

**MODULATION DER NEUTRALEN ENDOPEPTIDASE
IM HUMANEN ZELLKULTURSYSTEM DURCH
PFLANZLICHE DROGENEXTRAKTE
UND NATURSTOFFE**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der
Freien Universität Berlin

Vorlegt von
SHEREEN AYOUB
aus Palästina

Berlin 2007

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. H. Hubert Borchert**

Disputation am: 05.02.2007

Kurzfassung (deutsch)

Die Neutrale Endopeptidase (Neprilysin, EC 3.4.24.11, NEP) ist eine Metallopeptidase, die ein großes Substratspektrum hat. Ein Einfluss der NEP auf verschiedene pathologische Vorgänge oder Krankheiten wie Bluthochdruck, Adipositas, krankhafte Prostataveränderungen oder Alzheimer-Demenz (AD) ist bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Zusammenhang zwischen der NEP und der Alzheimer-Krankheit beschrieben. Weiterhin wurden die Effekte von ausgewählten Arzneipflanzenextrakten wie Grüntee-Extrakt und seinen Inhaltsstoffen, Ginkgo-biloba-Extrakt und seinen Inhaltsstoffen, Flavonoiden und anderen ausgewählten Naturstoffen auf die Aktivität der NEP in Zellen der SK-N-SH-Zelllinie, einer humanen Neuroblastomazelllinie, untersucht. Im Anschluss wurden die Wirkungsmechanismen, die diesen Effekten zu Grunde liegen könnten, betrachtet. Die Erhöhung der NEP-Aktivität durch verschiedene ausgewählte Testsubstanzen könnte für die Behandlung der AD durch den Abbau von β -Amyloid-Peptidn ($A\beta$), welche für die AD charakteristisch sind, interessant sein. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Induktion der NEP-Aktivität auf dem Verhältnis zwischen Zelldifferenzierung und Zellproliferation sowie zusätzlich auf der Erhöhung der Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in SK-N-SH-Zellen beruht. Zusätzlich sollten in der Arbeit die Einflüsse von ausgewählten Naturstoffen, welche die Aktivität der NEP erhöhten, auf das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE, EC 3.4.15.1) untersucht werden, um die Spezifität dieser Naturstoffe bezüglich ihrer Wirkungen auf die NEP zu prüfen. Auch ACE kann $A\beta$ abbauen und die Ablagerung von $A\beta$ hemmen. Trotz der großen strukturellen Ähnlichkeit beider Enzyme zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass manche Testsubstanzen nur die NEP-Aktivität erhöhten ohne die ACE-Aktivität zu beeinflussen. Weiterhin wurde die von den Zellen produzierte und ins Medium sezernierte Menge $A\beta_{1-42}$ wie auch die cAMP-Konzentration nach der Behandlung der Zellen mit den ausgewählten Testsubstanzen, die die NEP-Aktivität erhöhten, beobachtet. Die Untersuchungen der cAMP-Bildung durch die ausgewählten Substanzen lieferten Ansatzpunkte für die Beziehung zwischen der Erhöhung der NEP-Aktivität und der Erhöhung von cAMP in SK-N-SH-Zellen. Die Induktion der NEP- und der ACE-Aktivität führte zur Hemmung von $A\beta_{1-42}$. Es konnte festgestellt werden, dass die Induktion sowohl der NEP- als auch der ACE-Aktivität und die damit verbundene Zunahme des Abbaus von $A\beta$ einen vielversprechenden neuartigen Ansatz zur Behandlung und/oder zur Prävention der Alzheimer-Krankheit darstellen könnte.

Abstract (english)

The neutral endopeptidase (neprilysin, EC 3.4.24.11, NEP), as a metallopeptidase with a large substrate spectrum, affects different pathological processes or diseases such as hypertonia, Alzheimer's disease, adiposity or pathologic changes of the prostate. In this work, the relation of NEP to Alzheimer's disease was examined in details. Furthermore, the effects of selected natural products such as green tea extract and its constituents, Ginkgo biloba extract and its constituents, flavonoids and other selected natural substances on the specific cellular activity of NEP using the human neuroblastoma cell line SK-N-SH were examined. Also the possible responsible mechanisms for these pharmacological effects were investigated. The increase of the specific cellular activity of NEP by different selected test substances could be interesting for the treatment of Alzheimer's disease by increasing β -amyloid ($A\beta$) clearance. The results of this work show that the induction of the specific NEP activity depends on the differentiation improvement as well as on the increasing of the concentration of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in SK-N-SH cells. Moreover, the consequences of using selected natural substances, which increased the specific activity of NEP, were examined on the angiotensin-converting enzyme (ACE, EC 3.4.15.1) in order to observe the specificity of these substances for the NEP. ACE plays a role in $A\beta$ degradation and prevents its deposition in the brain. In spite of the large structural similarity of both NEP and ACE enzymes, the results of this work show that many test substances increase only the specific NEP activity without affecting the specific ACE activity. Within this work the effects of the increasing of the specific NEP activity after treating the cells with some selected test substances were observed on the amount of endogenously produced and in medium secreted $A\beta_{1-42}$ as well as on the concentration of intracellular cAMP. The results of these investigations build a strong base for the relation between the increase of the specific NEP activity and the increase of intracellular cAMP in SK-N-SH cells. The induction of the specific cellular NEP- and ACE-activity leads to the inhibition of $A\beta_{1-42}$ accumulation. In conclusion, the induction of both NEP- and ACE-activity and the associated increase of the $A\beta$ destruction could be a promising novel estimation for the treatment and/or the prevention of Alzheimer's disease.

1	 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNGEN	1
1.1	 Alzheimer-Demenz	1
1.1.1	Definition, Häufigkeit, Symptome und Warnzeichen	1
1.1.2	Pathogenese	3
1.1.3	Ursachen und Risikofaktoren	7
1.1.4	Therapie	14
1.2	 Neutrale Endopeptidase und Abbau von Amyloid-Plaques	24
1.2.1	Definition, Funktion und physiologische Bedeutung der NEP	26
1.2.2	Abbau von Amyloid-Plaques	30
1.2.3	Bedeutung der NEP für den Abbau der Amyloid-Plaques	31
1.3	 Ziele der Arbeit	33
2	 MATERIAL UND METHODEN	34
2.1	 Allgemeine Hinweise	34
2.2	 Geräte	34
2.2.1	Zellkultur	34
2.2.2	Sonstige Geräte	34
2.3	 Verbrauchsmaterialien	35
2.3.1	Untersuchungsmaterialien	35
2.3.2	Zellkultur	35
2.3.3	Chemikalien	37
2.3.4	Puffer und weitere Lösungen	38
2.4	 Zellbiologische Methoden	39
2.4.1	Kultivieren und Passagieren von SK-N-SH Zellen	39
2.4.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	39
2.5	 Methoden der Enzymbestimmungen	40
2.5.1	Bestimmung der Aktivität der NEP	40
2.5.1.1.	Aufnahme einer Kalibriergeraden für 7-Amino-4-methylcumarin	40
2.5.1.2.	NEP-Bestimmung im Akutversuch	41
2.5.1.3.	NEP-Bestimmung im Langzeitversuch	42
2.5.2	Bestimmung der Aktivität des ACE	42
2.5.2.1.	Aufnahme einer Kalibriergeraden für das Reaktionsprodukt aus H- Histidyl-L-Leucin (H-His-L-Leu) und o-Phthalaldehyd	42
2.5.2.2.	ACE-Bestimmung im Langzeitversuch	43
2.6	 DNA-Bestimmung	44
2.6.1	Prinzip der Bestimmung	44

