Benzotriazolyl-oxo-tris(pyrr-olidino)-phosphoniumhexafluorophosphate)-aktiviertem Biotin gekoppelt. In dieser Weise wurde nur das N-terminale Aspartat mit

einem Markermolekül gekoppelt, so daß die Konformation der Peptide und insbesondere der für die Aggregation kritische C-terminale Teil der A β Peptide möglichst wenig beeinflusst wurde. Die Peptide wurden anschließend mittels Hochdruck-Chromatographie (HPLC) aufgereinigt und durch Darstellung eines dem Molekulargewicht nach Konjugierung entsprechenden Peaks in der Massenspektroskopie charakterisiert. Alle Peptide wurden nach ihrer Synthese zunächst lyophilisiert und bei -70° C gelagert. Vor ihrem Einsatz wurden alle Peptide eingewogen und aliquotiert in einer 100 mM Stammlösung in Wasser nochmals eingefroren. Die endgültigen Gebrauchslösungen wurden aus dieser Stammlösung hergestellt.

Zuerst wird eine geringe Menge des B-A β Aliquots von -20°C auf Zimmertemperatur erwärmt und zentrifugiert. Daraufhin wird B-A β unter sterilen Bedingungen in einer Konzentration von 1 μ M mit SmBM gemischt. Pro Vertiefung („well“) werden 600 μ l der Lösung angesetzt. In den Kontrollwells befinden sich jeweils 600 μ l von SmBM mit und ohne B-A β zur Quantifizierung des Hintergrundsignals.

Das gleiche Verfahren und Mischungsverhältnis gilt für den Zusatz von B-A β zu Liquor cerebrospinalis. Dieser wird von -20°C auf Zimmertemperatur erwärmt und durch ein steriles Filter gepreßt. Es werden sowohl B-A β (1-40) als auch B-A β (1-42) jeweils mit SmBM als auch mit Liquor cerebrospinalis gemischt. Die Lösungen werden zentrifugiert und dann weiterhin unter sterilen Bedingungen in die wells der Versuchsplatten pipettiert.

Organkulturen von Leptomeningen werden mit biotiniliertem A β versetzt, das gelöst in SmBM vorliegt. In festgelegten zeitlichen Intervallen werden Proben entnommen und tiefgefroren. Im anschließenden direkten ELISA Test (enzyme-linked immunosorbent assay) wird die Konzentration des jeweils noch im Kulturmedium enthaltenen A β bestimmt, um eine mögliche Konzentrationsänderung über die Zeit dokumentieren zu können. Als Kontrollen dienen zum einen inaktivierte Leptomeningen, zum anderen mit A β versetztes Kulturmedium ohne Leptomeningen zur Quantifizierung des Hintergrundsignals. Die Versuche werden insofern variiert als nicht nur das pathogenere und unlöslichere A β (1-42) dem gut löslichen A β (1-40) gegenübergestellt wird, sondern auch Kulturmedium mit Liquor cerebrospinalis verglichen wird. Der Liquor wurde für die Experimente aus Liquorproben, welche einen Normalbefund gezeigt hatten, gepoolt. Desweiteren wird nicht nur die weiche Hirnhaut in toto betrachtet, sondern auch aus ihr präparierte Gefäße. Dies dient der Spezifizierung möglicher Konzentrationsänderungen.

5.6.1 Analyse des Versuchsgewebes

Vor Versuchsbeginn wird durch eine Viabilitätstestung ermittelt, ob die weichen Hirnhäute aktiv am Stoffaustausch teilnehmen oder beispielsweise durch unsteriles Arbeiten infiziert worden sind. Dazu wird unter sterilen Bedingungen ein ca. 0.5x 0.5cm großes Stück abgetrennt und in 200µl DMEM versetzt mit 2µl Fluoreszein Diacetat (FDA) zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin wird das Gewebestück kurz in PBS gewaschen und auf einem Objektträger ausgebreitet. Nach Zugabe eines Tropfens PBS und Abdecken durch ein Deckglas folgt die Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop (Abb. 5). Emittiert der Großteil des Gewebes kräftig grünes Licht, so wird die Hirnhaut als aktiv eingestuft. Im nächsten Schritt werden möglichst gleich große Stücke aus den Leptomeningen herauspräpariert. Ein Teil dient als Negativkontrolle und wird inaktiviert. Dazu wird eine 1M Lösung von Kaliumcyanid (KCN) hergestellt, in der sich die Gewebestücke 4.5h befinden. Der Großteil der Leptomeningen wird in frisches Medium überführt.

In Variation des Versuchsaufbaus sind nur die Gefäße der weichen Hirnhaut Gegenstand der Betrachtung. Zu diesem Zweck werden leptomeningeale Gefäße unter sterilen Bedingungen präpariert und in gleich große Stücke unterteilt (ca. 0.5 cm²). Ein Teil dieser Gefäße wird wie oben beschrieben mit KCN inaktiviert, der überwiegende Anteil gelangt in frisches Medium.

Nach Ablauf von 4.5h werden jeweils ein Gefäß- und ein Gewebestück aus der aktiven und der inaktivierten Gruppe dem oben beschriebenen Viabilitätstest unterzogen. Als inaktiviert gilt ein Gewebe dann, wenn nur von einem Bruchteil kräftig grünes Licht emittiert wird.

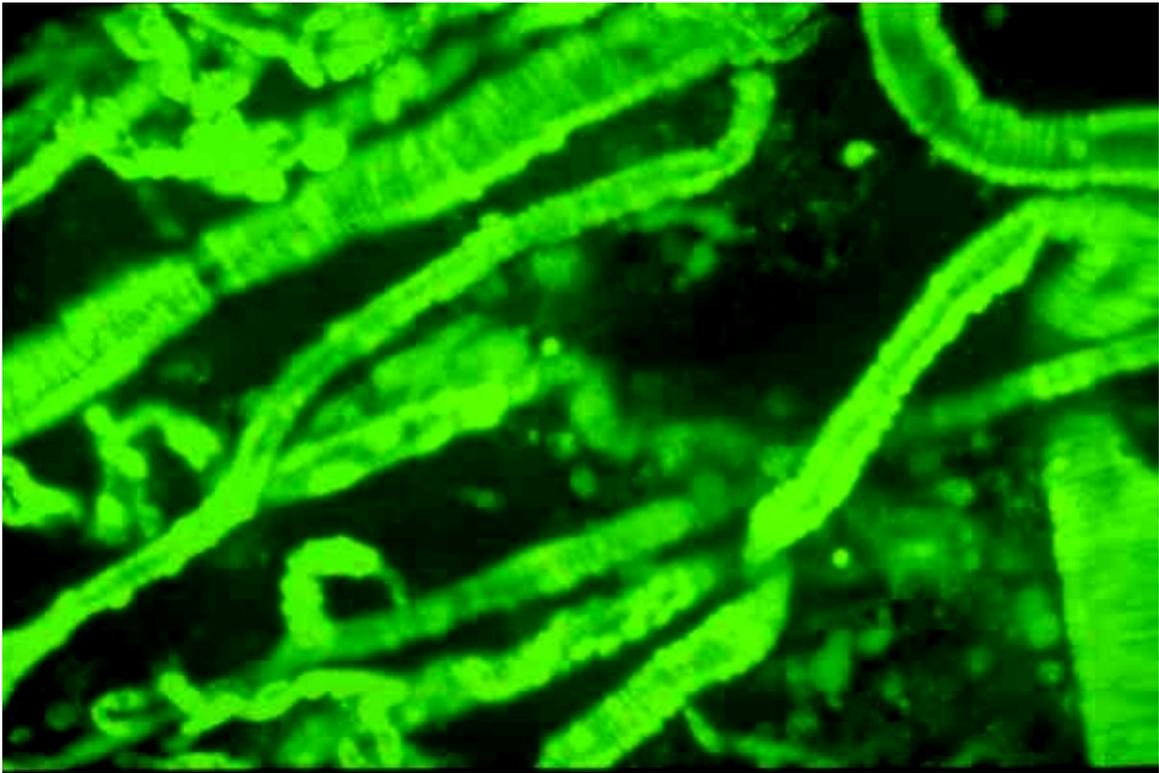


Abb. 5: Viabilitätstestung leptomenigealer Gefäße mit Fluoreszein Diacetat (FDA), 20fache Vergrößerung

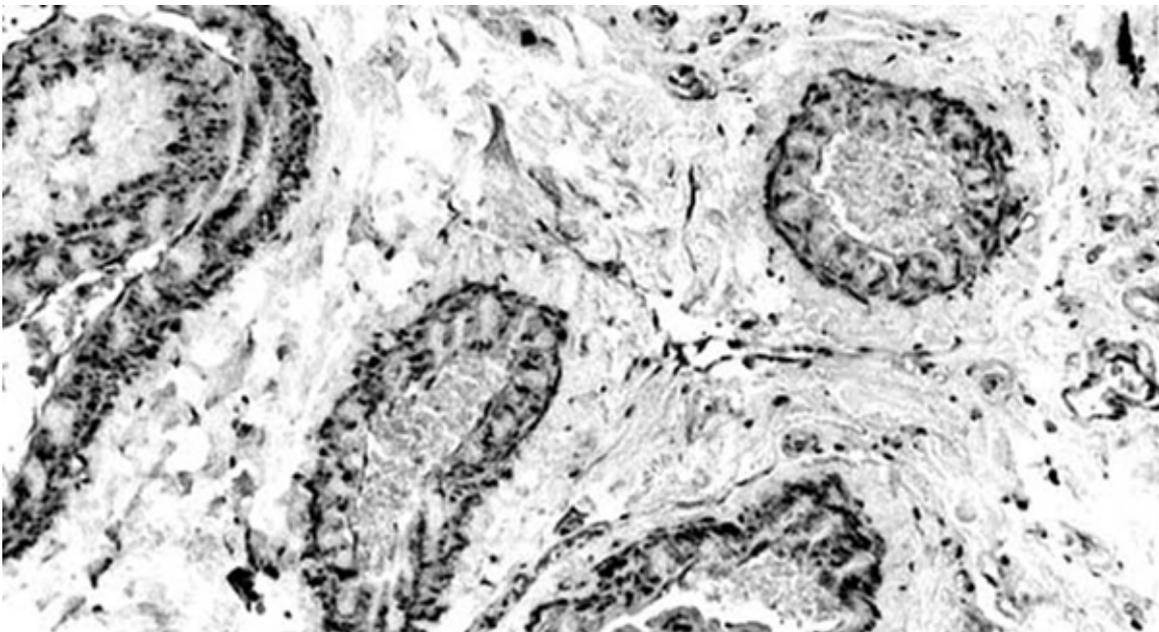


Abb. 6: Paraffinschnitt leptomenigealer Organkulturen nach 4 Wochen in Kultur. Immunfixierung für muskelspezifisches Aktin, 60fache Vergrößerung

5.6.2 Ablauf der Experimente

Sobald aufgrund der Viabilitätstestung eine eindeutige Unterscheidung zwischen aktiven und inaktivierten Leptomeningen bzw. Gefäßen getroffen ist, werden die Gewebestücke mittels Pinzette in die mit Medium oder Liquor cerebrospinalis gefüllten wells überführt. Vor Versuchsbeginn liegt somit folgende Situation vor:

Mehrere gleichgroße Gewebestücke von Leptomeningen und Gefäßen befinden sich in jeweils 600µl einer 1µM Amyloidlösung, wobei das Peptid sowohl in SmBM, als auch in Liquor cerebrospinalis gelöst vorliegt. Als Negativkontrolle fungieren inaktivierte Hirnhäute und Gefäße, die sich ebenfalls in 600µl der 1µM Amyloidlösung befinden. Weitere Kontrollen bestehen aus SmBM und Liquor cerebrospinalis jeweils ohne B-Aß, und SmBM und Liquor cerebrospinalis jeweils mit B-Aß. In diesen wells befindet sich kein Gewebe, denn diese Kontrollen dienen der Quantifizierung des Hintergrundsignals. Durch dessen Auswertung kann die Frage beantwortet werden, ob SmBM bzw. Liquor cerebrospinalis mit und ohne Zusatz von B-Aß per se eine relevante Veränderung über die Zeit zeigen.

Zur Dokumentation einer möglichen Konzentrationsänderung werden zu den Zeitpunkten 0h, 6h, 24h, 48h, 72h Proben entnommen, die bis zur Quantifizierung mittels direktem ELISA bei -20°C tiefgefroren werden.

Um zu Versuchsbeginn Referenzwerte zu gewinnen, werden sowohl aus den wells ohne B-Aß Zusatz (SmBM und Liquor cerebrospinalis) als auch aus den wells mit B-Aß Zusatz (SmBM und Liquor cerebrospinalis) jeweils 100µl aspiriert und bei -20°C tiefgefroren. Ebenso werden die Gewebe enthaltenden wells behandelt, jedoch genügt die Asservierung von fünf Referenzwerten. Im Anschluß werden Gewebekulturplatten im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nach 6h werden aus jedem well wiederum 100µl aspiriert, in ein tube gefüllt und tiefgefroren. Dasselbe Vorgehen wiederholt sich zum Zeitpunkt 24h und 48h .

Bei Beendigung der Versuche nach 72h werden nochmals 100µl pro well asserviert und tiefgefroren. Zuvor werden jedoch alle Leptomeningen und Gefäße einer letzten

Viabilitätskontrolle unterzogen, um eine Aussage zum Status aktiv/inaktiv treffen zu können. Zum Schluß werden alle Gewebestücke tiefgefroren.

5.7 Quantifizierung von A β mittels „Sandwich“- ELISA

Der "enzyme-linked immunosorbent assay" ist hinsichtlich seiner Zuverlässigkeit, Schnelligkeit und Sensitivität ein weit verbreitetes Testverfahren für die Quantifizierung von Antigenen und Antikörpern. Der hier angewandte Test gehört zu den nicht kompetitiven Verfahren, bei dem zwei Antikörper das Antigen umschließen („sandwich“-Prinzip). Der zweite Antikörper ist mit einem Indikatorenzym versehen, welches eine Farbreaktion katalysiert. Diese Farbreaktion kann im Spectrophotometer gelesen und numerisch umgesetzt werden. Die Konzentration des Antigens kann anhand der parallel bestimmten Standardkurve abgelesen werden.

Folgender Aufbau wurde gewählt:

- Der primäre Antikörper (4G8, monovalent) wird im Verhältnis von 1:1500 mit PBS verdünnt, zentrifugiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Pro well werden 50 μ l angesetzt. Tags darauf wird die Mikrotiterplatte zweifach mit PBS/0,1% Tween 20 gewaschen, nachdem bereits die 50 μ l pro well aspiriert wurden. Danach wird die Mikrotiterplatte ausgeklopft.
- Nun werden pro well 200 μ l von PBSA 3% hinzugefügt, und die Mikrotiterplatte wird 3h bei 37°C inkubiert. Hierdurch wird die unspezifische Bindung von Proteinen an den primären Antikörper verhindert. Danach werden 200 μ l pro well aspiriert und die Mikrotiterplatte wie oben beschrieben gewaschen und ausgeklopft.
- Im nächsten Schritt werden die aufgetauten B-A β Lösungen (SmBM, Liquor cerebrospinalis, B-A β (1-40), B-A β (1-42)) zugegeben. Die zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen Proben werden in einer zeitlichen Reihenfolge angeordnet (0h-72h). Weitere 3h Inkubation bei 37°C folgen. Dann wird aspiriert, gewaschen und ausgeklopft.

- Im Anschluß wird der als sekundärer Antikörper eingesetzte Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Komplex im Verhältnis von 1:1500 mit PBS verdünnt und zentrifugiert. In jedes well werden 50µl pipettiert. Das Streptavidin verbindet sich mit dem biotinilierten Anteil des Aβ Peptids, während die Alkalische Phosphatase die folgende Farbreaktion katalysiert. Nach 2h Inkubation bei Raumtemperatur wird aspiriert, gewaschen und ausgeklopft.
- Im letzten Schritt werden jedem well 100µl des Farbindikators hinzugefügt und die Mikrotiterplatte wird 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß wird im Spectrophotometer die Absorption bei 405nm gelesen.

Die beschriebenen Schritte sind analog auch für die Standardkurve durchzuführen. Die Konzentration reicht von 10µM bis 10nM bzw. 0M B-Aβ. Die Antigenkonzentration der Proben kann nun anhand der Standardkurve bestimmt werden.