2.6.2	Aufnahme einer Kalibriergeraden	45
2.6.3	Bestimmung der DNA-Konzentration in 24-Well Zellkulturplatten.....	46
2.7	Bestimmung des β-Amyloid-Peptids (1-42).....	46
2.7.1	Vorbereitung der Lösungen	47
2.7.2	Vorbereitung der Testproben.....	47
2.7.2.1.	Erste Experimentserie.....	47
2.7.2.2.	Zweite Experimentserie.....	48
2.7.3	Messverfahren.....	48
2.8	Bestimmung der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP).....	49
2.8.1	Vorbereitung der Testproben.....	49
2.8.2	Isolierung des intrazellulären cAMP	49
2.8.3	Vorbereitung der Lösungen	50
2.8.4	Messverfahren.....	51
2.9	Hämatoxylin-Färbung von Zellkulturen nach Arabinosylcytosin-Behandlung	52
3	ERGEBNISSE	53
3.1	Einfluss von Grüntee-Extrakt und seinen Inhaltsstoffen auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation.....	53
3.1.1	Einfluss des Grüntee-Extrakts	53
3.1.2	Untersuchung von Coffein, Theophyllin, Theobromin und Theanin	54
3.1.3	Untersuchung von Polyphenolen: (-) Epicatechin, (-)Epigallocatechin und Epigallocatechingallat.....	57
3.2	Einfluss von Ginkgo-biloba-Extrakt und seinen Inhaltsstoffen auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation.....	60
3.2.1	Einfluss des Ginkgo-biloba-Extrakts.....	60
3.2.2	Einfluss von Bilobalid, Ginkgolid A, Ginkgolid B und Amentoflavon	61
3.2.3	Einfluss von Bilobalids und der Ginkgolide A und B in Kombination.....	62
3.3	Einfluss von Flavonoiden auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation	63
3.4	Untersuchung von weiteren Naturstoffen	65
3.5	Untersuchungen zu Wirkungsmechanismen der untersuchten Extrakte und Reinsubstanzen	67
3.5.1	Blockade der Synthese von DNA durch Arabinosylcytosin.....	67

3.5.2	Einfluss von ausgewählten untersuchter Substanzen in Kombination mit Arabinosylcytosin	70
3.5.3	Einfluss von Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram	71
3.6	Einfluss ausgewählter Substanzen auf die ACE-Aktivität	73
3.6.1	Einfluss von Coffein und Theophyllin	73
3.6.2	Einfluss von EC und EGC in Kombination	74
3.6.3	Einfluss des Ginkgo-biloba-Extrakts	75
3.6.4	Einfluss von Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram	76
3.6.5	Einfluss von Apigenin und Luteolin	77
3.6.6	Einfluss von Vinpocetin, Curcumin und Triiodotyronin	78
3.7	Einfluss von ausgewählten Substanzen auf die Menge von endogen gebildetem β-Amyloid-Peptid 1-42 ($A\beta$1-42)	79
3.7.1	Erste Experimentserie	80
3.7.2	Zweite Experimentserie	81
3.8	Einfluss von ausgewählten Testsubstanzen auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration	83
4	DISKUSSION	86
4.1	Beeinflussung der NEP-Aktivität und der Zellproliferation durch Grüntee-Extrakt und seine Inhaltsstoffe	87
4.2	Beeinflussung der NEP-Aktivität und der Zellproliferation durch Ginkgo-biloba-Extrakt und seine Inhaltsstoffe	90
4.3	Beeinflussung der NEP-Aktivität und der Zellproliferation durch Flavonoide	92
4.4	Beeinflussung der NEP-Aktivität und der Zellproliferation durch weitere Substanzen	93
4.5	Beeinflussung der NEP-Aktivität durch Arabinosylcytosin und andere ausgewählte Substanzen in Kombination mit Arabinosylcytosin	97
4.6	Beeinflussung der NEP-Aktivität und der Zellproliferation durch Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram	98
4.7	Beeinflussung der ACE-Aktivität und der Zellproliferation durch ausgewählte Substanzen	99
4.8	Beeinflussung der Menge von endogen produzierten $A\beta$1-42 durch ausgewählte Substanzen	100

4.9	Beeinflussung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch ausgewählte Substanzen	104
5	ZUSAMMENFASSUNG	108
6	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	110
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	112
8	LITERATURVERZEICHNIS	114

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNGEN

1.1 Alzheimer-Demenz

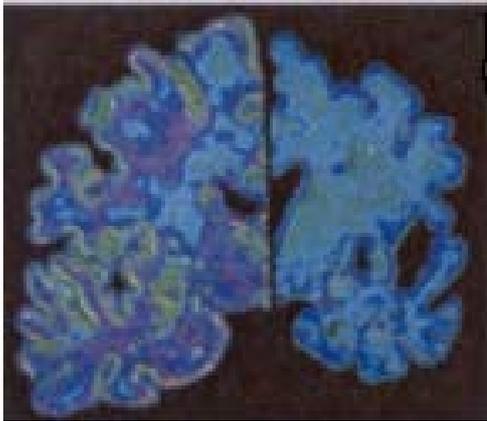
Je älter ein Mensch wird, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ihn der schleichende Verlust geistiger Fähigkeiten trifft. Die häufigste Form der Demenz ist die Alzheimer-Demenz (AD). Sie ist nach Dr. Alois Alzheimer benannt, der deutsche Neurologe beschrieb als Erster (1906) die Symptome einer Demenz, die er an einer Patientin beobachtete. Er begleitete diese Patientin, bis sie an ihrer Krankheit verstarb. Nach ihrem Tod untersuchte er ihr Gehirn und stellte eine ausgedehnte Zerstörung von Hirnzellen fest (Bick et al. 1987). Diese Krankheit ist heute eines der Hauptthemen neurowissenschaftlicher Forschung. Das große Interesse an dieser Krankheit beruht auf ihrer Häufigkeit und auf ihrem jahrelangen, unausweichlich fortschreitenden Verlauf.

1.1.1 Definition, Häufigkeit, Symptome und Warnzeichen

Definition

Die AD ist eine degenerative, chronische, langsam fortschreitende Erkrankung des Gehirns. Sie zerstört nach und nach die Gehirnzellen (Abb. 1). Sie beeinflusst das Gedächtnis, das Denken, das Sprechen, das Erkennen sowie die Orientierung. Neben Störungen der kognitiven Funktionen zeigen sich bei den betroffenen Patienten im Verlauf der AD auch vielfältige neuro-psychologische Störungen, die das tägliche Leben beeinträchtigen. In den Spätstadien der Krankheit können neben dem geistigen Verfall weitere neurologische Ausfälle hinzutreten z. B. Störung der Motorik, Inkontinenz u. a. (Scott et al. 2000).

Histologisch sind intrazellulär lokalisierte neurofibrilläre Tangles und extrazelluläre β -Amyloidablagerungen charakteristisch für die AD (Yen et al. 1995; Selkoe 1996, 2001b). Es gibt zwei Formen der Erkrankung: eine erblich und eine nicht erblich bedingte (Reisberg 1983).



Die klinischen Symptome können bei der autosomal vererbten „familiären“ Form der Erkrankung in der fünften Lebensdekade einsetzen. Dagegen manifestiert sich die nichterbliche „sporadische“ Form erst zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr (Breitner et al. 1984).

Abbildung 1: Humane Hirnpräparate (links normale, rechts Atrophische Gehirnhälfte einer AD) (<http://www.sigma-aldrich.com>).

Häufigkeit

Das Risiko des Einzelnen, einmal an einer Demenz zu erkranken, hängt stark vom Lebensalter ab. An der AD leiden etwa 5 % der 65-Jährigen und bis zu 30 % der über 85-Jährigen. Die AD ist mit einem Anteil von etwa 70 % die häufigste Form der Demenzerkrankungen in den Industriestaaten. Weltweit sind etwa 25 Millionen Menschen betroffen (Parnetti et al. 1997). Zweifellos ist die Zahl der Demenzkranken in den letzten Jahrzehnten angestiegen, doch lässt sich dieser Anstieg mit der zunehmenden Zahl älterer Menschen erklären. Einige Studien belegen, dass Frauen häufiger von der AD betroffen sind als Männer. Auch dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Frauen durchschnittlich älter werden. Nach einer Studie leiden 4.5 Millionen Amerikaner an der AD. Bis 2050 wird in den USA ein Anstieg auf 13.2 Millionen Alzheimerkranke erwartet (Hebert et al. 2003). Nach Berechnungen von Bickel et al. leiden rund 950000 Menschen in Deutschland an einer Demenz. Zwei Drittel davon haben bereits das 80. Lebensjahr vollendet. 60 % der Betroffenen leiden an der Alzheimer-Demenz, davon sind 70 % Frauen und 30 % Männer. Etwa 60 % der Neuerkrankten sind 80 Jahre und älter. Bis zum Jahr 2010 rechnet die Bundesregierung mit einem Anstieg der Betroffenen auf 1.6 bis 1.7 Millionen (Bickel 2000).

Symptome und Warnzeichen

Die Symptome der AD sind vielfältig. Sie hängen vom Ausmaß und von der Ausbreitung der Veränderungen im Gehirn ab und werden auch durch die Persönlichkeit, die Lebensumstände und die körperliche Verfassung beeinflusst. Die ersten Zeichen einer beginnenden Erkrankung sind Erinnerungslücken. Meist ist das Kurzzeitgedächtnis betroffen. Im weiteren Krankheitsverlauf nimmt die

Gedächtnisleistung weiter ab. Es kommt zu einer Störung der Wortfindung und schließlich zu einer Reduktion der Sprache auf wenige Wörter. Dazu kommt eine räumliche und zeitliche Desorientiertheit. Zu diesen Problemen kommen emotionale Störungen, z. B. Antriebsstörungen und Ängste hinzu, so dass komplizierte Aufgaben nicht mehr ausgeführt werden können und schließlich bei fortgeschrittener Erkrankung auch die üblichen Alltagsverrichtungen nicht mehr erledigt werden können. Diese Patienten sind dann auf fremde Hilfe und Pflege angewiesen (Scott et al. 2000).

1.1.2 Pathogenese

Die Ursache jeder Demenz ist das Absterben von Nervenzellen im Gehirn. Warum dies geschieht, konnte die Wissenschaft noch nicht endgültig klären. Bei der Demenz, vor allem beim Alzheimer-Typ, verklumpen einzelne Proteine im Gehirn und lagern sich in bestimmten Bereichen ab. Die Nervenzellen sterben in der Nähe solcher Ablagerung, den sogenannten Amyloid-Plaques, ab.

Die Amyloid-Plaques sind ein spezifisches morphologisches Merkmal der Krankheit. Der Hauptbestandteil der Plaques ist das β -Amyloid-Peptid ($A\beta$), ein aus 40 bis 42 Aminosäureresten bestehendes Spaltprodukt (Caughey et al. 2003).

Ausgangspunkt für das β -Amyloid-Peptid ($A\beta$) ist das Amyloid-Vorläuferprotein (APP- Amyloid Precursor Protein, Abb. 2). APP sitzt in den Plasmamembranen der meisten Zellen im Gehirn und unterstützt dort verschiedene Funktionen der Nervenzellen.

Drei Enzyme, die α , β , und γ -Sekretasen, können APP spalten. Die α -Sekretase spaltet das APP in Bruchstücke, welche den Nervenzellen nicht schaden. Die beiden anderen Enzyme trennen das für AD entscheidende APP-Stück heraus. Dieses APP-Stück (Amyloid-beta-Peptid, $A\beta$ genannt) hat eine für den Körper (Glenner and Wong 1984; Haass and Selkoe 1993) schädliche (β) Faltblattstruktur.

APP und das herausgeschnittene $A\beta$ sind Dimere; diese Doppelkonstellation ist ein Risikofaktor. $A\beta$ -Dimere können bereits vor der Plaquebildung Nervenzellen schädigen. Das freigesetzte $A\beta$ wird aus den Zellen ausgeschleust und lagert sich im Extrazellulärraum mit Fibrillen zu β -Faltblattstrukturen zusammen, die durch ständige Apposition schließlich zu den Kernen der Plaques heranwachsen. Das $A\beta$ lagert sich auch an den Wänden zahlreicher Arteriolen ab und führt zur Amyloid-Angiopathie (Glenner and Wong 1984; Haass and Selkoe 1993).