C. Ergebnisse

6. Gefäßviabilität

6.1 Viabilität und histologische Veränderung der Organkulturen

Über einen Zeitraum von vier Wochen konnte die Viabilität der leptomeningealen Gefäßen mittels Fluoreszein-Diacetat durch Emission eines kräftigen positiven Signals nachgewiesen werden. Der Großteil der Gefäße zeigte sich über den gesamten Querschnitt am Austausch beteiligt, wenn auch vereinzelte Abschnitte kein Signal emittierten und somit nekrotische Zonen erkennbar waren. Ab der fünften Woche zeigte sich eine progressive Abnahme der Lichtemission als Ausdruck voranschreitenden Zelltodes. Dennoch konnten nach acht Wochen Kulturdauer größere Abschnitte von aktiv am Austausch beteiligten Gefäßen nachgewiesen werden.

Wurden die weichen Hirnhäute in Liquor cerebrospinalis kultiviert, so zeigte der Großteil der Gefäße bis zu drei Wochen ein positives Viabilitätssignal, wobei auch hier vereinzelt nekrotische Abschnitte erkennbar waren.

Die histologische Untersuchung der Organkulturen zeigte in der Haematoxylin-Eosin und Masson-Trichrom Färbung zahlreiche Arterien kleiner und mittlerer Größe, die dem von der CAA vorwiegend betroffenen Gefäßtyp entsprechen. Die Gefäßwandarchitektur stellte sich morphologisch gut erhalten dar. Nach zweiwöchiger Kulturdauer war eine diskrete Verdickung der leptomeningealen Membranen zu beobachten, die nach vier Wochen in eine ausgeprägt fortschreitende Bindegewebsproliferation mündete. Glattes Muskelzell-Aktin und APP waren dennoch immunhistochemisch nach mehreren Wochen in Kultur in arteriolären Gefäßwänden nachweisbar (Abb. 6). Dies verdeutlicht, daß die strukturelle Integrität der Gefäßwand gewahrt blieb.

6.2 Immunpräzipitation von biosynthetisch markiertem APP

Die der metabolischen Markierung von APP mit (³⁵S) Methionin folgenden Immunpräzipitation-Studien zeigen, daß Organkulturen weicher Hirnhäute vom juvenilen Hund die Fähigkeit behalten, APP zu synthetisieren. Es konnten drei Proteinbanden zwischen 95 und 115 kDa beobachtet werden, nachdem das homogenisierte Gewebe immunpräzipitiert war. Diese Banden besitzen das gleiche

Molekulargewicht wie diejenigen Banden, die vom Zellysat der als Positivkontrolle dienenden Neuroblastomzellen hervorgerufen werden. Die untere Bande ist mit der APP-Bande identisch, die vom Überstand der Neuroblastomzellen präzipitierte. Dies ist ein Hinweis darauf, daß diese Bande die sekretierte Form des APP repräsentiert (nicht gezeigte Daten).

7. Abbau von B-A β (1-40)

7.1 Abbau von B-A β (1-40) in Kulturmedium und Liquor cerebrospinalis durch Leptomeningen

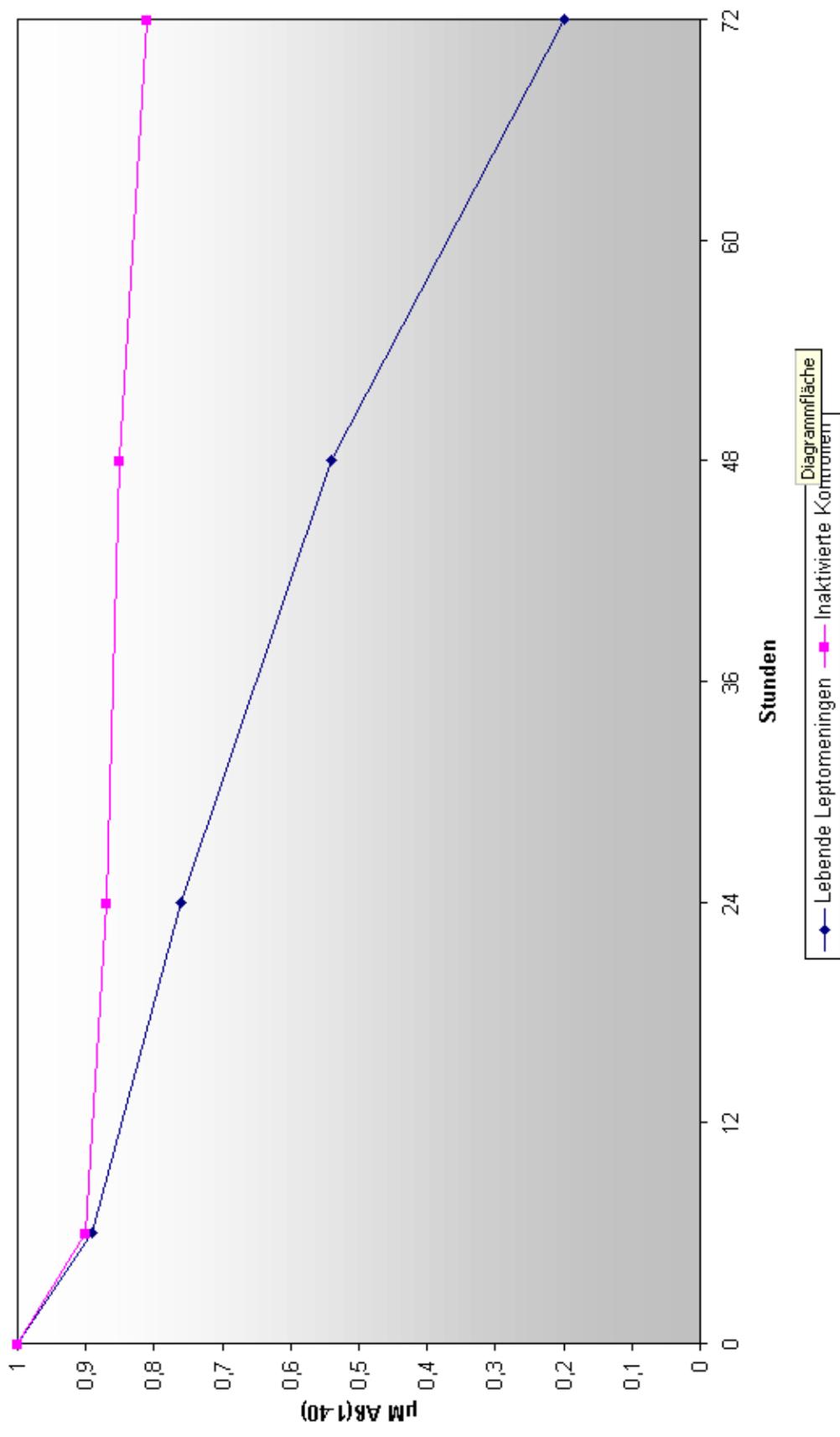
In jeweils 20 voneinander unabhängigen Einzelmessungen konnte bei einer Ausgangskonzentration von 1 μ M eine Konzentrationsminderung um bis zu 800nM pro Gewebestück (gemittelter Wert) über 72h in Kulturmedium beobachtet werden. Kontrollen mit durch KCN inaktivierten Hirnhäuten, die auch mit B-A β (1-40) versetzt wurden, ergaben eine maximale Abnahme um 190nM (Abb. 7).

Bei Durchführung desselben Versuchs (jeweils 20 voneinander unabhängige Einzelmessungen) in humanem Liquor cerebrospinalis zeigte sich bei derselben Ausgangskonzentration (1 μ M) eine Konzentrationsminderung um bis zu 790nM (gemittelter Wert) B-A β (1-40) pro Gewebestück über 72h, wobei hier in den ersten 24 Stunden nach Versuchsbeginn die größte Konzentrationsabnahme von B-A β (1-40) beobachtet wurde. Die inaktivierten und mit 1 μ M B-A β versetzten Leptomeningen zeigten über denselben Zeitraum eine Konzentrationsreduktion um 220nM (Abb. 8)

7.2 Abbau von B-A β (1-40) in Kulturmedium und Liquor cerebrospinalis durch isolierte leptomeningeale Gefäße

In jeweils 20 voneinander unabhängigen Einzelmessungen wurde demonstriert, daß isolierte Teilstücke von leptomeningealen Gefäßen bei einer Ausgangskonzentration von 1 μ M B-A β (1-40) eine Konzentrationsminderung um 800nM (gemittelter Wert) über 72h in Kulturmedium erzielen. Der überwiegende Anteil der Konzentrationsabnahme wurde in den ersten 24h nach Versuchsbeginn beobachtet. Als Kontrolle fungierende, ebenfalls mit KCN inaktivierte Gefäßstücke zeigten eine Konzentrationsminderung um maximal 200nM (Abb. 9). In Liquor cerebrospinalis

Abb. 7: In Kulturmedium gelöstes B-Aß(1-40), von Leptomeningen abgebaut



**Abb. 8: In Liquor cerebrospinalis
gelöstes B-Aß(1-40), von Leptomeningen abgebaut**

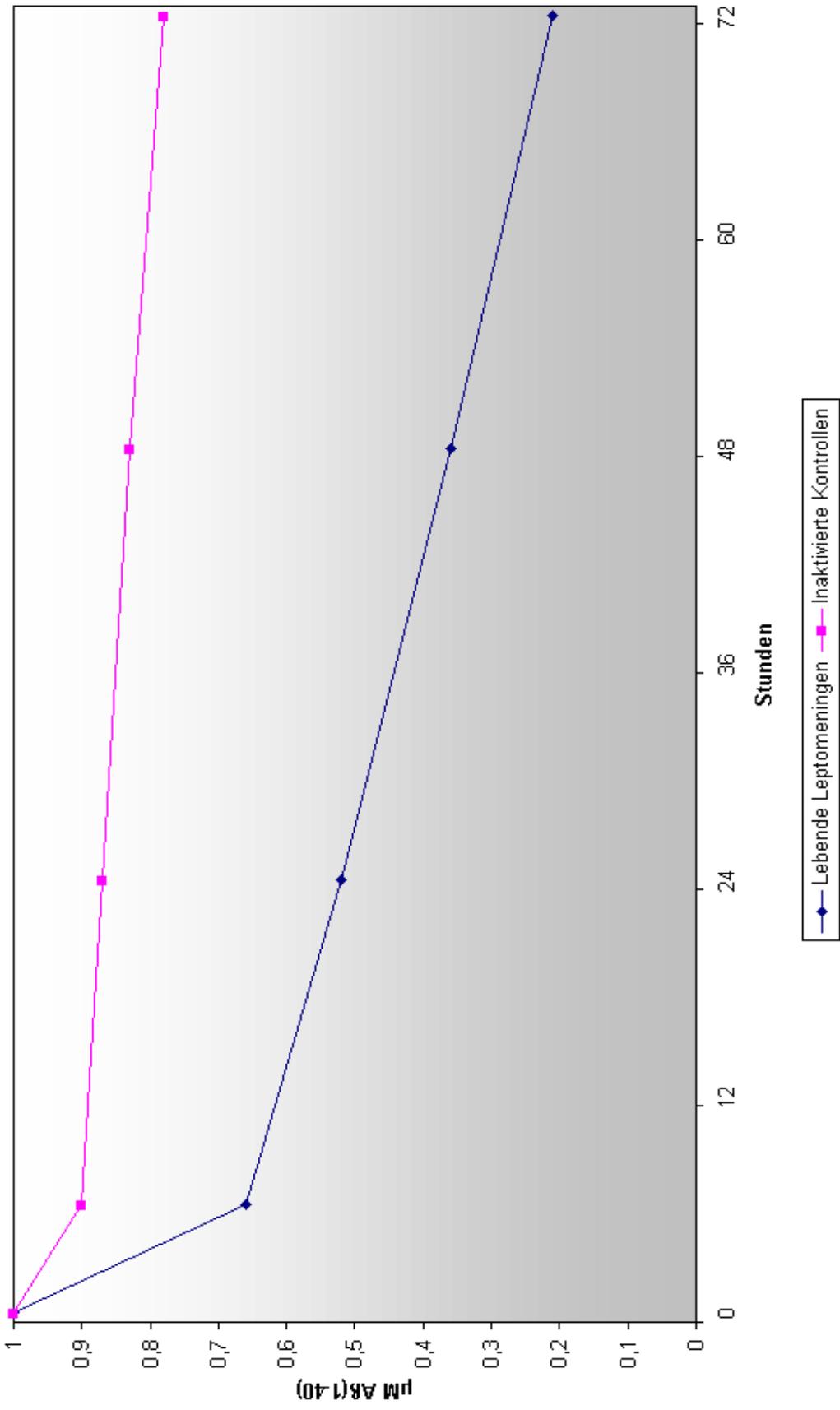
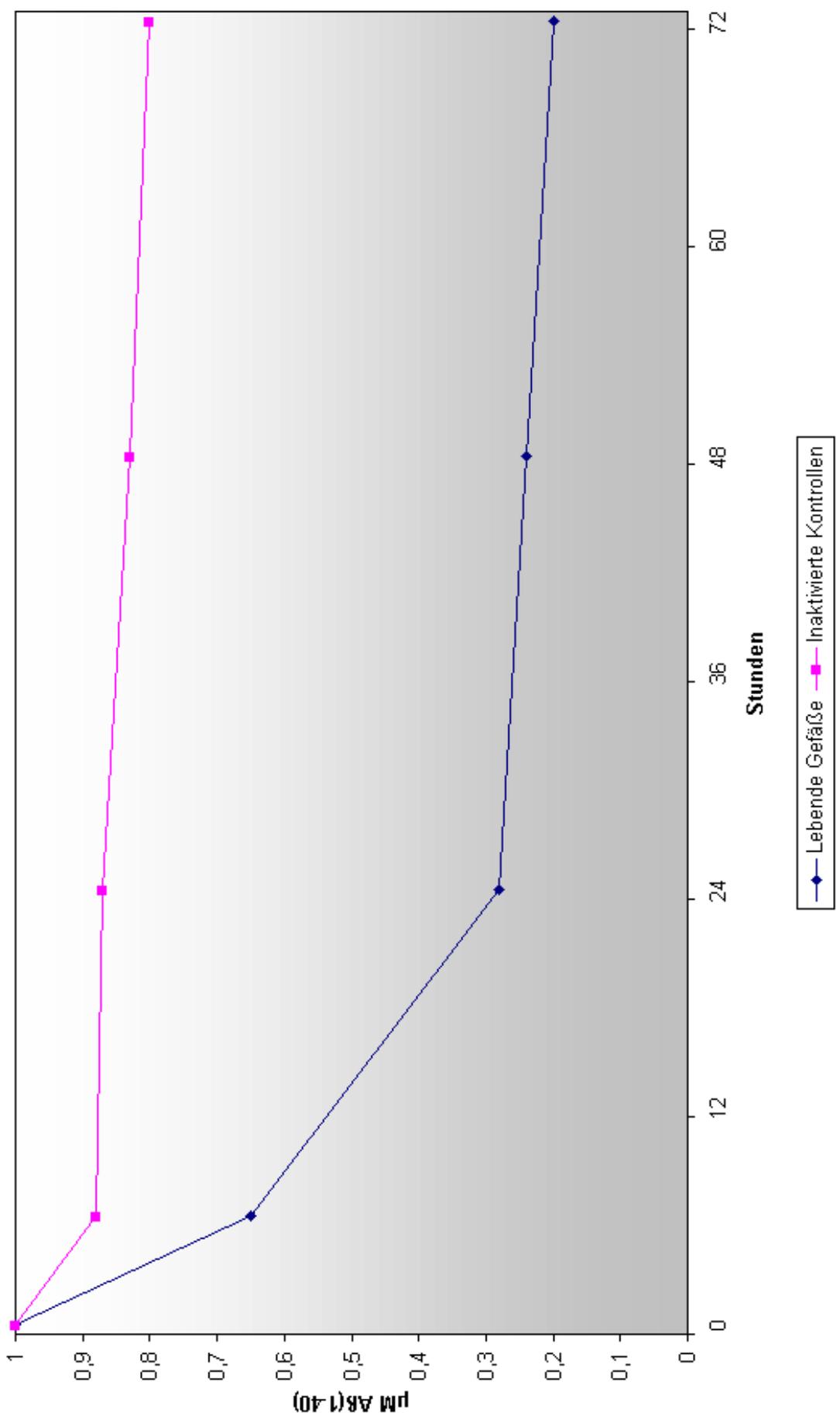


Abb. 9: In Kulturmedium gelöstes B-Aß(1-40), von leptomeningealen Gefäßen abgebaut



zeigte sich in wiederum 20 voneinander unabhängigen Einzelmessungen, daß leptomeningeale Gefäße innerhalb von 72h bei bekannter Ausgangskonzentration eine Konzentrationsminderung um 700nM (gemittelter Wert) B-A β (1-40) erzielen. Der überwiegende Anteil der Konzentrationsabnahme wurde erneut anfangs beobachtet; die inaktivierten Kontrollen zeigten eine Konzentrationsreduktion um 220nM B-A β (Abb. 10).