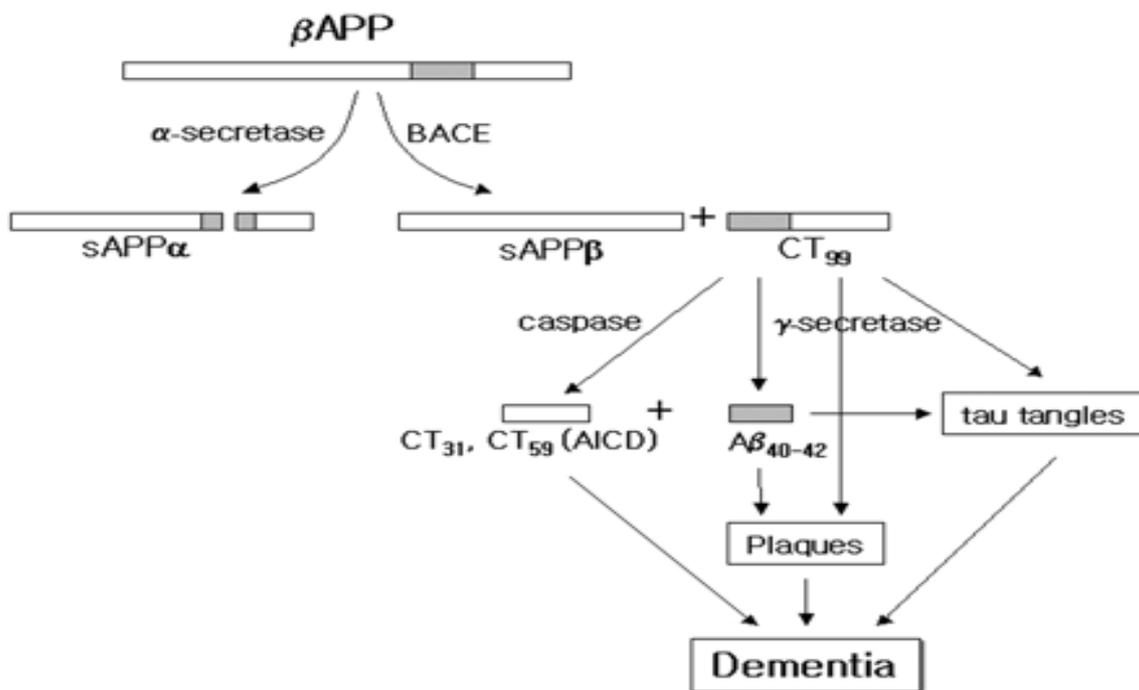


Abbildung 2: Entstehung des Amyloid- β -Vorläuferprotein durch proteolytische Aktivitäten der Beta- und Gamma-Sekretasen (Suh and Checler 2002).

Jedes der dimeren APP-Moleküle besitzt eine Kupferbindungsstelle. Die Verbindung mit dem Metall-Ion (Kupfer) verwandelt APP in ein Monomer und präsentiert in dieser Form die Schnittstelle für die α -Sekretase. Die α -Sekretase zerlegt APP ohne Entstehung von schädlichem $A\beta$ -Peptid (Scheuermann et al. 2001; Strausak et al. 2001; Simons et al. 2002).

Acetylcholinmangel-Hypothese

Die Nervenzellen stehen über Botenstoffe (Neurotransmitter) miteinander in Verbindung. Erreicht der Transmitter den richtigen Rezeptor, löst er bei der Empfängerzelle eine Erregung aus. Bei einer AD sind die Entstehung und der Abbau der Botenstoffe Glutamat und Acetylcholin aus dem Gleichgewicht geraten.

Die Acetylcholinmangel-Hypothese bietet eine mögliche Erklärung für die Entstehung der AD: Gruppen cholinergischer Zellkörper befinden sich vor allem im Corpus striatum und im Nucleus basalis des Vorderhirns (Starke 2001). Bei den striatalen Neuronen handelt es sich um cholinerge Interneuronen, die bei einer anderen neurodegenerativen Erkrankung, dem Morbus Parkinson, aufgrund des Wegfalls der dopaminergen Hemmung, überaktiv sind. Die beiden wichtigen Kerngruppen des Nucleus basalis sind der Nucleus basalis meynert und die Formatio septalis medialis. Es handelt sich um

Neurone, die Impulse entweder zur Großhirnrinde (die Neurone des Nucleus basalis meynert) oder zum Hippocampus (die Neurone der Formatio septalis basalis) geben. Es ist seit langem bekannt, dass die Neurone des Nucleus basalis bei Lern- und Gedächtnisvorgängen von Bedeutung sind (Rang et al. 2003).

Mitte der 70er Jahre konnte nachgewiesen werden, dass das Auftreten der AD mit einem massiven Verlust cholinergischer Neurone im basalen Vorderhirn einhergeht (Davies and Maloney 1976). So war in Gehirnen von Alzheimer-Patienten die Aktivität der Acetylcholintransferase (AChT) deutlich reduziert. Die AChT katalysiert die Synthese von Acetylcholin aus Acetyl-Coenzym A und Cholin und ist ein spezifischer Marker cholinergischer Neurone. Auf der Grundlage dieser und weiterer Befunde bestand lange Zeit der pharmakotherapeutische Ansatz zur AD-Therapie vor allem in einer Beseitigung des Acetylcholinmangels. Lösliches A β -Peptid hemmt die Acetylcholinfreisetzung und bewirkt durch die Blockade von schnell aktivierenden K⁺-Kanälen eine verlängerte Depolarisation der Neurone mit möglicherweise fatalen Folgen für den zellulären Energiestoffwechsel (Sigle et al. 2003).

Glutamatüberschuss-Hypothese

Bei der AD ist die Glutamatkonzentration in bestimmten Hirnzellen zu hoch. Die hohe Glutamatkonzentration schädigt die Nervenzellen durch Dauererregung, wodurch die Zellen zugrunde gehen. Auf diese Weise setzt sich die Zerstörung der Signalleitung im Gehirn immer weiter fort. Glutamat steuert viele Reaktionen, welche die Menge an Ionen (Na⁺, K⁺, Ca²⁺), die durch die Zellmembran gelangen, beeinflussen. Ca²⁺ führt dazu, dass die intrazellulären Enzyme stimuliert werden, die Proteine, Lipide und Nucleinsäuren (DNA) abbauen. Das hat zur Folge, dass die Neurone absterben (Mark et al. 2001).

Die neurofibrillären Tangles

Im Zellinnern befinden sich Bündel aus neurofibrillären Tangles. Sie bestehen aus dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau. Dieses Tau-Protein ist ein normaler Bestandteil des axonalen Zellskeletts (Abb. 3). Bei der AD ist es abnorm stark phosphoryliert. Die physiologische Bedeutung der Phosphorylierung des Tau-Proteins liegt in der Regulation der Bindungseigenschaften an die Mikrotubuli. Während der Hirnentwicklung zeigt das Tau-Protein eine relativ starke Phosphorylierung, wodurch die Mikrotubulibindung abgeschwächt wird. Dies stellt eine wichtige Voraussetzung für die Flexibilität auswachsender Axone dar. Nach der Ausdifferenzierung des Gehirns

nimmt die Tau-Phosphorylierung stark ab, stabilisiert die Mikrotubulstruktur, und schafft damit eine wichtige Voraussetzung für einen effektiven axonalen Transport. Aus bisher unbekanntem Gründen ist die Tau-Phosphorylierung bei der AD wieder erhöht. Dadurch kommt es zur Labilisierung der Mikrotubulstruktur und dadurch zur Störung des axonalen Transports.

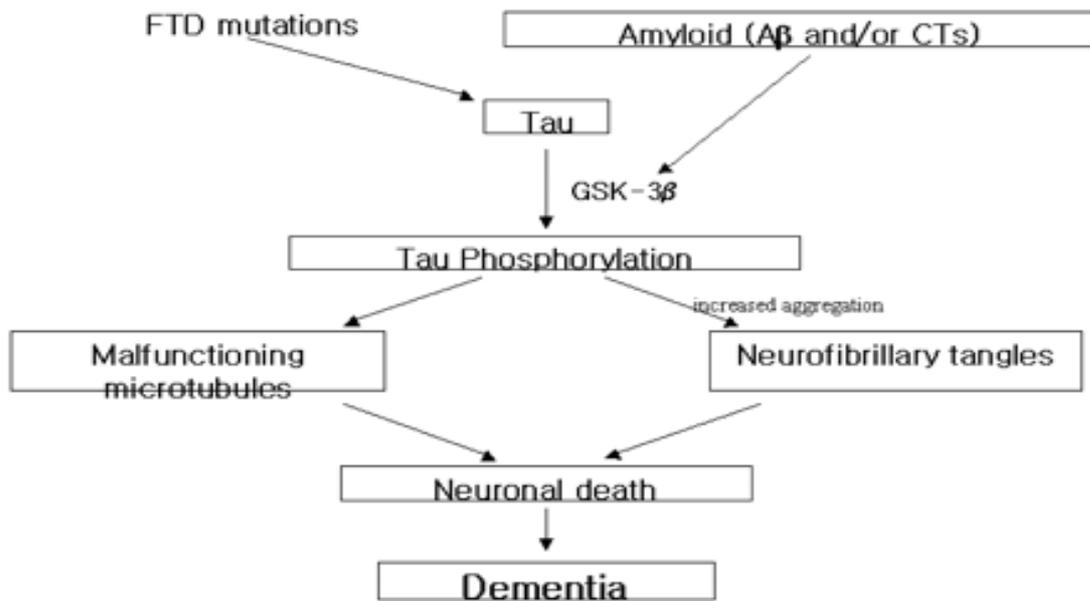


Abbildung 3: Das Tau-Protein und die Neurofibrillären Tangles Hypothese (Suh and Checler 2002).

Das nicht mehr gebundene Tau-Protein wird aus dem Axon in das somatodendritische Kompartiment rückverlagert, wo es zu Verknotung der Fibrillen kommt, den neurofibrillären Tangles (Abb. 4) (Yen et al. 1995).

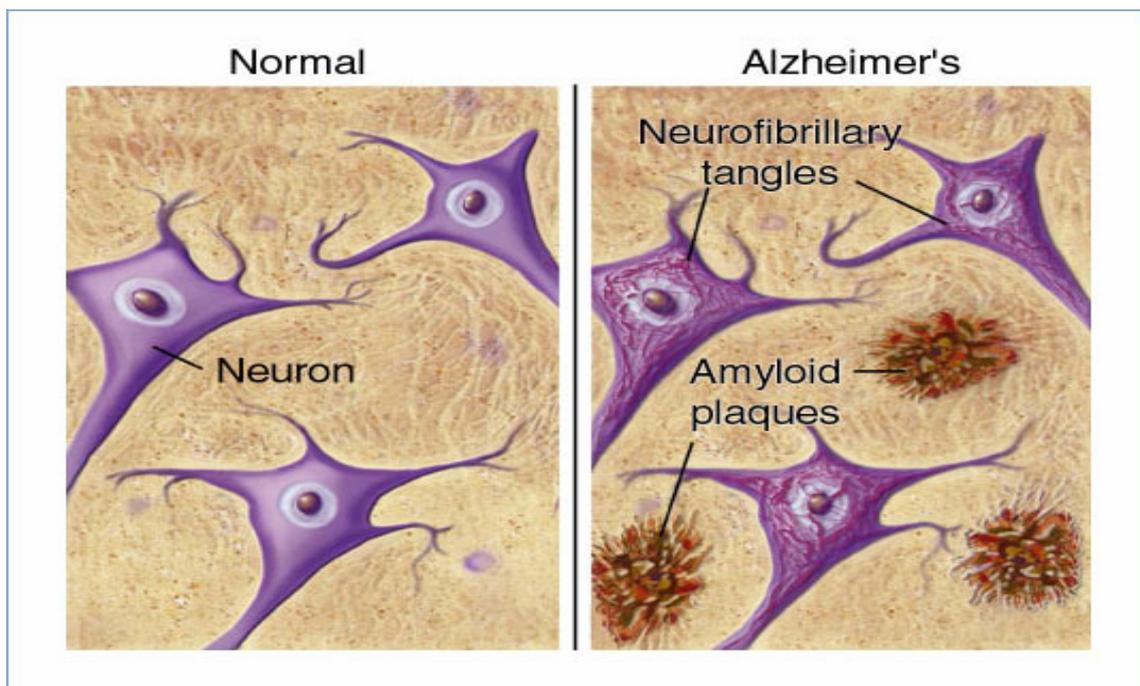


Abbildung 4: Amyloid-Plaques und Neurofibrilläre Tangles (<http://www.ahaf.org>).

1.1.3 Ursachen und Risikofaktoren

Bisher sind die Ursachen der AD nur in Ansätzen bekannt. Es gibt Hinweise, dass mehrere Faktoren an der Entstehung der Krankheit beteiligt sind und dass deren Kombination nicht bei allen Betroffenen gleich ist. Es ist nicht genau bekannt, wie diese Faktoren zusammenwirken aber es ist bekannt, welche Schäden diese Faktoren im Gehirn anrichten. Die Faktoren bewirken die Ablagerung pathologischer Substanzen in der Umgebung und im Inneren der Nervenzellen. Durch diese Ablagerung werden wichtige Lebensvorgänge der Nervenzellen schrittweise lahm gelegt. Eine Folge davon ist, dass die betroffenen Nervenzellen weniger Botenstoffe erzeugen können, mit denen sie sich untereinander verständigen. Am stärksten ist Acetylcholin davon betroffen (Starke 2001). Es gibt eine Reihe von Hypothesen zur Ätiologie der AD, auf die im nächsten Abschnitt eingegangen wird.

Lebensalter

Je älter der Mensch wird, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit dem schleichenden Gedächtnisverlust zum Opfer zu fallen. Da die Zahl älterer Menschen aufgrund steigender Lebenserwartung ständig zunimmt, steigt die Zahl der von der AD betroffenen Menschen an. Im Alter gibt es viele Veränderungen im Körper; u. a. die Veränderung der DNA und des Zellteilungszyklus, Störungen der Proteinsynthese und/oder deren Struktur, Veränderungen von Geweben, Organen und Organsystemen. Auch das Zentralnervensystem ist betroffen, besonders im Gehirn (Hans 1980). Eine Studie zeigt, dass das Alter mit Störungen des Gefäßsystems verbunden ist. Im Alter steigt die Empfindlichkeit des zerebralen und peripheren Gewebes gegenüber den schädlichen Effekten von A β an (Price et al. 2004).