7.3 Kontrollen

Für die hier beschriebenen Experimente wurden als weitere Kontrollen Kulturmedium und Liquor cerebrospinalis jeweils mit 1 μ M B-A β versetzt und über 72h beobachtet, um ausschließen zu können, daß in Abwesenheit von leptomeningeaalem Gewebe eine spontane Konzentrationreduktion des Peptids stattfindet. Ferner wurde auch ausgeschlossen, daß Kulturmedium und Liquor cerebrospinalis ohne B-A β Zusatz im ELISA-Testverfahren ein wesentliches Hintergrundsignal zeigen, da letzteres nur einen Anteil von weniger als 5% des Gesamtsignals hatte.

8. Abbau von B-A β (1-42)

8.1 Abbau von B-A β (1-42) in Kulturmedium und Liquor cerebrospinalis durch Leptomeningen

Bei einer Ausgangskonzentration von 1 μ M B-A β (1-42) konnte in wiederum 20 voneinander unabhängigen Einzelmessungen eine Konzentrationsreduktion um 970nM (gemittelter Wert) über 72h in Kulturmedium gezeigt werden, so daß hier eine beinahe vollständige Aufnahme des stärker pathogenen Peptids durch Leptomeningen gezeigt werden konnte. In den ersten 24 Stunden wurde wiederum der überwiegende Anteil der A β Konzentration reduziert (900nM). Die mit KCN inaktivierten weichen Hirnhäute zeigten eine Konzentrationsabnahme um maximal 200nM B-A β über 72h (Abb. 11).

Derselbe Versuch wurde in 20 voneinander unabhängigen Einzelmessungen in humanem Liquor cerebrospinalis durchgeführt. Es war eine Konzentrationsabnahme um 970nM (gemittelter Wert) pro Gewebestück zu beobachten, wobei es in den ersten 24h zu einem Konzentrationsgefälle von beinahe 900nM kam. Kontrollversuche mit

Abb. 10: In Liquor cerebrospinalis gelöstes B-A β (1-40), von leptomeningealen Gefäßen abgebaut

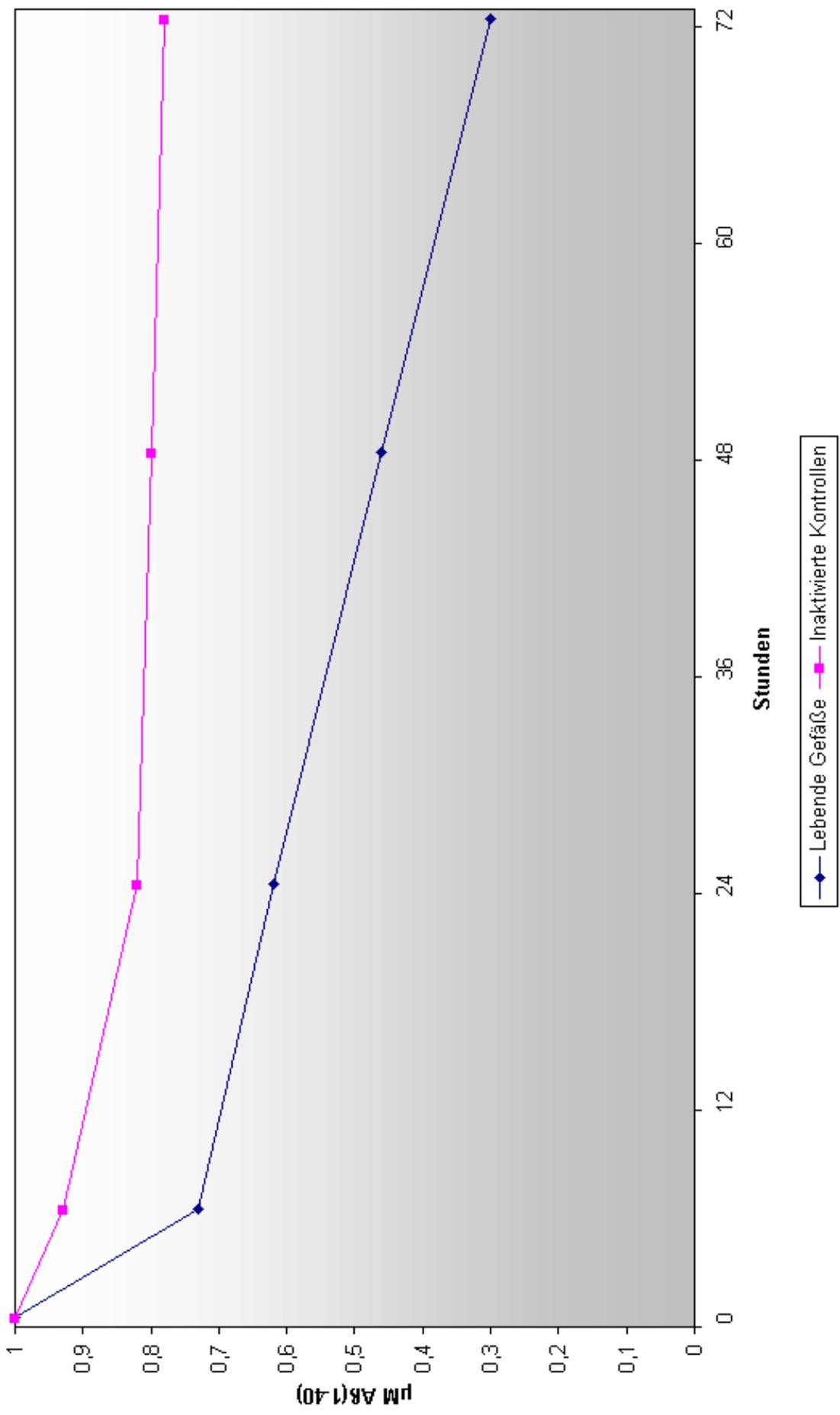
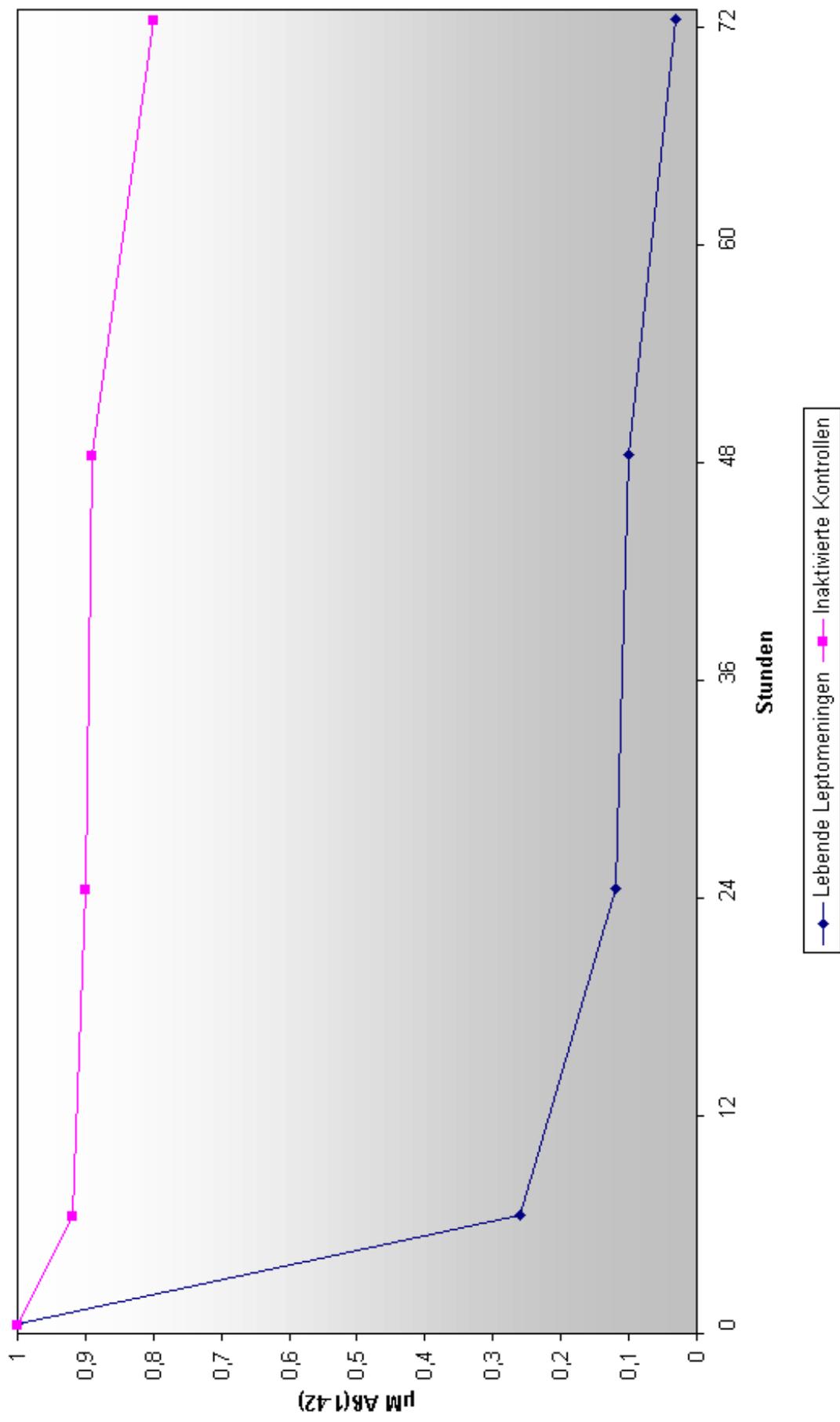


Abb. 11: In Kulturmedium gelöstes B-Aß(1-42), von Leptomeningen abgebaut



inaktivierten weichen Hirnhäuten zeigten eine Konzentrationsreduktion um maximal 50nM B-A β (1-42) (Abb. 12).

8.2 Abbau von B-A β (1-42) in Kulturmedium und Liquor cerebrospinalis durch isolierte leptomeningeale GefäÙe

Bei einer Ausgangskonzentration von 1 μ M B-A β (1-42) konnte in 20 voneinander unabhängigen Einzelmessungen ein Konzentrationsgefälle von bis zu 900nM (gemittelter Wert) über 72h in Kulturmedium aufgrund des Einflusses isolierter leptomeningealer GefäÙe demonstriert werden. Inaktivierte GefäÙstücke zeigten eine Konzentrationsreduktion um 180nM über denselben Zeitraum (Abb. 13).

Die Durchführung desselben Versuchs (20 voneinander unabhängige Einzelmessungen) in Liquor cerebrospinalis zeigte eine Konzentrationsreduktion des gelöst vorliegenden Peptids um 850nM (gemittelte Werte) über 72h. Die mit KCN inaktivierten KontrollgefäÙe erzielten eine Konzentrationsminderung im Liquor um 100nM (Abb. 14).

8.3 Kontrollen

Die Kontrollversuche sind den unter Punkt 7.3 beschriebenen Kontrollen identisch, und konnten sowohl einen spontanen Abbau als auch ein signifikantes Hintergrundsignal des Elisa ausschließen.

9. Statistische Analyse der Ergebnisse

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) auf ihre Signifikanz geprüft. So konnten die folgenden Hypothesen auf ihre statistische Aussagekraft geprüft werden:

1. Lebendes und inaktiviertes Gewebe unterscheidet sich signifikant in seinem Abbauverhalten von A β , unabhängig von der Gewebeart (Leptomeningen in toto versus isolierte GefäÙe) und unabhängig von dem untersuchten Peptid (Peptid I = A β (1-42) versus Peptid II = A β (1-40)).

Abb. 12: Im Liquor cerebrospinalis gelöstes B-Ab(1-42), von Leptomeningen abgebaut

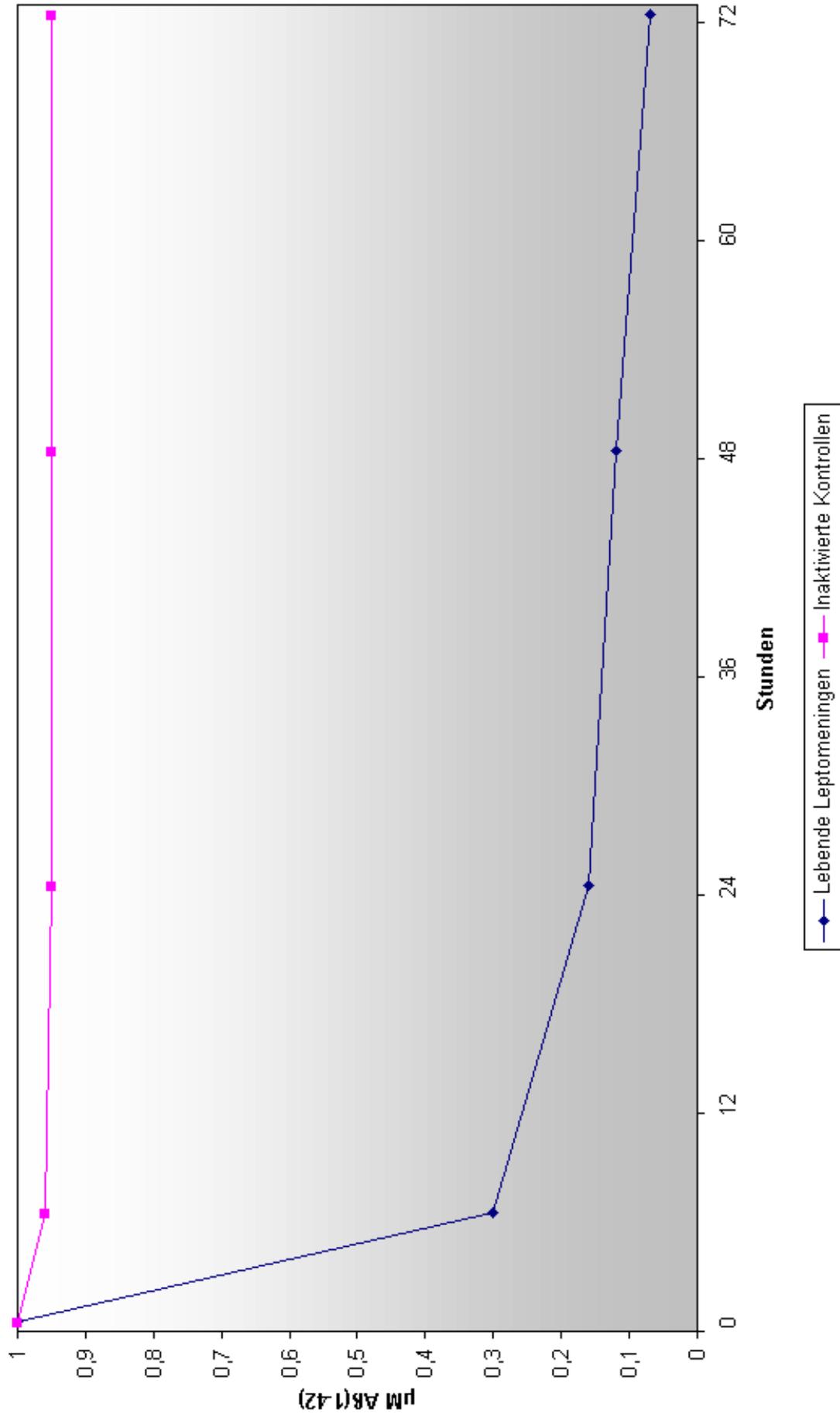


Abb. 13: In Kulturmedium gelöstes B-Aß(1-42), von leptomeningeealen Gefäßen abgebaut