Genetische Ursachen

Es gibt Erbfaktoren, die zum Ausbruch des Leidens in meist relativ jungem Alter führen. Schätzungsweise ein bis fünf Prozent der Krankheitsfälle gehen darauf zurück. Ein erhöhtes Erkrankungsrisiko ist wahrscheinlich, wenn das Leiden bereits in mehreren Generationen auftrat und die Symptome relativ früh, also vor dem sechzigsten Lebensjahr, einsetzten. Bisher wurden spezifische Gen-Mutationen auf den Chromosomen 1, 14 und 21 identifiziert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der AD verantwortlich sind.

Als krankheitsbegünstigender „genetischer Risikofaktor“, wird das Vorhandensein des Apolipoprotein E4-Gens (Apo-E4) diskutiert, das sich auf dem Chromosom 19 befindet. Träger des Apolipoprotein-E4-Gens haben neben dem erhöhten Risiko, an der AD zu erkranken, auch ein erhöhtes Risiko, einen Herzinfarkt oder eine durchblutungsbedingte Demenzerkrankung zu bekommen. Jeder Mensch verfügt über Apo-E4, das am Transport und der Verarbeitung von Cholesterin beteiligt ist. Das Apo-E-Gen kommt in drei Formen vor: E2, E3, E4. Eine dieser Formen (E2-Gen) schützt vor der Erkrankung, Apo-E4-Epsilon-Allel erhöht dagegen das Risiko zu erkranken. Das Apo-E4- δ -Allel Gen führt zu einer vermehrten Ablagerung von A β im Gehirn (Corder et al. 1993). Ein weiteres für die Entstehung von der AD wichtiges Eiweißmolekül ist das APP (Amyloid Precursor Protein, APP), welches 1987 entdeckt wurde. Eine Mutation im APP-Gen (Chromosom 21) sowie Mutationen im Gen Presenilin 1 (PSEN1) und im Gen Presenilin 2 (PSEN2) (Chromosom 14) führen dazu, dass sich mehr A β abgelagert (Sinha and Lieberburg 1999).

Bei Down-Syndrom-Patienten, die ein überzähliges Chromosom 21 haben, findet sich eine sehr frühe Ausbildung der Amyloid-Plaques. Deshalb haben sie ein erhöhtes Risiko an der AD zu erkranken, und zwar schon in den mittleren Lebensjahren (Parajua-Pozo and Casis-Arguea 2000).

Entzündliche Vorgänge

Auch entzündliche Vorgänge können am Untergang von Nervenzellen der AD beteiligt sein (Akiyama et al. 2000). Bestimmte Zellen des Gehirns (die Zellen des temporalen und frontalen Cortex sowie des Hippocampus), die Abwehraufgaben erfüllen, sind überaktiv und sondern Substanzen ab, die auch in anderen Organen des Körpers bei Entzündungen angetroffen werden. Alle Arten von Krankheitserregern können in das Gehirn vordringen und dort eine Entzündung hervorrufen. Die meisten Gehirnentzündungen gehen auf Viren zurück, auch Pilze oder Parasiten können eine Enzephalitis hervorrufen. An erster Stelle steht das Herpes-Virus (Herpes Simplex Typ 1). Eine Studie aus Großbritannien zeigte, dass eine Infektion mit dem Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) ein Faktor für die Entwicklung der AD sein könnte. Für eine Beteiligung von HSV 1 bei der Entstehung von der AD spricht, dass das Virus bei der sehr seltenen, akuten HSV-1-Enzephalitis dieselben Gehirnregionen befällt, die auch bei der AD am stärksten betroffen sind. Diese sind vor allem der temporale und frontale Cortex sowie der Hippocampus. Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gelang es, die DNA von HSV-1 im Gehirn älterer Menschen mit und ohne AD zu

identifizieren. Es wurde untersucht, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Apo-E4-Allel und der HSV-1-Infektion bei der Entstehung der Krankheit gibt. Die Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, dass das Risiko für eine AD deutlich erhöht ist, wenn das Apo-E4-Allel in Verbindung mit einer HSV-1-Infektion auftritt. Auch andere Entzündungen können zur Reaktivierung von HSV-1 führen. Eine Bestätigung der Ergebnisse könnte dazu führen, dass antivirale und entzündungshemmende Medikamente verstärkt in der Therapie gegen AD zur Anwendung kommen (Itzhaki et al. 1997; Latchman 1997).

Schädel-Hirn-Traumen, auch wenn sie Jahre zurückliegen, erhöhen das Risiko an einer Demenz zu erkranken. Nach Schädel-Hirn-Traumen nimmt die Konzentration an freiem APP zu. Das führt dazu, dass sich mehr Amyloid im Gehirn ablagert (Roberts et al. 1991; 1994).

Energiemangel

Es gibt erste Hinweise darauf, dass die Entstehung von A β mit einem Energiemangel in Verbindung zu sehen ist. Je älter ein Mensch wird, desto weniger Energie steht seinem Gehirn zur Verfügung. Der Grund dafür ist eine schlechtere Durchblutung oder andere Störungen in den Gehirnzellen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass eine schlechte Durchblutung (Ischämie) im Gehirn die APP-Konzentration erhöht. Das führt wiederum zu einer vermehrten Ablagerung von A β im Gehirn. Glukose ist die Hauptenergiequelle für die zellulären und körperlichen Funktionen. Das Gehirn braucht für seine Schutzsysteme mehr Glukose als alle anderen Gewebe. Es wurde beschrieben, dass es bei der AD zu Störungen des Glukose-Stoffwechsels kommen kann. Diabetes mellitus kann die Funktion des Gehirns behindern und den Prozess zur Ausbildung einer Demenz beschleunigen. Außer der Zerstörung wichtiger Blutgefäßnetze und der Gefahr von kleinen Hirnschlägen, kann eine Disglykämie in die Entwicklung der neurofibrillären Tangles innerhalb des Gehirns direkt einwirken, welche für die AD charakteristisch ist (Wallace et al. 1997).

Die Ernährung

Bei der Entwicklung der Demenz spielen die Umwelt und der Lebensstil eine wesentlich größere Rolle als die genetischen Voraussetzungen. Die Entwicklung der Demenz hängt vor allem mit dem erhöhten Konsum von hochkalorischer Nahrung,

besonders bei Trägern des Apo-E4- δ -Allel-Genotyp, und mit der verminderten Einnahme von Omega-3-Fettsäuren zusammen. Diese Faktoren wirken direkt und indirekt.

Die Auswirkungen sind:

- Bestimmte Lipide (Low-Density-Lipoproteine, LDL), welche die Gefäßwände und das Gewebe schädigen, sind im Blut erhöht. Das Low-Density-Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) ist der bedeutendste Rezeptor für Apolipoprotein E, alpha-2-Macroglobulin und Laktoferrin. Eine verringerte LRP-Expression scheint in der Entstehung von der AD eine entscheidende Rolle zu spielen (Reitz et al. 2004).
- Fett ist möglicherweise Oxidationsprozessen unterworfen, die zur Formierung schädlicher freier Sauerstoffradikale führen. Eine Studie hat nachgewiesen, dass der vermehrte Verzehr von Fett das Demenzrisiko um den Faktor 2.4 erhöht (Kalmijn et al. 1997).
- In Folge einer verringerten Aufnahme von Omega-3-Fettsäuren wird vermehrt Homocystein gebildet, welches den oxidativen Stress erhöht und die Gefäße schädigt (Seshadri et al. 2002; Quadri et al. 2004).

Bildungsniveau

Untersuchungen in mehreren Ländern haben eindeutige Hinweise darauf ergeben, dass Menschen mit einer unzureichenden Schulbildung ein bis zu fünf-mal höheres Risiko haben an der AD zu erkranken. Je besser das Bildungsniveau, desto geringer ist das Risiko. Als mögliche Erklärung dieses Phänomens ist in den 90er Jahren das Konzept der Reservekapazität des Gehirns entwickelt worden.

Es geht davon aus, dass durch Bildung und damit durch Training der Hirnfunktionen die Bildung von Synapsen, dendritischen Verzweigungen und von Myelin gefördert und damit das neuronale Netzwerk im Gehirn dichter wird (Letenneur et al. 2000).

Geschlecht

Frauen erreichen ein um einige Jahre höheres durchschnittliches Lebensalter als Männer. Es gibt mehr ältere Frauen als Männer, was auch erklärt, dass absolut gesehen mehr Frauen als Männer unter dieser Krankheit leiden.

Frauen haben im Mittel einen etwas längeren Krankheitsverlauf, weshalb es vermutlich den Anschein hat, dass ein Unterschied in Form eines erhöhten Erkrankungsrisikos zwischen den Geschlechtern besteht. Bei familiärem Auftreten von der AD zwischen

dem 50. und 70. Lebensjahr besteht kein Geschlechtsunterschied. Für den Zusammenhang zwischen dem weiblichen Geschlecht und der höheren Erkrankungsrate werden ganz verschiedene Ursachen vermutet, z. B. Umwelteinflüsse. Erwähnenswert ist die Beobachtung, dass ein bei älteren Frauen nach der Menopause häufig auftretender Östrogenmangel ein Risikofaktor für die AD zu sein scheint. Östrogene sind wichtig für die Reparaturvorgänge in Zellen und Zellmembranen (Molsa et al. 1982; Jorm et al. 1987). In einer Studie wurde gezeigt, dass 17- α -Estradiol (0.2-2 nM) die Zelltoxizität, die von A β induziert wird, bis zu 51 % reduzieren kann (Green et al. 1996). Östrogene vermindern den zirkulierenden Spiegel von Apolipoprotein E (Kushwaha et al. 1991) und steuern den Abbau von Amyloid-Precursor-Proteinen (APP) zu löslichen Fragmenten, die sich weniger leicht zum schädlichen A β aggregieren lassen (Jaffe et al. 1994). Es gibt die These, dass Östrogene AD verzögern können. In einer Studie wurde gezeigt, dass die Östrogensatztherapie (ERT) gegen AD schützen kann (Tang et al. 1996). In weiteren Studien wurde nachgewiesen, dass die physiologische Konzentration von 17- β -Estradiol die Bildung von A β in Neuroblastomazellen verringert (Xu et al. 1998).

Testosteron spielt auch eine wichtige Rolle bei dem Altersleiden. In einer Studie von US-amerikanischen Wissenschaftlern wurden 574 Männer bereits seit 1958 regelmäßig untersucht. Ärzte haben u. a. ihre Hormonwerte gemessen und diese Daten im Hinblick auf das Risiko für die AD untersucht. Einige der Studienteilnehmer haben Ärzte über einen Zeitraum von mehr als 40 Jahren regelmäßig untersucht. Von 574 Männern erkrankten 54 an AD. Männer, die höhere Testosteronwerte aufwiesen, hatten ein deutlich geringeres Risiko an der AD zu erkranken. In der Studie wird aufgezeigt, dass es eine Beziehung zwischen AD und Testosteron gibt. Testosteron liegt im menschlichen Organismus in zwei Formen vor, einmal frei und einmal gebunden an einem Protein. Nur das freie Testosteron kann seine Wirkung als männliches Sexualhormon entfalten. Männer mit einer niedrigen Konzentration an freiem Testosteron haben ein höheres Alzheimerisiko (Hogervorst et al. 2004). Eine aktuelle Studie zeigte, dass Testosteron das A β -Niveau in vivo regulieren und somit gegen die AD schützen kann (Gouras et al. 2000).

Stress

Mitunter wird behauptet, dass die AD zumindest teilweise auf den vermehrten Stress in Industriegesellschaften zurückgeht. Chronischer Stress geht bei Tieren und Menschen mit einer Schädigung des Hippocampus sowie mit Lern- und Gedächtnisproblemen

einher. Eine Studie erhärtete den Verdacht, dass chronischer Stress auch die Entstehung einer AD begünstigen kann. Die Wahrscheinlichkeit an einer AD zu erkranken war für Personen, die zu Beginn der Untersuchung eine hohe Stressanfälligkeit aufwiesen im Vergleich zu Personen mit niedriger Stressanfälligkeit doppelt so groß. Stressanfälligkeit beeinträchtigte speziell das Gedächtnis, das sich im Extremfall um den Faktor 10 verschlechterte (Wilson et al. 2003).

Elektromagnetische Felder

Zwei epidemiologische Studien aus den USA und Schweden unterstützen frühere Vermutungen über einen Zusammenhang zwischen elektromagnetischen Feldern (EMF) am Arbeitsplatz und der Entstehung von der AD. Nach der amerikanischen Studie haben Berufsgruppen mit einer hohen Belastung durch EMF (Elektriker und Lokomotivführer) ein viermal höheres Risiko an der AD zu erkranken als eine Kontrollgruppe.

In der schwedischen Studie fand sich ein um den Faktor fünf erhöhtes Risiko. Als mögliche Erklärung wird eine vermehrte Produktion des A β -Proteins durch EMF diskutiert. Kann EMF die Entstehung der AD begünstigen? Ein Erklärungsmodell (Schulte et al. 1997):

EMF-Exposition führt zu einer Störung des Kalzium-Stoffwechsels, was zu einer Zunahme der Konzentration freier Ca²⁺-Ionen in den Zellen führt. Zumindest einer der Wege, die zur Entstehung von löslichem A β führen, ist eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von freiem Kalzium. A β wird von den Zellen schnell in den Blutstrom abgegeben. EMF soll zu einer vermehrten Sekretion von A β in den Blutstrom und damit zu einer Erhöhung der A β -Konzentration im Blut beitragen. Bestimmte Proteine (Apolipoproteine E und J) können an A β anbinden und dazu beitragen, dass A β die Blut-Hirn-Schranke überwindet. Ein hohes Überangebot an A β könnte mit der Zeit im Gehirn zur Bildung von nervenschädigenden, unlöslichen Amyloid-Plaques bzw. den Neurofibrillen Tangles und schließlich zur AD führen (Schulte et al. 1997).