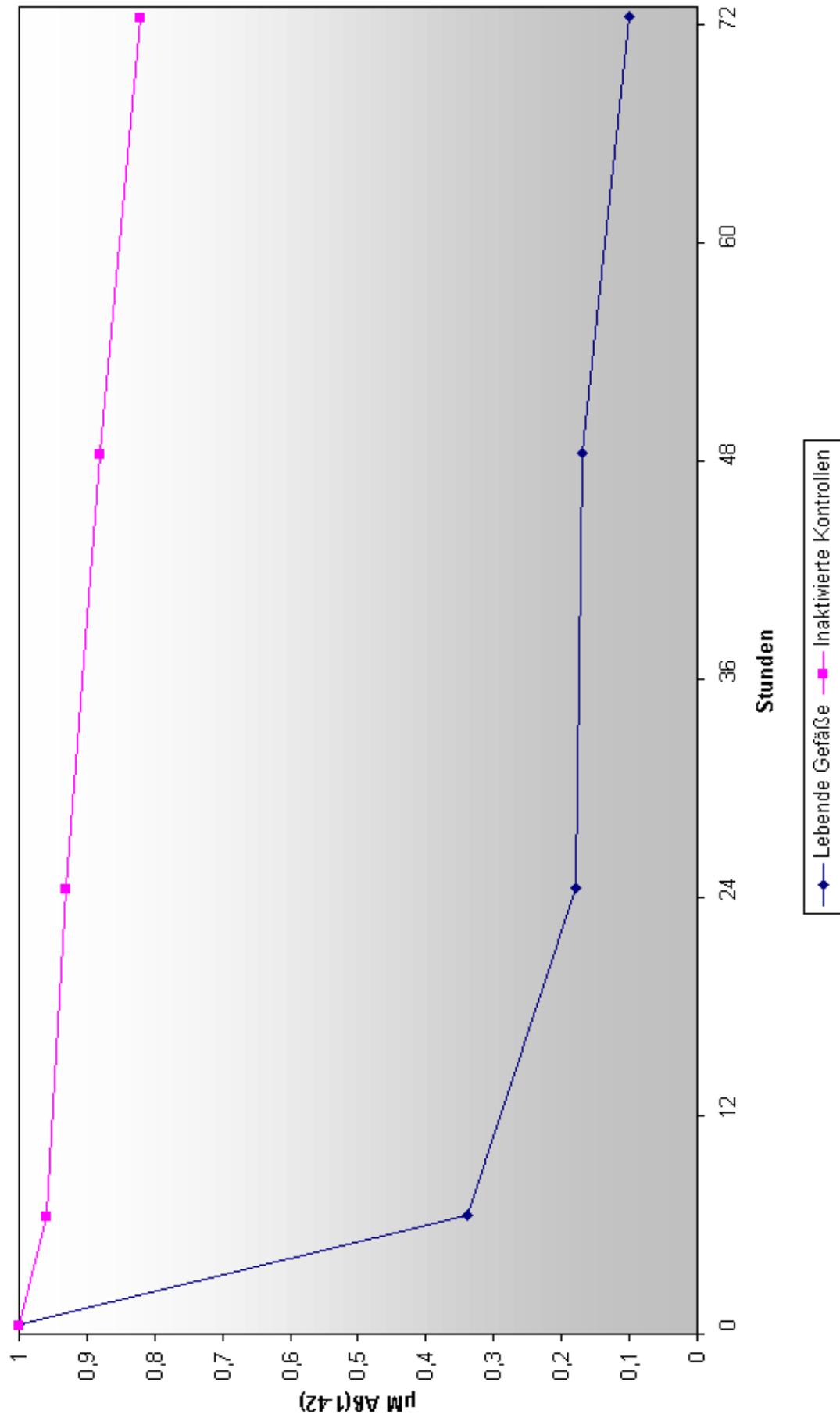
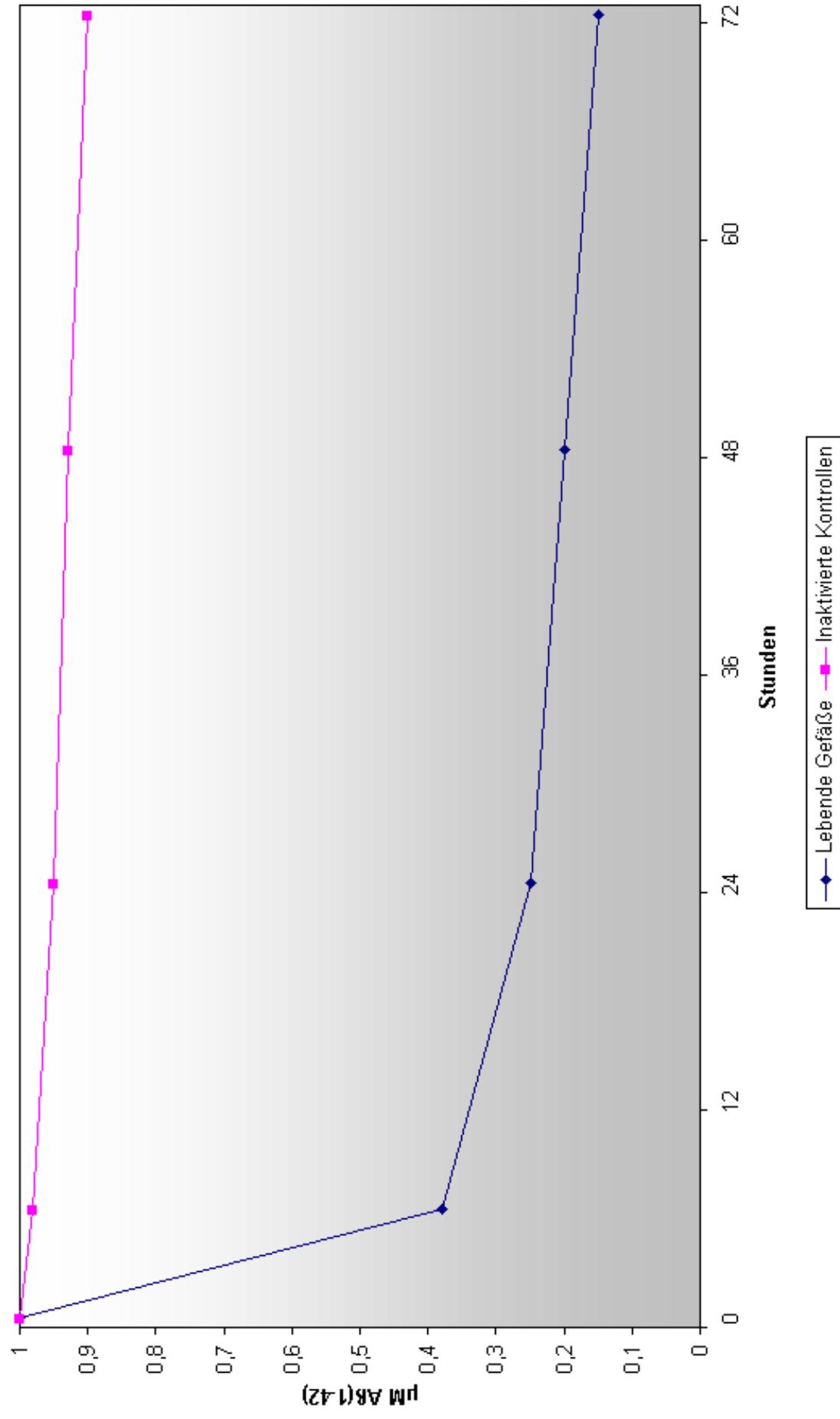


Abb. 14: In Liquor cerebrospinalis gelöstes B-AB(1-42), von leptomeningealen Gefäßen abgebaut



2. Lebende Leptomeningen in toto bauen A β in größerem Ausmaß ab als isolierte lebende Gefäße, und dies unabhängig vom untersuchten Peptid.
3. Peptid I (A β 1-42) wird sowohl von lebenden Leptomeningen als auch von lebenden Gefäßen in einem größeren Ausmaß abgebaut als Peptid II (A β 1-40).
4. Inaktiviertes Gewebe (unabhängig von der Gewebeform) hat eine nur geringe Fähigkeit, die verschiedenen Peptide abzubauen, so daß ein Signifikanzunterschied sowohl zwischen den Peptidarten als auch zwischen den inaktivierten Gewebearten idealerweise nicht festzustellen ist.

Ad 1 (vgl. Tabelle I)

Lebende Leptomeningen zeigen sowohl im Vergleich zu inaktivierten Leptomeningen als auch im Vergleich zu inaktivierten Gefäßen zu jedem Zeitpunkt (6h, 24h, 48h, 72h) eine mehrfach erhöhte Abbaufähigkeit. Diese besteht unabhängig vom untersuchten Peptid und ist hochsignifikant ($p < 0,01$).

Lebende Gefäße zeigen sowohl im Vergleich zu inaktivierten Gefäßen als auch im Vergleich zu inaktivierten Leptomeningen zu jedem Zeitpunkt (6h, 24h, 48h, 72h) eine mehrfach erhöhte Abbaufähigkeit. Diese besteht unabhängig vom untersuchten Protein und ist hochsignifikant ($p < 0,01$).

Demzufolge zeigt sich hier ein hochsignifikanter Unterschied zwischen lebendem und inaktiviertem Gewebe, unabhängig von Gewebeform und untersuchtem Protein.

Ad 2 (vgl. Tabelle II)

Lebende Leptomeningen bauen sowohl Peptid I als auch zu Peptid II in größerem Umfang ab als lebende Gefäße. Dieser Unterschied besteht unabhängig vom untersuchten Peptid und ist hochsignifikant ($p < 0,01$).

Ad 3 (vgl. Tabelle III)

Lebende Leptomeningen und lebende Gefäße bauen Peptid I (A β 1-42) in größerem Ausmaß ab als Peptid II (A β 1-40). Dieser Unterschied ist für lebende Leptomeningen

zu jedem Untersuchungszeitpunkt hochsignifikant ($p < 0,01$), für lebende Gefäße signifikant ($p < 0,05$) nachweisbar, so daß sich hier ein marginaler Unterschied zugunsten der Abbaufähigkeit von A β von lebenden Leptomeningen im Vergleich zu lebenden Gefäßen feststellen läßt.

Ad 4 (vgl. Tabelle II und III)

Inaktiviertes Gewebe (sowohl Leptomeningen als auch isolierte Gefäße) zeigt zu jedem Untersuchungszeitpunkt eine so geringe Abbaufähigkeit von Peptid I und Peptid II, daß ein Signifikanzunterschied bezüglich der Peptidarten und bezüglich der Gewebearten nicht festgestellt werden kann ($p > 0,05$).

Tabelle I: Erläuterung siehe Text

		inaktivierte Gefäße				
lebende Leptomeningen	Peptid I (Leptomeningen = x1)	Peptid II (Leptomeningen = x1)	Peptid I (Leptomeningen = x1)	Peptid II (Leptomeningen = x1)	Peptid II (Leptomeningen = x1)	
	Peptid I (Gefäß = x2)	Peptid I (Gefäß = x2)	Peptid I (Gefäß = x2)	Peptid II (Gefäß = x2)	Peptid II (Gefäß = x2)	
	6 h	0,0270**	0,6222**	0,0320**	6 h	0,6270**
	24 h	0,1000**	0,7270**	0,1120**	24 h	0,7390**
lebende Gefäße	Peptid I (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	Peptid I (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	
	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid II (inaktiviert = x2)	Peptid II (inaktiviert = x2)	
	6 h	0,2440**	0,5790**	0,2490**	6 h	0,5840**
	24 h	0,6000**	0,6770**	0,6120**	24 h	0,6890**
lebende Gefäße	Peptid I (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	Peptid I (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	
	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid II (inaktiviert = x2)	Peptid II (inaktiviert = x2)	
	6 h	0,2440**	0,5790**	0,2490**	6 h	0,5840**
	24 h	0,6000**	0,6770**	0,6120**	24 h	0,6890**
lebende Leptomeningen	Peptid I (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	Peptid I (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	
	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid II (inaktiviert = x2)	Peptid II (inaktiviert = x2)	
	6 h	0,0290**	0,6240**	0,0330**	6 h	0,6280**
	24 h	0,1110**	0,7380**	0,1110**	24 h	0,7380**
lebende Gefäße	Peptid I (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	Peptid I (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	
	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid II (inaktiviert = x2)	Peptid II (inaktiviert = x2)	
	6 h	0,0290**	0,6240**	0,0330**	6 h	0,6280**
	24 h	0,1110**	0,7380**	0,1110**	24 h	0,7380**
lebende Leptomeningen	Peptid I (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	Peptid I (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	
	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid II (inaktiviert = x2)	Peptid II (inaktiviert = x2)	
	6 h	0,2780**	0,7610**	0,2840**	6 h	0,7670**
	24 h	0,5450**	0,7730**	0,5490**	24 h	0,7770**
lebende Gefäße	Peptid I (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	Peptid I (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	
	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid II (inaktiviert = x2)	Peptid II (inaktiviert = x2)	
	6 h	0,2460**	0,2500**	0,5810**	6 h	0,5850**
	24 h	0,6110**	0,6110**	0,6880**	24 h	0,6880**
lebende Leptomeningen	Peptid I (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	Peptid I (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	Peptid II (lebend = x1)	
	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid I (inaktiviert = x2)	Peptid II (inaktiviert = x2)	Peptid II (inaktiviert = x2)	
	6 h	0,6260**	0,6320**	0,7020**	6 h	0,7080**
	24 h	0,6660**	0,6700**	0,6990**	24 h	0,7030**

0,01 < p < 0,05 *

0,001 < p < 0,01 ***

angegebene Ziffern: die angegebenen Werte bezeichnen die mittlere Differenz (x1 - x2) der zu einem gegebenen Zeitpunkt gemessenen Konzentrationswerte (aus jeweils 20 Einzelmessungen gemittelte Werte), bezogen auf das jeweilige Gewebe bzw. Peptid.

Peptid I = Aβ(1-42)

Peptid II = Aβ(1-40)

Tabelle II: Erläuterung siehe Text

	lebende Gefäße																																					
	Peptid I (Leptomeningen = x1) Peptid I (Gefäß = x2)		Peptid II (Leptomeningen = x1) Peptid I (Gefäß = x2)		Peptid I (Leptomeningen = x1) Peptid II (Gefäß = x2)		Peptid II (Leptomeningen = x1) Peptid II (Gefäß = x2)																															
	6 h	24 h	48 h	72 h	6 h	24 h	48 h	72 h																														
lebende Leptomeningen	-0,2170**	-0,5000**	-0,3480**	-0,1210**	-0,3780**	-0,1270**	-0,1350**	-0,1070**	-0,5520**	-0,5770**	-0,4240**	-0,1540**	6 h	24 h	48 h	72 h	-0,0430*	-0,0500*	-0,0590**	-0,0740**																		
inaktivierte Leptomeningen	inaktivierte Gefäße								Peptid I (Leptomeningen = x1) Peptid I (Gefäß = x2)		Peptid II (Leptomeningen = x1) Peptid II (Gefäß = x2)		Peptid I (Leptomeningen = x1) Peptid II (Gefäß = x2)		Peptid II (Leptomeningen = x1) Peptid II (Gefäß = x2)																							
	6 h	24 h	48 h	72 h	6 h	24 h	48 h	72 h	6 h	24 h	48 h	72 h	6 h	24 h	48 h	72 h	6 h	24 h	48 h	72 h																		
	-0,0020 n.s.	-0,0110 n.s.	0,0110 n.s.	0,0130 n.s.	-0,0060 n.s.	-0,0110 n.s.	0,0110 n.s.	0,0130 n.s.	0,0030 n.s.	0,0010 n.s.	0,0080 n.s.	0,0220 n.s.	0,0010 n.s.	0,0010 n.s.	0,0080 n.s.	0,0220 n.s.	0,0010 n.s.	0,0010 n.s.	0,0020 n.s.	0,0180*																		

0,05 < p = nicht signifikant (n. s.)

0,01 < p < 0,05 *

0,001 < p < 0,01 **

angegebene Ziffern: die angegebenen Werte bezeichnen die mittlere Differenz (x1 - x2) der zu einem gegebenen Zeitpunkt gemessenen Konzentrationswerte (aus jeweils 20 Einzelmessungen gemittelte Werte), bezogen auf das jeweilige Gewebe bzw. Peptid.

Peptid I = Aβ(1-42)

Peptid II = Aβ(1-40)

Tabelle III: Erläuterung siehe Text

	Peptid I = x1 lebende Leptomeningen	Peptid II = x1 inaktivierte Leptomeninge	Peptid II = x1 lebende Gefäße	Peptid II = x1 inaktivierte Gefäße
Peptid I = x2	6 h 24 h 48 h 72 h	6 h 24 h 48 h 72 h	6 h 24 h 48 h 72 h	6 h 24 h 48 h 72 h
	-0,5950** -0,6270** -0,4830** -0,2280**	-0,0040 n.s. -0,0040 n.s. -0,0060 n.s. -0,0040 n.s.	-0,3350* -0,0770* -0,0760** -0,0330*	-0,0050 n.s. -0,0120* -0,0030 n.s. -0,0090 n.s.

0,05 < p = nicht signifikant (n. s.)

0,01 < p < 0,05 *

0,001 < p < 0,01 **

angegebene Ziffern: die angegebenen Werte bezeichnen die mittlere Differenz (x1 - x2) der zu einem gegebenen Zeitpunkt gemessenen Konzentrationswerte (aus jeweils 20 Einzelmessungen gemittelte Werte), bezogen auf das jeweilige Gewebe bzw. Peptid.

Peptid I = Aβ(1-42)

Peptid II = Aβ(1-40)

Diskussion

10. Grundlagen des experimentellen Vorgehens

Der dieser Arbeit zugrunde liegende Ansatz ist die Simulation des zentralen, sowohl der Pathogenese der Cerebralen Amyloid Angiopathie als auch der Alzheimer Demenz ursächlichen Prozesses, d.h. der pathologischen Akkumulation von A β in der Wand von Hirngefäßen und im Kortex. Das experimentelle Modell sollte der in vivo Situation soweit wie möglich gleichen, da proteinbiochemische Vorgänge eng mit der Konformation der beteiligten Proteine zusammenhängen. Daher wurde mit lebenden leptomeningealen Strukturen experimentiert, welche die geforderte Pathologie entwickeln können, um der Frage nachzugehen, ob den weichen Hirnhäuten eine präventive Bedeutung in der Entwicklung der CAA zukommt.

Der Beantwortung dieser Frage diene die Etablierung von Organkulturen, um anhand dieses Modellsystems den Einfluß leptomeningealer Strukturen auf den Abbau von A β zu studieren. Die Wahl kultivierter weicher Hirnhäute junger Hunde als Modellsystem beruht auf folgenden Überlegungen: Zunächst ist es von grundlegender Bedeutung, daß das Tier A β induzierte zerebrovaskuläre Veränderungen aufweisen kann, die der Pathogenese in menschlichen Hirnhäuten weitgehend identisch sind. Dies setzt einerseits Übereinstimmung bezüglich des Aufbaus und der Struktur der weichen Hirnhäute voraus, andererseits muß auch eine vollständige Identität bezüglich der Proteinstruktur und Proteinkonformation gefordert werden, um keinerlei Zweifel an der Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu lassen.

Alle hier genannten Kriterien treffen auf das Hundemodell zu. Erstens entwickeln Hunde im Alter zerebrovaskuläre Pathologien im Sinne einer CAA (Giaccone et al. 1990; Ishihara et al. 1991; Shimada et al. 1992; Uchida et al. 1993). Zweitens sind die Leptomeningen des Hundes speziell im Hinblick auf die hohe Anzahl kleiner Arteriolen, die als typischer Ausbildungsort der CAA gelten, den menschlichen Hirnhäuten sehr ähnlich. Drittens und entscheidend ist jedoch, daß die Aminosäuresequenz von A β bei Mensch und Hund identisch ist (Johnstone et al. 1990). Zusammenfassend betrachtet erscheint deshalb das Hundemodell als erste Wahl (Cummings et al. 1993, 1996).

10.1 Etablierung der Organkultur und Studien kultivierter Gefäße

Bislang gab es keine experimentellen Ansätze, welche die CAA an juvenilen Leptomeningen vom Hund untersuchten. Voraussetzung für alle Untersuchungen ist die Möglichkeit, leptomeningeeales Gewebe über einen längeren Zeitraum hinweg mit intakter Gefäßwandstruktur und nur geringen morphologischen Veränderungen zu kultivieren. Dies konnte insbesondere durch die erhaltene metabolische Aktivität, namentlich aufgrund der de novo Produktion von APP verdeutlicht werden. Nachdem evident war, daß Organkulturen leptomeningeealer Arteriolen prinzipiell möglich sind (Prior et al. 1996a) und über mehrere Wochen eine gute Viabilität aufweisen, konnten die Inkubationsexperimente jeweils an funktionell intakten Kulturen durchgeführt werden.

Experimente mit sowohl in Liquor cerebrospinalis als auch in Kulturmedium gelöstem A β (1-40) und A β (1-42) erlaubten eine differenzierte Aussage bezüglich deren in vitro Verhalten. Es konnte gezeigt werden, daß weiche Hirnhäute gelöst vorkommendes A β metabolisieren und daher möglicherweise eine protektive Rolle ausüben. Darüber hinaus konnte eine quantitative Aussage bezüglich der Aufnahme von A β über die Zeit getroffen werden. Dabei war eine vermehrte Clearance des A β -Peptids in Liquorkulturen unabhängig vom Gewebe von pathogenerem A β (1-42) zu beobachten. Aus diesen Versuchen ging weiterhin hervor, daß in Kultur erst nach mehreren Tagen die Kapazität der Hirnhäute, A β zu metabolisieren, erschöpft war

Ferner bietet dieses Modell nicht nur eine konservierte Gefäßarchitektur, sondern es wird infolge erhaltener metabolischer Aktivität die Extrazellulärmatrix weiterhin sezerniert. Dies ist insofern von Bedeutung, als auch der Einfluß extrazellulärer Matrixmoleküle wie beispielsweise die Bedeutung der Heparansulfat Proteoglykane, des Laminins oder von Kollagen Typ 4, allesamt Bestandteile der Basalmembran, für die Ablagerung von A β studiert werden kann (Snow et al. 1994, 1995; Perlmutter et al. 1990, 1994; Fukuchi et al. 1998). Der enge Zusammenhang zwischen dieser Matrix und der CAA wird schon von Perlmutter et al. (1991, 1994) beschrieben.

Die Möglichkeit, Leptomeningen nicht nur in Kulturmedium, sondern auch in humanem Liquor cerebrospinalis zu kultivieren, erscheint von besonderer Bedeutung, denn es ist wahrscheinlich, daß in Liquor cerebrospinalis spezifische Faktoren enthalten sind, die einen Beitrag zum Prozeß der A β Ablagerung leisten, beispielsweise Apolipoprotein E. Daher ist es notwendig, die Pathogenese der CAA unter diesen definierten Bedingungen

zu studieren, da sie der in vivo Situation entsprechen, in welcher die Leptomeningen im Subarachnoidalraum von Liquor cerebrospinalis umgeben sind.

Auch in der heute noch umstrittenen Frage der Quelle von vaskulär deponiertem A β ist dieses Modell aussagekräftig, denn aufgrund der erhaltenen Gefäßstruktur und der Ausprägung extrazellulärer Matrix kann untersucht werden, ob A β direkt dem von glatten Muskelzellen produzierten APP entstammt (Frackowiak et al. 1995; Wisniewski und Wegiel 1994; Wisniewski et al. 1995), oder ob es aufgrund seines Vorkommens in Liquor cerebrospinalis (Vigo-Pelfrey et al. 1993; Pirttila et al. 1996) erst sekundär zur Ablagerung in leptomeningealen Gefäßen kommt. Die Folgerungen hieraus lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Organkultur weicher Hirnhäute vom Hund ist problemlos durchführbar.
- Die Gefäße der weichen Hirnhäute als auch die Leptomeningen in toto sind über einen Zeitraum bis zu 8 Wochen viabel und metabolisch aktiv.
- Die Organkultur weicher Hirnhäute in Liquor cerebrospinalis entspricht den physiologischen Bedingungen, in der leptomeningeale Gefäße von mit der Extrazellulärflüssigkeit des Kortex in freier Diffusion stehendem Liquor cerebrospinalis umgeben sind.
- Dieses Modell ist daher gut geeignet die Pathogenese der CAA zu studieren.

10.2 Unterschiede zwischen A β (1-40) und A β (1-42)

Alle Experimente demonstrieren, daß A β (1-42) in einem größeren Umfang sowohl von Leptomeningen in toto als auch von isolierten Gefäßen dem jeweiligen Medium entzogen wird als A β (1-40).

Zunächst verdeutlicht die umfangreiche und konstante Aufnahme beider Formen, daß Leptomeningen und zerebrovaskuläre Gefäße ein großes Reservoir für A β darstellen, was auch durch quantitative ELISA-Studien an Leptomeningen von AD-Patienten gezeigt werden konnte (Hamano et al. 1997). Shinkai et al. (1995, 1997) konnten zeigen, daß in der löslichen Fraktion der Leptomeningen generell mehr A β Ablagerungen nachzuweisen sind als in intrakraniellen Gefäßen, was im Einklang mit den Ergebnissen dieser Dissertation steht. Dabei ist ein mehrfach höherer Anteil von

A β (1-42) im Vergleich zu A β (1-40) innerhalb der weichen Hirnhäute zu finden. Diese Ergebnisse werden von Roher et al. (1993) unterstützt, dessen Untersuchungen auch in unlöslichem vaskulären Amyloid dasselbe Überwiegen von A β (1-42) gegenüber A β (1-40) zeigen. Daraus ergibt sich eine wichtige Rolle für A β (1-42) in der initialen Deposition innerhalb zerebrovaskulärer Gefäße und der Progression der CAA (Van Nostrand et al. 1996). Shinkai et al. (1995) stellen weiterhin dar, daß zwischen dem sechsten und achten Lebensjahrzehnt ein starker Anstieg der A β Ablagerungen in den Leptomeningen zu beobachten ist, der dem immunhistochemischen Nachweis einer CAA um Jahre vorausgeht. Es scheint also so zu sein, daß Leptomeningen auch in vivo A β Peptide aufnehmen, bevor es schließlich zu unlöslichen extrazellulären Ablagerungen kommt.

Somit ergibt sich das Bild eines schnellen und fast vollständigen Abbaus des unlöslicheren und pathogeneren A β (1-42), welches bei der Initiierung der CAA ursächlich beteiligt ist. Studien von Pirttila et al. (1996) haben eine inverse Korrelation zwischen zerebrovaskulären Amyloidablagerungen und A β Konzentrationen in Liquor cerebrospinalis nachweisen können. Dies läßt vermuten, daß intrathekale A β Spiegel bei der Kongophilen Angiopathie deshalb verringert sind, weil es schon zu zerebrovaskulären Ablagerungen gekommen ist.

10.3 Der Einfluß der Zeitachse

Eine weitere Frage stellt sich bezüglich der zeitlichen Aufnahme von A β . So haben alle Experimente übereinstimmend gezeigt, daß der bei weitem größte Anteil des Peptids innerhalb der ersten 24 Stunden abgebaut wird. Dies trifft sowohl für die Hirnhaut in toto als auch für isolierte Gefäße zu. Desweiteren ist dieses Phänomen unabhängig vom jeweiligen Peptid zu beobachten.

Als mögliche Erklärung ist die Tatsache anzuführen, daß das hier untersuchte Gewebe noch nicht von der CAA beeinträchtigt ist, und deshalb imstande ist, den Großteil der im Vergleich zu physiologischen Verhältnissen 100fach erhöhten A β Konzentration aufzunehmen. Anschließend käme es zu einer Saturierung des Peptidabbaus, so daß das in immer noch erhöhter Konzentration vorliegende A β nur in sehr geringem Maß weiterhin aufgenommen werden kann. Auch in vivo könnte eine Sättigung der A β abbauenden Mechanismen an der Ausbildung seniler Plaques und zerebrovaskulärer A β Ablagerungen beteiligt sein.

10.4 Kritikpunkte

10.4.1 Verhalten von Kontrollgewebe

Ein wichtiges Kontrollexperiment bestand in der Dokumentation des Verhaltens von inaktiviertem Gewebe. Idealerweise sollte nur lebendes Gewebe A β metabolisieren können, inaktiviertes Gewebe hingegen sollte keinen Anteil am Austausch zeigen. In gewissen Grenzen zeigte jedoch auch das abgetötete Kontrollgewebe eine Degradation von A β , wobei im Extremfall die Ausgangskonzentration um bis zu 22% gesenkt wurde (vgl. Abb. 8 und Abb. 10). Wahrscheinlich haben hier aus inaktiviertem Gewebe freigesetzte Proteasen zu einer Degradation von A β geführt. Andererseits ist es möglich, daß es zu einer passiven Anlagerung von A β an degenerierende Matrixmoleküle gekommen ist. Es bleibt festzuhalten, daß es im Mittel zu einer ca. 17%igen Senkung der Ausgangskonzentration in Anwesenheit von inaktiviertem Gewebe kommt. Diese ist in der statistische Analyse jedoch nicht signifikant.

10.4.2 Standardisierung der Membran- und Gefäßgröße

Die Untersuchungen können im Hinblick auf die Länge der Gefäße und Ausdehnung der weichen Hirnhäute bezüglich des Abbaus von A β keine quantitativen Aussagen treffen. Die Länge der untersuchten Gefäße variierte trotz der angestrebten Vorgabe von 0,5cm, und auch die Fläche der Leptomeningen ist aufgrund der Elastizität des Gewebes und seiner Veränderung in Kultur eine nur eingeschränkt standardisierbare Größe. Auch ist in jeder Probe untersuchter weicher Hirnhaut eine differierende Anzahl von Gefäßen enthalten. Diese Ungenauigkeiten sollten durch Versuche, die Proteinmenge pro Gewebestück zu bestimmen, umgangen werden, jedoch waren auch hier keine exakt reproduzierbaren Werte zu ermitteln, so daß zusammenfassend die quantitative Standardisierung von an Organkulturen gewonnenen Ergebnissen problematisch bleibt. Dennoch sind die hier gewonnenen Daten aus jeweils 20 unabhängig voneinander erhobenen Einzelmessungen reproduzierbar und hochsignifikant, so daß die getroffenen Aussagen zulässig erscheinen.

10.4.3 Übertragbarkeit auf den Menschen

Die Frage nach der Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen ist notwendig. Wie schon ausgeführt, können sich die Experimente den physiologischen Bedingungen generell nur annähern, diese nie genau kopieren. Wie jedoch schon an verschiedener Stelle erwähnt, gilt das Hundemodell als ein Tiermodell der Wahl, um die Pathogenese der CAA und der AD zu studieren, da Hunde altersabhängige pathologische Veränderungen entwickeln, die mit der durch die CAA beim Menschen hervorgerufenen Pathologie identisch sind, und es aufgrund einer 100%igen Homologie von humanem und caninem A β zu keinen proteinbedingten Ungenauigkeiten kommt (Johnstone et al. 1990; Uchida et al. 1993; Cummings et al. 1993, 1996; Okuda et al. 1994; Prior et al. 1995, 1996b).

10.5 Modell zur Pathogenese der CAA

Die Cerebrale Amyloid Angiopathie ist einerseits die häufigste Ursache nicht hypertensiv bedingter zerebraler Blutungen im Alter (Itoh et al. 1993), andererseits ein Charakteristikum der AD.

Definierend für diese Erkrankung ist die Ablagerung amyloidogener Proteine in kortikalen und leptomeningealen Gefäßen, wobei das am häufigsten deponierte Protein A β ist.

Die Inkubation lebender weicher Hirnhäute und leptomeningealer Gefäße mit exogenem, gelösten A β (1-40) bzw. A β (1-42) zeigte eine konstante und ausgeprägte Aufnahme des Peptids über einen Zeitraum von 72 Stunden. Diese Experimente sind insofern neuartig, als hier erstmals die Aufnahme von A β durch leptomeningeales Gewebe, welches noch nicht von der CAA affiziert ist, demonstriert werden konnte. Prior et al. (1995) haben zeigen können, daß es nach bereits initiiertes CAA nur noch einer physiologischen Konzentration von A β bedarf, damit es zur Progression der pathologischen Ablagerungen kommt. Jene Untersuchungen bezogen sich primär auf Hirnhäute alter Hunde. Diese Untersuchungen setzten die weichen Hirnhäute junger Hunde einer im Vergleich zu physiologischen Verhältnissen 100fach gesteigerten Konzentration von A β aus. Über einen Zeitraum von 72 Stunden sind sowohl die Membranen als Ganzes als auch isolierte Gefäße in der Lage, diese hohe Konzentration

auf bis zu 5% der Ausgangskonzentration von $1\mu\text{M}$ zu senken. Hieraus ergeben sich folgende Schlüsse:

- Lebende weiche Hirnhäute als auch isolierte lebende Gefäße reinigen das sie umgebende Milieu (Kulturmedium oder Liquor cerebrospinalis) sehr effektiv und unabhängig von der Peptidform von gelöst vorliegendem A β .
- A β (1-42) wird gewebeunabhängig in einem höheren Ausmaß metabolisiert als die weniger pathogene Form A β (1-40). Bei einer Mischung beider Formen - den physiologischen Verhältnissen entsprechend - kommt es ebenfalls zu einer hochgradigen Reinigung des Mediums von A β (nicht gezeigte Daten).
- Da A β in vivo gelöst in Liquor cerebrospinalis vorliegt, demonstrieren diese Experimente eine potentielle Rolle von lebenden Leptomeningen und lebenden Gefäßen in der Prävention von intrazerebralen A β Ablagerungen.

Diese Befunde sind mit dem im folgenden dargestellten pathogenen Modell zur CAA vereinbar (Urmoneit et al. 1997):

Liquor cerebrospinalis und Extrazellulärflüssigkeit umgeben leptomeningeale und kortikale Arteriolen und enthalten Apolipoprotein E und A β transportierende Lipoproteine (Koudinov et al. 1996). Zusätzlich weisen zerebrovaskuläre A β Ablagerungen eine enge Beziehung zu degenerierenden glatten Muskelzellen auf (Kawai et al. 1993; Wisniewski und Wegiel 1994), und manifestieren sich als fokale A β Depositionen (Yamaguchi et al. 1992), wobei lösliches A β (1-42) den Zelltod in glatten Muskelzellen induzieren kann (Davis-Salinas et al. 1995). Lipoproteine wie auch A β werden von glatten Muskelzellen der Tunica adventitia und der äußeren und mittleren Schichten der Tunica media der genannten Arteriolen über verschiedene Lipoproteinrezeptoren internalisiert (Urmoneit et al. 1997; Prior et al. 2000). Unter noch nicht genau definierten Umständen akkumuliert A β in Lysosomen. Für eine intralysosomale A β Aggregation spricht ferner das saure Milieu der Lysosomen, da A β bei niedrigem pH eine erheblich geringere Löslichkeit aufweist (Burdick et al. 1992), so daß eine lysosomale Akkumulation von A β Ursache der Erstaggregation sein kann. Die Lokalisation von A β in Lysosomen weist zusätzlich darauf hin, daß ein intrazellulärer Abbau von A β stattfindet. Dies steht in Einklang mit den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen, da leptomeningeale Gefäße über einen kurzen Zeitraum eine große Menge frei im Liquor vorliegendes A β aufnehmen, wohingegen inaktivierte Gefäße so gut wie

fibrillärem und nicht fibrillärem A β im Bereich des Extrazellulärraums der Gefäßwand induziert. Dieser Mechanismus fördert im Sinne eines Nukleations-Ereignisses die weitere Deposition von löslichem A β und somit das progressive Wachstum extrazellulärer A β Aggregate und unterhält die Cerebrale Amyloid Angiopathie (CAA).

Mit Hilfe dieses Modells kann auch erklärt werden wie Apolipoprotein E, insbesondere der e4-Genotyp, das Risiko für die Entwicklung der CAA erhöht, was in verschiedenen epidemiologischen Studien bereits nachgewiesen, jedoch nicht erklärt werden konnte (Greenberg et al. 1995; Premkumar et al. 1996; Berg et al. 1998). Apolipoprotein E bindet A β mit hoher Affinität, und fördert die Ausbildung von A β Fibrillen (Strittmatter et al. 1993a; Ma et al. 1994; Naslund et al. 1995). Apolipoprotein E fungiert weiterhin wie oben ausgeführt- als Transportmolekül während der intrazellulären Aufnahme von A β , hat jedoch im Gegensatz dazu keinen wesentlichen Anteil bei der passiven Bindung von A β an bereits bestehende Plaques. In zwei voneinander unabhängigen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß der e4-Genotyp im Vergleich zum e3-Genotyp eine geringere Affinität zu A β aufweist (LaDu et al. 1994; Aleshkov et al. 1997), d.h. der e4-Genotyp könnte aufgrund einer geringeren Affinität zu A β den intrazellulären Abbau der Komplexe dergestalt beeinflussen, daß ein verzögerter Abbau eine verstärkte intrazelluläre A β Anreicherung bedingt. Diese Ergebnisse untermauernd konnten Ji et al. (1998) nachweisen, daß die intrazelluläre Akkumulation vom e4-Genotyp in Fibroblasten und Hepatozyten, aber auch in neuronalen Kulturen (Jordan et al. 1998; Beffert et al. 1999), signifikant geringer ist, verglichen mit dem e3-Genotyp. Diese Beobachtung gilt interessanterweise nur, wenn die Aufnahme von ApoE in Anwesenheit einer Untergruppe der Heparansulfatproteoglykane (HSPG) geschieht, einem wichtigen Bestandteil der Extrazellulärmatrix und gleichzeitig einem wichtigen Ko-Faktor zerebraler und zerebrovaskulärer A β Ablagerungen (Snow et al. 1994, 1995). Daraus folgt, daß eine durch Apolipoprotein E vermittelte A β Clearance durch zerebrovaskuläre glatte Muskelzellen ein physiologisch-protektiver Mechanismus sein könnte, der in einem komplexen Gleichgewicht mit A β Produktion, A β Löslichkeit und A β Clearance steht; eine gestörte A β Clearance würde somit zu dessen extrazellulärer Bindung an HSPG, zur weiteren Deposition und Wachstum von A β Anlagerungen und zur Progression der CAA führen (Prior et al. 2000).

Der potentielle Einfluß von Apolipoprotein E auf die A β Clearance konnte zusätzlich in einem neuen Modell transgener Mäuse verdeutlicht werden, in dem zerebrale A β Ablagerungen in Anwesenheit von humanem ApoE reduziert wurden (Holtzman et al. 1999). Kompatibel mit dem hier entwickelten Modell sind auch quantitative Messungen von Apolipoprotein E und A β im Liquor von Patienten mit CAA, die eine deutliche Konzentrationsabnahme gegenüber Kontrollpatienten aufwiesen (Pirtilla et al. 1996). Diese Konzentrationsminderung im Extrazellulärraum ließe sich somit durch eine vermehrte zerebrale und zerebrovaskuläre zelluläre Aufnahme erklären.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse bestätigen die Hypothese, daß in Liquor cerebrospinalis gelöstes A β erst sekundär in glatte Muskelzellen über den beschriebenen Mechanismus aufgenommen wird. Leptomeningen und isolierte leptomeningeale Gefäße können in vitro im Vergleich zu in vivo Verhältnissen eine vielfach erhöhte Konzentration metabolisieren. Erst bei einer vielfach gesteigerten Aufnahme kommt es zu einer Sättigung der intra- und extrazellulären Bindungsstellen und damit zu einer Initiierung der CAA und/oder einem Ausfall von unlöslichem A β im Hirnparenchym.

Von weiterem Interesse ist daher die Spezifizierung extrazellulärer Moleküle, die eine Anlagerung von A β und konsekutiv ein Plaquewachstum gestatten (Fillit und Leveugle 1995).

Die Extrazellulärmatrix besteht aus HSPG, Kollagen Typ IV und Laminin, wobei Edwards et al. (1992) die zusätzliche Expression von HSPG auf glatten Muskelzellen nachweisen konnten. Snow et al. (1994, 1995) konnten eine Kolokalisation von HSPG und verschiedenen Formen von intrazerebralem und zerebrovaskulärem A β nachweisen, indem durch parallele Infusion von A β und HSPG in Rattengehirnen eine größere Anzahl von Plaques induzierbar waren. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, daß erhöhte Spiegel von A β (1-40) dergestalt mit HSPG reagieren, daß deren durch intrazelluläre Heparanasen gesteuerte physiologische Spaltung gestört wird. Dies könnte eine verstärkte Bindung zwischen A β und HSPG zur Folge haben, die zu vermehrter A β Akkumulation führt (Bame et al. 1997) und konsekutiv zur Progression der CAA.

Die wichtige Rolle der Extrazellulärmatrix als Bindungsstelle für A β wird durch folgende Untersuchungen unterstützt. So beschreiben Watson et al. (1997) daß der Konformationszustand von A β direkte Auswirkungen auf seine Bindung zu dem Glykosaminoglykan Heparin zeigt: liegt A β in fibrillärem Zustand vor, so wird es gebunden, nicht jedoch, wenn es in einer nicht-fibrillären Konformation vorkommt. Desweiteren beobachtete Watson eine stärkere Affinität desjenigen Peptids zur Heparin-

Bindung, welches bei der HCHWA-D verstärkt produziert wird. Dieses A β (1-40) ist durch erhöhte Fibrillogenität charakterisiert. Interessanterweise führt eine Umwandlung des fibrillogeneren Peptids in eine alpha-helikale Konformation zu einer Reversibilität der Heparin-Bindung und betont somit den Einfluß, den die Konformation auf die Bindungsbereitschaft hat.

Andere Untersuchungen beschreiben HSPG als Mediator einer intrazellulären Aufnahme von ApoE enthaltender Lipoproteine in verschiedenen Zelltypen (Mahley et al. 1996; Al-Haideri et al. 1997). Dabei dient ApoE als Ligand für die Aufnahme von Lipoproteinen sowohl auf einem rezeptorabhängigen Weg, als auch auf einem rezeptorunabhängigen, nur durch HSPG vermitteltem Weg. Diese Ergebnisse bestätigen somit, daß A β an ApoE gebunden nicht nur auf rezeptorvermitteltem Weg in glatte Muskelzellen aufgenommen wird (Urmoneit et al. 1997), sondern auf einem durch HSPG gebahnten Weg rezeptorunabhängig Einlaß findet.

Eine solches Modell verbindet den wichtigen Risikofaktor ApoE mit dem ausschlaggebenden Bestandteil der Extrazellulärmatrix, HSPG, und dem zentralen pathomorphologischen Protein A β und dessen Konformationzustand und bemüht sich in dieser Weise um eine Integration verschiedener Forschungsansätze.

Eine wichtige Fragestellung bezieht sich auf den Ursprung des in den Hirngefäßen abgelagerten A β , welches theoretisch luminal aus dem zirkulierenden Blutstrom, abluminal aus dem umgebenden Liquor- oder Extrazellulärraum des Kortex stammen könnte, oder aber in situ durch Freisetzung des von glatten Muskelzellen exprimierten Vorläuferproteins APP entstünde.

Obwohl A β im Serum nachweisbar ist, kommt es niemals zu einer Ablagerung in systemischen Gefäßen, ferner belegt eine Studie von Yamaguchi et al. (1992) daß auch frühe Ablagerungen immer abluminal in den äußeren Schichten der Tunica media liegen, so daß die Hypothese der hämatogenen Aussaat zurückgewiesen werden muß.

Die Hypothese der in situ Produktion mit konsekutiver Deposition von A β hingegen (Wisniewski et al. 1995) vermag nicht zu erklären, weshalb die durch A β hervorgerufene CAA streng auf kortikale und leptomeningeale Gefäße beschränkt ist und sich niemals in strukturell absolut gleich aufgebauten systemischen Gefäßen oder in Gefäßen der weißen Substanz manifestiert. Zudem wird auch die abluminale Lokalisation insbesondere früher Ablagerungen nicht erklärt, da eine in situ Produktion von A β eine homogene Verteilung erwarten läßt. Insgesamt ist es nicht überraschend,

daß glatte Muskelzellen wie auch andere APP exprimierende Zellen geringe Mengen von A β sezernieren.

Im Gegensatz dazu erklärt das hier vorgestellte Modell sowohl die abluminale als auch die primär den Kortex und die weichen Hirnhäute betreffende Lokalisation von A β . Die Ablagerungsorte entsprechen exakt den Regionen, in denen sich die höchsten A β Konzentrationen befinden, da A β ein Produkt des hauptsächlich neuronalen APP Metabolismus ist und daher in Gebieten mit hoher Neuronendichte wie dem Kortex oder dem den Kortex umgebenden Subarachnoidalraum zu finden ist. A β Ablagerungen fehlen deshalb in der weißen Substanz, da hier die Myelinisierung eine Sekretion von A β in den Extrazellulärraum verhindert.

Das hier entwickelte Modell der CAA kann mit Hilfe der in dieser Dissertation beschriebenen Organkultur weiter untersucht werden.

10.6 Schlußfolgerung

Das in dieser Arbeit etablierte Organkulturmodell ist gut geeignet, Grundlagenversuche zur Pathogenese der CAA im Rahmen der AD durchzuführen. Aufgrund seiner die physiologischen Verhältnisse gut abbildenden Struktur kann dieses Modell nicht nur dem weiteren Studium pathogener Vorgänge, sondern auch experimentellen pharmakologischen Interventionen dienlich sein.

Insgesamt verdeutlicht diese Arbeit den präventiven Einfluß, den weiche Hirnhäute auf die Ausbildung intraparenchymaler A β Ablagerungen haben könnten, was noch durch zukünftige Untersuchungen bestätigt werden muß.

Schließlich lassen sich die Befunde dieser Arbeit gut in das hier beschriebene pathogenetische Modell der CAA integrieren.

Literaturverzeichnis

- Aleshkov S, Abraham CR, Zannis VI (1997) Interaction of nascent ApoE2, ApoE3 and ApoE4 isoforms expressed in mammalian cells with amyloid peptide beta (1-42). Relevance to Alzheimer's disease. *Biochemistry* 36: 10571-10580
- Al-Haideri M, Goldberg IJ, Galeano NF, Gleeson A, Vogel T, Gorecki M, Sturley SL, Deckelbaum RJ (1997) Heparan sulfate proteoglycan-mediated uptake of apolipoprotein E-triglyceride-rich lipoprotein particles: a major pathway at physiological particle concentrations. *Biochemistry* 36: 12766-12772
- Alzheimer A (1906) Über einen eigenartigen, schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde. *Neurol Zentralbl* 25:1134
- Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeit Psychiat Gericht Med* 64: 146-148
- Anand R, Gharabawi G (1996) Clinical development of Exelon: The ADENA programme. *J Drug Dev Clin Pract* 8: 9-14
- Bachmann DL, Wolf PA, Linn RT, Knoefel JE, Cobb JL, Belanger AJ, White LR, D'Agostino RB (1993) Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in a general population: the Framingham study. *Neurology* 43: 515-519
- Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ, Piccardo P, Ghetti B, Paul SM (1997) Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet* 17: 263-264
- Bame KJ, Danda J, Hassall A, Tumova S (1997) Abeta(1-40) prevents heparanase-catalyzed degradation of heparan sulfate glycosaminoglycans and proteoglycans in vitro. A role for heparan sulfate proteoglycan turnover in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 272: 17005-17011
- Barger SM, Mattson MP (1997) Isoform specific modulation by apolipoprotein E of the activities of secreted beta amyloid precursor protein. *J Neurochem* 69: 60-67
- Beffert U, Aumont N, Dea D, Lussier-Cacan S, Dovignon I, Poirer J (1999) Apolipoprotein E isoform-specific reduction of extracellular amyloid in neuronal cultures. *Brain Res Mol Brain Res* 68: 181-185
- Berg L, McKeel DJ, Miller JP, Storandt M, Rubin EH, Morris JC, Baty J, Coats M, Norton J, Goate AM, Price JL, Gearing M, Mirra SS, Saunders AM (1998) Clinicopathologic studies in cognitively healthy aging and Alzheimer's disease:

relation of histologic markers to dementia severity, age, sex, and apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol* 55: 326-335

- Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG, Sisodia SS (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A beta 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17: 1005-1013
- Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, Yankner BA (1993) Generation of β -amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2092-2096
- Burdick D, Kosmoski J, Knauer MF, Glabe CG (1997) Preferential adsorption, internalization and resistance to degradation of the major isoform of the Alzheimer's amyloid peptide, A β 1-42, in differentiated PC12 cells. *Brain Res* 746: 275-284.
- Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J, Mullan M (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature* 353: 844-846
- Citron M, Eckman CB, Diehl TS, Corcoran C, Ostaszewski BL, Xia W, Levesque G, St. George Hyslop P, Younkin SG, Selkoe DJ (1998) Additive effects of PS1 and APP mutations on secretion of the 42-residue amyloid β -protein. *Neurobiol Dis* 5: 107-116
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance M (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921-923
- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 7: 180-184
- Craft S, Teri L, Edland SD, Kukull WA, Schellenberg G, McCornick VC, Bowen JD, Larson EB (1998) Accelerated decline in apolipoprotein E e4 homocytotes with Alzheimer's disease. *Neurology* 51: 149-153

- Cruts M, Van BC (1998) Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Hum Mutat* 11: 183-190
- Cummings BJ, Su JH, Cotman CW, White R, Russell MJ (1993) β -amyloid accumulation in aged canine brain: a model of early plaque formation in Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging* 14: 547-560
- Cummings BJ, Cotman CW (1995) Image analysis of β -amyloid load in Alzheimer's disease and relation to dementia severity. *Lancet* 346: 1524-1528
- Cummings BJ, Head E, Ruehl W, Milgram NW, Cotman CW (1996) The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiol Aging* 17: 259-26
- Davis-Salinas J, Saporito-Irwin SM, Cotman CW, Van Nostrand WE (1995) Amyloid β -protein induces its own production in cultured degenerating cerebrovascular smooth muscle cells. *J Neurochem* 65: 931-934
- de la Monte SM (1989) Quantification of cerebral atrophy in preclinical and end-stage Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 25: 450-459
- De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391: 387-390
- Doan A, Thinakaran G, Borchelt DR, Slunt HH, Ratovitsky T, Podlisny M, Selkoe DJ, Seeger M, Gandy SE, Price DL, Sisodia SS (1996) Protein topology of presenilin 1. *Neuron* 17: 1023-1030
- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S (1996) Increased amyloid-beta 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383: 710-713
- Edwards IJ, Wagner WD (1992) Cell surface heparan sulfate proteoglycan and chondroitin sulfate proteoglycan of arterial smooth muscle cells. *Am J Pathol* 140: 193-205
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ (1990) Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248: 1122-1124
- Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Hebert ME, Hennekens CH, Taylor JO (1989) Prevalence of Alzheimer's disease in a

community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* 262: 2551-2556

- Evans DA (1990) Estimated prevalence of Alzheimer's disease in the United States. *Milbank Q* 68: 267-289
- Fillit H, Leveugle B (1995) Disorders of the extracellular matrix and the pathogenesis of senile dementia of the Alzheimer's type. *Lab Invest* 72: 249-253
- Fox NC, Freeborough PA, Rossor MN (1996) Visualisation and quantification of rates of atrophy in Alzheimer's disease. *Lancet* 348: 94-97
- Fox NC, Scahill RJ, Crum WR, Rossor MN (1999) Correlation between rates of brain atrophy and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neurology* 52: 1687-1689
- Frackowiak J, Mazur-Kolecka B, Wisniewski HM, Potempska A, Carroll RT, Emmerling MR, Kim KS (1995) Secretion and Accumulation of Alzheimer's β -protein by cultured smooth muscle cells from old and young dogs. *Brain Res* 676: 225-230
- Frölich L, Pieschl D, Maurer K (1997) Die historische Entwicklung des Krankheitskonzeptes Demenz vom Alzheimer Typ. *Nervenheilkunde* 16: 19-24
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson -Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConlogie L, Montoya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717 beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373: 523-527
- Giaccone G, Verga L, Finazzi M, Pollo B, Tagliavini F, Frangione B, Bugiani O (1990) Cerebral preamyloid deposits and congophilic angiopathy in aged dogs. *Neurosci Lett* 114: 178-183
- Glenner GG, Henry JH, Fujihara S (1981) Congophilic angiopathy in the pathogenesis of Alzheimer's degeneration. *Ann Pathol* 1: 120-129
- Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120: 885-890

- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan MC, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349: 704-706
- Greenberg SM, Rebeck GW, Vonsattel JPG, Gomez-Isla T, Hyman BT (1995) Apolipoprotein E e4 and cerebral hemorrhage associated with amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 38: 254-259
- Haass C, Hung AY, Selkoe DJ (1991) Processing of β -Amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localisation over constitutive secretion. *J Neurosci* 11: 3783-3793
- Haass C and Selkoe DJ (1993) Cellular Processing of β -Amyloid Precursor Protein and the Genesis of Amyloid β -Peptide. *Cell* 75: 1039-1042
- Haass C, Hung AY, Selkoe DJ, Teplow DB (1994) Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's Disease result in alternative processing of amyloid β -protein precursor. *J Biol Chem* 269: 17741-17748
- Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L, Selkoe DJ (1995) The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by β -secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature Medicine* 1: 1291-1296
- Haass C, Cazorla P, Miguel CD, Valdivieso F, Vazquez J (1997) Apolipoprotein E forms stable complexes with recombinant Alzheimer's disease beta-amyloid precursor protein. *Biochem J* 325: 169-175
- Haass C and Selkoe DJ (1998) A technical KO of amyloid- β peptide. *Nature* 391: 339-340
- Hahne S, Nordstedt C, Ahlin A, Nyback H (1997) Levels of cerebrospinal fluid apolipoprotein E in patients with Alzheimer's disease and healthy controls. *Neurosci Lett* 224: 99-102
- Hamano T, Yoshimura M, Yamazaki T, Shinkai Y, Yanagisawa K, Kuriyama M, Ihara Y (1997) Amyloid beta-protein (A β) accumulation in the leptomeninges during aging and in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 922-932
- Hardy J (1997a) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 20: 154-159
- Hardy J (1997b) The Alzheimer family of diseases: Many etiologies, one pathogenesis? *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2095-2097

- Harper JD, Lansbury PT (1997) Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem* 66: 385-407
- Holtzman DM, Bales KR, Wu S, Bhat P, Parsadanian M, Fagan AM, Chang LK, Sun Y, Paul SM (1999) Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-beta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 103: R15-R21
- Igeta Y, Kawarabayashi T, Sato M, Yamada N, Matsubara E, Ishiguro K, Kanai M, Tomidokoro Y, Osuga J, Okamoto K, Hirai S, Shoji M (1997) Apolipoprotein E accumulates with the progression of A beta deposition in transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 1228-1235
- Ikura K, Takahata K, Shinagawa R, Masuda S, Sasaki R (1997) In vitro neurotoxicity of amyloid beta peptide cross linked by transglutaminase. *Cytotech* 23: 77-85
- Ishihara T, Gondo T, Takahashi M, Uchino F, Ikeda SI, Allsop D, Imai K (1991) Immunohistochemical and immunoelectron microscopical characterisation of cerebrovascular and senile plaque amyloid in aged dogs' brains. *Brain Res* 548: 196-205
- Itoh Y, Yamada M, Hayakawa M, Otomo E, Miyatake T (1993) Cerebral amyloid angiopathy: a significant cause of cerebellar as well as lobar cerebral hemorrhage in the elderly. *J Neurol Sci* 116: 135-141
- Jack CR, Petersen RC, Xu Y, O'Brian PC, Smith GE, Ivnik RI, Tangalos EG, Kokmen E (1998) Rate of medial temporal lobe atrophy in typical aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 51: 993-999
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PJ (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32: 4693-4697
- Jen LS, Hart AJ, Jen A, Relvas JB, Gentleman SM, Garey LJ, Patel AJ (1998) Alzheimer's peptide kills cells of retina in vivo. *Nature* 392: 140-141
- Ji ZS, Pitas RE, Mahley RW (1998) Differential cellular accumulation/retention of apolipoprotein E mediated by cell surface heparan sulfate proteoglycans. Apolipoproteins E3 and E2 greater than E4. *J Biol Chem* 273: 13452-13460

- Joachim CL, Morris JH, Selkoe DJ (1988) Clinically diagnosed Alzheimer's disease: Autopsy results in 150 cases. *Ann Neurol* 24: 50-56
- Johnstone EM, Chaney MO, Norris FH, Pascual R, Little SP (1991) Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear, and five other mammals by cross-species PCR analysis. *Brain Res* 10: 299-305
- Jordan J, Galindo MF, Miller RJ, Reardon CA, Getz GS, LaDu MJ (1998) Isoform-specific effect of apolipoprotein E on cell survival and beta-amyloid-induced toxicity in rat hippocampal pyramidal neuronal cultures. *J Neurosci* 18: 195-204
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor. *Nature* 325: 733-736
- Kang DE, Saitoh T, Chen X, Xia Y, Masliah E, Hansen LA, Thomas RG, Thal LJ, Katzman R (1997) Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 49: 56-61
- Kawai M, Cras P, Richey P, Tabaton M, Lowery DE, Gonzalez-DeWhitt PA, Greenberg BD, Gambetti P, Perry G (1992) Subcellular Localisation of Amyloid Precursor Protein in Senile Plaques of Alzheimer's Disease. *Am J Pathol* 140: 947-958
- Kawai M, Kaloria RN, Cras P, Siedlak SL, Velasco ME, Shelton ER, Chan HW, Greenberg BD, Perry G (1993) Degeneration of vascular muscle cells in cerebral amyloid angiopathy of Alzheimer disease. *Brain Res* 623: 142-146
- Kosaka T, Imagawa M, Seki K, Arai H, Sasaki H, Tsuji S, Asamiodaka A, Fukushima T, Imai K, Iwatsubo T (1997) The beta APP 717 Alzheimer Mutation increases the percentage of plasma amyloid beta protein ending at A beta 42(43). *Neurology* 48: 741-745
- Koudinov AR, Berezov TT, Kumar A, Koudinova AV (1998) Alzheimer's amyloid beta interaction with normal human plasma high density lipoprotein: association with apolipoprotein and lipids. *Clin Chim Acta* 270: 75-84
- Kraepelin E (Hrsg.) In *Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. 533-554 u. 593-632 Barth, Leipzig 1910

- LaDu MJ, Falduto MT, Manelli AM, Reardon CA, Getz GS, Frail DE (1994) Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J Biol Chem* 269: 23403-23406
- Lee MK, Slunt HH, Martin LJ, Thinakaran G, Kim G, Gandy SE, Seeger M, Koo E, Price DL, Sisodia SS (1996) Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *J Neurosci* 16: 7513-7525
- Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GTAM, Luyendijk W, Frangione B (1990) Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch-type. *Science* 248: 1124-6
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, Crowley AC, Fu YH, Guenette SY, Galas D, Nemens E, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD, Tanzi RE (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's Disease Locus. *Science* 269: 973-977
- Ma J, Yee A, Brewer HJ, Das S, Potter H (1994) Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer β -protein into filaments. *Nature* 372: 92-94
- Mahley RW (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240: 622-630
- Mann DMA. The pathological association between Down syndrome and Alzheimer disease (1988) *Mech Ageing Dev* 443: 99-136
- Mann DM (1991) The topographic distribution of brain atrophy in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 83: 81-86
- Mann DMA, Iwatsubo T, Ihara Y, Cairns NJ, Lantos PL, Bogdanovich N, Lannfelt L, Winblad B, Maat-Schiemann MLC, Rossor MN (1996) Predominant Deposition of Amyloid- β 42 (43) in Plaques in Cases of Alzheimer's Disease and Hereditary Cerebral Hemorrhage Associated with Mutations in the Amyloid Precursor Protein Gene. *AM J Pathol* 148: 1257-1266
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4245-4249

- Maury CPJ (1995) Molecular pathogenesis of β -amyloidosis in Alzheimer's Disease and other cerebral amyloidoses. *Lab Invest* 72: 4-14
- McLaurin J, Chakrabartty A (1996) Membrane disruption by Alzheimer beta-amyloid peptides mediated through specific binding to either phospholipids or gangliosides. Implications for neurotoxicity. *J Biol Chem* 271: 26482-26489
- McLaurin J, Chakrabartty A (1997) Characterisations of the interactions of Alzheimer beta amyloid peptides with phospholipid membranes. *Eur J Biochem* 245: 355-363
- Mehta ND, Refolo LM, Eckman C, Sanders S, Yager D, Perez-Tur J, Younkin S, Duff K, Hardy J, Hutton M (1998) Increased A β 42(43) from cell lines expressing presenilin 1 mutations. *Ann Neurol* 43: 256-258
- Mullan M, Crawford F (1993) Genetic and molecular advances in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 16: 398-403
- Naslund J, Thyberg J, Tjernberg LO, Wernstedt C, Karlstrom AR, Bogdanovic N, Gandy SE, Lannfelt L, Terenius L, Nordstedt C (1995) Characterization of stable complexes involving apolipoprotein E and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease brain. *Neuron* 15: 219-228
- Nicoll JA, Burnett C, Love S, Graham DI, Dewar D, Ironside JW, Stewart J, Vinters HV (1997) High frequency of apolipoprotein E epsilon 2 allele in hemorrhage due to cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 41: 716-721
- Olichney JM, Hansen LA, Hofstetter CR, Grundmann M, Katzman R, Thal LJ (1995) Cerebral Infarction in Alzheimer's Disease is associated with severe Amyloid Angiopathy and Hypertension. *Arch Neurol* 52: 702-708
- Okuda R, Uchida K, Tateyama S, Yamaguchi R, Nakayama H, Goto N (1994) The distribution of amyloid beta precursor protein in canine brain. *Acta Neuropathol* 87: 161-167
- Pantelakis S (1954) Un type particulier d'angiopathie senile du systeme nerveux central: L'angiopathie congophile. Topographie et frequence. *Monatsschr Psychiatr Neurol* 128: 219-256
- Perlmutter LS, Chui HC (1990) Microangiopathy, the Vascular Basement Membrane and Alzheimer's Disease: A Review. *Brain Res Bull* 24: 677-686

- Perlmutter LS, Barron E, Saperia D, Chui HC (1991) Association between vascular basement membrane components and the lesions of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 30: 673-681
- Perlmutter LS, Myers MA, Barron E (1994) Vascular basement membrane components and the lesions of Alzheimer's disease: light and electron microscopic analyses. *Microsc Res Tech* 28: 204-215
- Pirttila T, Mehta PD, Soininen H, Kim KS, Heinonen O, Paljarvi L, Kosunen O, Riekkinen P, Wisniewski HM (1996) Cerebrospinal fluid concentrations of soluble amyloid β -protein and apolipoprotein E in patients with Alzheimer's Disease. *Arch Neurol* 53: 189-193
- Premkumar DR, Cohen DL, Hedera P, Friedland RP, Kalaria RN (1996) Apolipoprotein E-epsilon4 alleles in cerebral amyloid angiopathy and cerebrovascular pathology associated with Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 148: 2083-2095
- Prior R, D'Urso D, Frank R, Prikulis I, Pavlakovic G (1995) Experimental deposition of Alzheimer amyloid β -protein in canine leptomeningeal vessels. *Neuroreport* 6: 1747-1751
- Prior R, D'Urso D, Frank R, Prikulis I, Wihl G, Pavlakovic G (1996a) Canine leptomeningeal organ culture: a new experimental model for cerebrovascular β -amyloidosis. *J Neurosci Methods* 68: 143-148
- Prior R, D'Urso D, Frank R, Prikulis I, Pavlakovic G (1996b) Loss of vessel wall viability in cerebral amyloid angiopathy. *Neuroreport* 7: 562-564
- Prior R, Wihl G, Urmoneit B (2000) Apolipoprotein E, Smooth Muscle Cells and the Pathogenesis of Cerebral Amyloid Angiopathy. *Ann N Y Acad Sci* 903: 180-186
- Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT (1993) Apolipoprotein E in Sporadic Alzheimer's Disease: Allelic Variation and Receptor Interactions. *Neuron* 11: 575-580-51
- Rice DP, Fox PJ, Max W, Webber PA, Lindemann DA, Hauck WW, Segura E (1993) The economic burden of Alzheimer's disease care. *Health Aff* 12: 164-176
- Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, Mohs R, Friedhoff LT (1998) A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology* 50: 136-145

- Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Woods AS, Cotter RJ, Gowing E, Ball MJ (1993) β -Amyloid (1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: Implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10836-10840
- Roses AD (1994) Apolipoprotein affects the rate of Alzheimer disease expression: β -amyloid burden is a secondary consequence dependent on APO E genotype and duration of disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 53: 429-437
- Roses AD (1996) Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 47: 387-400
- Ross RA, Spengler BA, Biedler JL (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 71: 741-747
- Rumble B, Retallak R, Hilbich C, Simms G, Multhaup G, Martins R, Hockey A, Montgomery P, Beyreuther K, Masters CL (1989) Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 320: 1446-1452
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43: 1467-1472
- Saunders AM, Hulette C, Welsh-Bohmer KA, Schmechel DE, Crain B, Burke JR, Alberts MJ, Strittmatter WJ, Breitner JCS, Rosenberg PO, Scott SV, Gaskell PC jr., Pericak-Vance MA, Roses AD (1996) Specificity, sensitivity, and predictive value of apolipoprotein-E genotyping for sporadic Alzheimer's disease. *Lancet* 348: 90-94
- Scheltens P, Weinstein HC, Leys D (1992a) Neuro-Imaging in the diagnosis of Alzheimer's Disease. *Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging. Clin Neurol and Neurosurg* 94: 277-289
- Scheltens P, Leys D, Barkhof F, Huglo D, Weinstein HC, Vermersch P, Kuiper M, Steinling M, Wolters EC, Valk J (1992b) Atrophy of medial temporal lobes on MRI in „probable“ Alzheimer's disease and normal ageing: diagnostic value and neuropsychological correlates. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55: 967-972

- Scheltens P, Leys D, Barkhof F, Vermersch P, Steinling M, Weinstein HC, Pruvo JP, Petit H (1994) Contribution of morphological imaging in the diagnoses of dementia. *Alzheimer disease. Rev Med Interne* 15: 415-422
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S (1996) Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2: 864-870
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak VM, Goldgaber D, Roses AD (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9649-9653
- Selkoe DJ (1994) Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J Neuropathol Exp Neurol* 53: 438-447
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin J-F, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HAR, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, ST George-Hyslop PH (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375: 754-760
- Shimada A, Kuwamura M, Awakura T, et al. (1992) Topographic relationship between senile plaques and cerebrovascular amyloidosis in the brain of aged dogs. *J Vet Med Sci* 54: 137-144
- Shinkai Y, Yoshimura M, Ito Y, Odaka A, Suzuki N, Yanagisawa K, Ihara Y (1995) Amyloid β -Proteins 1-40 and 1-42 (43) in the Soluble Fraction of Extra-and Intracranial Blood Vessels. *Ann Neurol* 38: 421-428
- Shinkai Y, Yoshimura M, Morishima-Kawashima M, Ito Y, Shimada H, Yanagisawa K, Ihara Y (1997) Amyloid beta-protein deposition in the leptomeninges and cerebral cortex. *Ann Neurol* 42: 899-908

- Shoji M, Hirai S, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Yamaguchi H (1990) The amyloid β -protein precursor is localized in smooth muscle cells of leptomeningeal vessels. *Brain Res* 530: 113-116
- Sisodia SS, Price DL (1995) Role of the β -amyloid protein in Alzheimer's disease. *FASEB J* 9: 366-370-54
- Skoog I, Hesse C, Fredman P, Anreasson LA, Palmertz B, Blennow K (1997) Apolipoprotein E in cerebrospinal fluid in 85-year-old subjects. Relation to dementia, apolipoprotein E polymorphism, cerebral atrophy, and white matter lesions. *Arch Neurol* 54: 267-272
- Snow AD, Sekiguchi RT, Nochlin D, Fraser P, Kimata K, Mitsutani A, Arai M, Schreier WA, Morgan DG (1994) An important role of heparan sulfate proteoglycan (Perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar A β -amyloid in rat brain. *Neuron* 1994, 12, 219-234
- Snow AD, Kinsella MG, Parks E, Sekiguchi RT, Miller JD, Kimata K, Wight TN (1995) Differential binding of vascular cell-derived proteoglycans (perlecan, biglycan, decorin, and versican) to the beta-amyloid protein of Alzheimer's Disease. *Arch Biochem Biophys* 320: 84-95
- St. George-Hyslop PH, Haines J, Rogaev E, Mortilla M, Vaula G, Pericak-Vance M, Foncin JF, Montesi M, Bruni A, Sorbi S (1992) Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Nat Genet* 2: 330-334
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993a) Apolipoprotein E: high-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1977-1981
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong L-M, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD (1993b) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid β peptide: Isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8098-8102
- Strittmatter WJ, Roses AD (1995) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4725-4727
- Strittmatter WJ, Roses AD (1996) Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci* 19: 53-77

- Tagliavini F, Ghiso J, Timmers WF, Giaccone G, Bugiani O, Frangione B (1990) Coexistence of Alzheimer's amyloid precursor protein and amyloid protein in cerebral vessel walls. *Lab Invest* 62: 761-767
- Takashima (1997) Down syndrome. *Curr Opin Neurol* 10:148-152
- Tamaoka A, Kalaria RN, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Identification of a stable fragment of the Alzheimer amyloid precursor containing the β -protein in brain microvessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1345-1349
- Tamaoka A, Kondo T, Odaka A, Sahara N, Sawamura N, Ozawa K, Suzuki N, Shoji S, Mori H (1994) Biochemical evidence for the long-tail form (A β 1-42/43) of amyloid β protein as a seed molecule in cerebral deposits of Alzheimer's Disease. *Biochem Biophys Res Commun* 355: 834-842
- Tanzi RE, Kovacs DM, Kim TW, Moir RD, Guenette SY, Wasco W (1996) The Gene defects responsible for familial Alzheimer's Disease. *Neurobiol Dis* 3: 159-168
- Teller JK, Russo C, DeBusk LM, Angelini G, Zaccheo D, Dagna-Bricarelli F, Scartezzini P, Bertolini S, Mann DMA, Tabaton M, Gambetti P (1996) Presence of soluble amyloid β -peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome. *Nature Medicine* 2: 93-95
- Terry RD (1996) The Pathogenesis of Alzheimer Disease: An alternative to the amyloid hypothesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 1023-1025
- Tokuda T, Fukushima T, Ikeda S, Sekijima Y, Shoji S, Yanagisawa N, Tamaoka A (1997) Plasma levels of amyloid beta proteins A beta 1-40 and A beta 1-42(43) are elevated in Down's syndrome. *Ann Neurol* 41: 271-273
- Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Kume H, Shinozaki K, Tokuhiko S, Calell A, Walter J, Grunberg J, Haass C, Iwatsubo T, Obata K (1997) The Presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2025-2030
- Treves TA, Bornstein NM, Chapman J, Klimovitzki S, Verchovsky R, Asherov A, Korczyn AD (1996) APOE-epsilon 4 in patients with Alzheimer disease and vascular dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 10: 189-191

- Uchida K, Okuda R, Yamaguchi R, Tateyama S, Nakayama H, Goto N (1993) Double-labeling immunohistochemical studies on canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. *J Vet Med Sci* 55: 637-642
- Urmoneit B, Prikulis I, Wihl G, D'Urso D, Frank R, Heeren J, Beisiegel U, Prior R (1997) Cerebrovascular smooth muscle cells internalize Alzheimer amyloid beta protein via a lipoprotein pathway: implications for cerebral amyloid angiopathy. *Lab Invest* 77: 157-166
- Van Nostrand WE, Davis-Salinas J, Saporito-Irwin SM (1996) Amyloid beta-protein induces the cerebrovascular cellular pathology of Alzheimer's disease and related disorders. *Ann N Y Acad Sci* 777: 297-302
- Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberburg I, Schenk DB (1993) Characterisation of β -amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J Neurochem* 61: 1965-1968
- Vinters HV (1992) Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease: two entities or one? *J Neurol Sci* 112: 1-3
- Vinters HV, Wang ZZ, Secor DL (1996) Brain parenchymal and microvascular amyloid in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 6: 179-193
- Vonsattel JP, Myers RH, Hedley-Whyte ET, Ropper AH, Bird ED, Richardson EP jr. (1991) Cerebral amyloid angiopathy with and without cerebral hemorrhages: a comparative histological study. *Ann Neurol* 30: 637-649
- Walter J, Capell A, Hung AY, Langen H, Schnölzer M, Thinakaran G, Sisodia SS, Selkoe DJ, Haass C (1997) Ectodomain phosphorylation of β -amyloid precursor protein at two distinct cellular locations. *J Biol Chem* 272: 1896-1903
- Watson DJ, Lander AD, Selkoe DJ (1997) Heparin-binding properties of the amyloidogenic peptides Abeta and amylin. Dependence on aggregation state and inhibition by Congo red. *J Biol Chem* 272: 31617-31624
- Wegiel J, Wisniewski HM, Dziwiatkowski J, Tarnawski M, Nowakowski J, Dziwiatkowska A, Soltysiak Z (1995) The origin of amyloid in cerebral vessels of aged dogs. *Brain Res* 705: 225-234
- Weidemann A, Konig G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K (1989) Identification, biogenesis and localisation of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57: 115-126

- Weidemann A, Paliga K, Durrwang U, Czech C, Evin G, Masters CL, Beyreuther K (1997) Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease products: presenilin 2 and β -amyloid precursor protein. *Nature Med* 3: 328-332
- Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA (1988) Structural characterisation of the core of the paired helical filaments of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4884-4888
- Wisniewski HM, Wegiel J, Wang KC, Lach B (1992) Ultrastructural studies of the cells forming amyloid in the cortical vessel wall in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 84: 117-127
- Wisniewski HM, Wegiel J (1994) β -Amyloid formation by myocytes of leptomeningeal vessels. *Acta Neuropathol* 87: 233-241
- Wisniewski HM, Frackowiak J, Zoltowska A, Kim KS (1994) Vascular β -amyloid in Alzheimer's disease angiopathy is produced by proliferating and degenerating smooth muscle cells. *Int J Exp Clin Invest* 1: 8-16
- Wisniewski HM, Frackowiak J, Mazur-Kolecka B (1995) In vitro production of β -amyloid in smooth muscle cells isolated from amyloid angiopathy-affected vessels. *Neurosci Lett* 183: 120-123
- Wisniewski KE, Dalton AJ, McLachlan C, Wen GY, Wisniewski HM (1985) Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies. *Neurology* 35: 957-961
- Wisniewski T, Golabek A, Matsubara E, Ghiso J, Frangione B (1993) Apolipoprotein E: binding to soluble Alzheimer's β -amyloid. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 359-365
- Wong CW, Quaranta V, Glenner GG (1985) Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer disease are antigenetically related. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8729-8732
- Yamada M, Itoh Y, Otomo E, Hayakawa M, Miyatake T (1993) Subarachnoid haemorrhage in the elderly: a necropsy study of the association with cerebral amyloid angiopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56: 543-547
- Yamaguchi H, Yamazaki T, Lemere CA, Frosch MP, Selkoe DJ (1992) Beta amyloid is focally deposited within the outer basement membrane in the amyloid angiopathy of Alzheimer's disease: An immunoelectron microscopic study. *Am J Pathol* 141: 249-259

- Zlokovic BV, Ghiso J, Mackic JB, McComb JG, Weiss MH, Frangione B (1993) Blood-brain barrier transport of circulating Alzheimer's amyloid beta. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 1034-40

Abkürzungsverzeichnis

A β	β -Amyloid-Peptid
AD	Alzheimer Demenz
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor Protein
B-A β	biotiniliertes A β
CAA	Cerebrale Amyloid Angiopathie
DAT	Demenz vom Alzheimer Typ, entspricht der Alzheimer Demenz
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FAD	Familiäre Alzheimer Demenz
HCHWA-D	Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, Dutch type
HDL	High density lipoproteins
HSPG	Heparansulfat Proteoglykane
PS	Presenilin
VLDL	Very low density lipoproteins

Danksagung

Ich danke sehr herzlich Herrn Prof. Dr. H.-J. Freund, in dessen Institut ich meiner Promotionsarbeit und weiteren wissenschaftlichen Tätigkeiten nachgehen konnte und weiterhin kann.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Dr. Reinhard Prior, für die fachliche Betreuung und Hilfestellung der letzten Jahre. Weiterhin danke ich Frau Ingrid Prikulis für ein stets offenes Ohr bei alltäglichen Schwierigkeiten und tatkräftige Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben und deren großzügige Unterstützung und Zusprache mir stets zugute kam.

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Günther Edgar Wihl
Geburtsdatum: 17.06.1971
Geburtsort: Düsseldorf

Schulausbildung:

1981- 1990
5/1990
Städtisches Mataré Gymnasium,
Meerbusch-Büderich
Abitur

Zivildienst:

1990- 1991
Johanniter-Unfallhilfe, Düsseldorf
Rettungssanitäter

Studium

1991- 1997
Studium der Humanmedizin,
Heinrich-Heine-Universität,
Düsseldorf

1997-1998
Praktisches Jahr

Drittes Tertial:
National Hospital for Nervous
Diseases, Queen Square,
London, Großbritannien

Berufliche Tätigkeit

1/1999- 6/2000
Arzt im Praktikum
Neurologische Klinik der Heinrich-
Heine-Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. H.-J. Freund)

seit 7/2000
Assistent der Neurologischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität

Günther Edgar Wihl
Im Sommer 2000

Leptomeningeale Organkulturen als experimentelles Modell der Cerebralen Amyloid Angiopathie (Abstract zur Dissertation von Günther Edgar Wihl)

Die intrazerebrale Ablagerung von A β ist zentrales morphologisches und pathogenetisches Element der Alzheimer Demenz (AD). In über 80% der Fälle ist die AD mit der Cerebralen Amyloid Angiopathie (CAA) assoziiert, in deren Verlauf es zu vaskulären A β Ablagerungen kommt. Da der Ausfall von unlöslichem A β auch von der Konzentration der in Liquor cerebrospinalis zirkulierenden löslichen Peptidform abhängt, erscheint eine effiziente Clearance des löslichen A β aus Liquor cerebrospinalis als eine Möglichkeit, dem intraparenchymalen Ausfall von A β entgegenzuwirken. Da der Cortex cerebri vollständig von den aus Pia mater und Arachnoidea bestehenden weichen Hirnhäuten (Leptomeningen) umgeben ist, die wiederum von Liquor cerebrospinalis umflossen werden, wurde die Fähigkeit leptomeningealen Gewebes untersucht, verschiedene Formen löslichen A β aufzunehmen.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte zunächst ein Organkulturmodell etabliert werden, welches die physiologischen Gegebenheiten simuliert und anhand dessen die Pathogenese der CAA unter definierten Bedingungen studiert werden kann.

Nach Etablierung von Organkulturen lebender Leptomeningen vom Hund sowohl in Kulturmedium als auch in humanem Liquor cerebrospinalis, wurden sowohl leptomeningeales Gewebe als auch Abschnitte daraus isolierter Gefäße mit synthetisch hergestelltem A β (A β 1-40 und A β 1-42) über 72 Stunden inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben aus dem die Gewebe umgebenden Medium entnommen und mittels eines „Sandwich“-ELISA-Tests quantifiziert.

Als Ergebnis ist eine progressive Abnahme der A β Anfangskonzentration von 1 μ M sowohl aufgrund der Clearance leptomeningealen Gewebes in toto als auch von leptomeningealen Gefäßen allein zu beobachten. Dies zeigte sich für beide untersuchten Formen von A β und trifft für die Inkubation in Kulturmedium und Liquor cerebrospinalis gleichermaßen zu. Insgesamt wurde das pathogenere A β (1-42) in einem größeren Umfang aufgenommen als A β (1-40). Weiche Hirnhäute zeigen über einen Zeitraum von 72 Stunden eine Konzentrationsreduktion um 970nM A β (1-42) aus Kulturmedium und Liquor cerebrospinalis, während isolierte Gefäße in derselben Zeitspanne eine Konzentrationsreduktion um 900nM A β (1-42) in Kulturmedium, und eine Konzentrationsabnahme von maximal 850nM A β (1-42) in Liquor cerebrospinalis demonstrierten. Die Ergebnisse für A β (1-40) sind vergleichbar, aber niedriger.

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse, daß Organkulturen von Hunde-Leptomeningen als experimentelles Modell der CAA eingesetzt werden können und daß sich die mit Hilfe dieses Modells erzielten Befunde mit einem in der Arbeit im Detail beschriebenen Modell zur Pathogenese der CAA vereinbaren lassen.