Rauchen

Beim Rauchen ist es noch nicht klar, ob es einen schädlichen oder protektiven Effekt auf die AD hat. In einer Studie wurde nachgewiesen, dass das durchschnittliche Risiko an der AD zu erkranken für Raucher und Raucherinnen 2.7-mal größer ist, im Vergleich zu Personen, die nie geraucht haben. Diese Ergebnisse waren unabhängig vom Alter, Geschlecht, Schulbildung, Blutdruck und Alkoholkonsum (Juan et al. 2004). Eine neue

Studie zeigte wiederum, dass das Niveau von A β 40 und A β 42 im Gehirn von Alzheimer-Patienten, die rauchen, niedriger ist, als bei nichtrauchenden Alzheimer-Patienten (Hellstrom-Lindahl et al. 2004).

Aluminium und Kupfer

Nachdem im Zentrum der senilen Plaques hohe Konzentrationen von Aluminiumsilikat nachgewiesen wurden, kommt Aluminium als Auslöser für die toxisch bedingte AD in Frage (Mera 1991). Als Folge der Aluminiumintoxikation kommt es zu Veränderungen der Neurofibrillen. In manchen Untersuchungen wird die These vertreten, dass es einen Zusammenhang zwischen Aluminium und APP gibt (Edwardson et al. 1992). Die Konzentration an APP steigt bei Gabe von Aluminium in vitro an (Chong and Suh 1995). Eine weitere Studie zeigte, dass hohe Konzentration von Aluminium und geringe Magnesium- und Phosphor-konzentration im Gehirn der Alzheimerpatienten gefunden wurde (Andrasi et al. 2005).

Eine eventuelle Studie zeigte, dass Aluminium wie seine Interaktion mit Transferin keine Verbindung mit dem Risiko der AD hatte (Rondeau et al. 2006). In einer anderen neuen Tierstudie wurde gezeigt, dass Aluminium im Gegensatz zu Kupfer im Trinkwasser keine bedeutsame Wirkung auf A β Ansammlung hatte (Sparks et al. 2006).

Die Ergebnisse einer Studie aus den USA und Kanada zeigen, dass ein Kupfermangel mit einer Erkrankung an der AD verbunden sein könnte. Es wird vermutet, dass ein Kupferdefizit dazu führt, dass durch die vermehrten gebildeten A β -Peptide die schädlichen Amyloid-Plaques gebildet werden, welche wiederum die Hirnzellen zerstören (Phinney et al. 2003).

Blutdruck und Cholesterol

Ein erhöhter Blutdruck und ein erhöhter Cholesterolwert im mittleren Lebensabschnitt erhöhen das Risiko im Alter an der AD zu erkranken. Wenn es in den Zellen einen erhöhten Cholesterolwert gibt, starten die Zellen ein Efflux-System, damit der Cholesterolwert normal bleibt. Im Gehirn entstehen mit Hilfe von Cytochrom-P450-Enzyme aus Cholesterol 24-S-Hydroxycholesterol. Durch das Cholestroefflux-System wird Apo-E im Gehirn induziert. Das führt dazu, dass mehr Amyloid im Gehirn abgelagert wird (Rebeck 2004).

Homocystein

Einige Studien haben gezeigt, dass Homocystein mit einem erhöhten Demenzrisiko verbunden ist. Bei Mangel an den Vitaminen B6, B12 und an Folsäure steigt die Homocysteinkonzentration an. Bei hohen Homocysteinwerten sind die kognitiven Leistungen älterer Menschen beeinträchtigt. Es ist noch nicht genau geklärt, auf welche Weise Homocystein die Demenz beeinflusst (Seshadri et al. 2002; Quadri et al. 2004).

1.1.4 Therapie

Die verschiedenen Ursachen bei der Entstehung und beim Fortschreiten der AD führen dazu, dass jeder Mensch andere Symptome zeigt, deshalb ist die Behandlung vielfältig. Die Krankheit ist nicht heilbar. Das heißt nicht, dass man die Krankheit nicht aufhalten oder die Symptome zumindest für einige Zeit lindern kann. Die Therapieziele bei der fortgeschrittenen AD lauten:

- Verbesserung der Selbständigkeit des Kranken bei den alltäglichen Verrichtungen
- Verbesserung bzw. Erhalt der geistigen Fähigkeiten
- Erleichterung der Pflege des Kranken.

Eine moderne Behandlung beruht im Wesentlichen auf zwei Säulen:

- ❖ der medikamentöse Therapie und
- ❖ der optimale Betreuung, um geistige Anregung und Geborgenheit zu bieten.

Die medikamentöse Behandlung kann in zwei Kategorien unterteilt werden:

- Medikamente, die das Voranschreiten der Krankheit verlangsamen und
- Medikamente, welche die begleitenden Schwierigkeiten behandeln.

Medikamente, die das Voranschreiten der Krankheit verlangsamen

Die Arzneimittel, die heute für Demenzkranke zur Verfügung stehen, lassen sich in drei Gruppen einteilen:

- Wirksubstanzen, welche die Zerstörung von Nervenzellen durch Glutamate verhindern können [NMDA(N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor-Antagonisten]
- Acetylcholinesterase-Hemmer
- Nootropika: Mittel zur Förderung der Hirndurchblutung.

NMDA-Rezeptor-Antagonisten

Heute steht Memantine für die Behandlung der mittelschweren und schweren AD zur Verfügung. Die Substanz hemmt die schädlichen Auswirkungen von Glutamat an den Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren) und kann dadurch die Nervenzellen und Neuronen vor der gefährlichen Überstimulation mit Glutamat schützen (Neuroprotektion).

Für die zumeist älteren Alzheimer-Patienten, die oft unter Krankheiten am Herzen, Bluthochdruck oder Rheuma leiden und deshalb viele andere Medikamente nehmen müssen, ist das ein wichtiger Aspekt. Memantine kann bei schwerer AD eine Besserung der Hirnfunktionen erreichen, und Alltagsfähigkeiten bleiben länger erhalten (Reisberg et al. 2003).

Acetylcholinesterase-Hemmer

Wirkstoffe wie Donepezil, Rivastigmin, Targin und Galantamin verhindern, dass bereits gebildetes Acetylcholin im Gehirn schnell abgebaut wird. Sie blockieren das Enzym Acetylcholinesterase, dies bewirkt eine höhere Konzentration des Botenstoffs Acetylcholin und verbessert damit die Kommunikation der Nervenzellen. Daraus folgt eine Verlangsamung des geistigen Verfalls und unter Umständen eine Verringerung der Wahnvorstellungen. Die Acetylcholinesterase-Hemmer sind für die Behandlung von Patienten mit leichter bis mittelschwerer AD zugelassen. Da Acetylcholinesterase-Hemmer und Memantine unterschiedliche Wirkansätze haben, hofft man, mit einer Kombination beider Medikamente den Therapieerfolg verbessern zu können (Clegg et al. 2001).

Nootropika

Diese dritte Gruppe von Arzneimitteln soll die Durchblutung des Gehirns verbessern und dafür sorgen, dass die Blutgefäße, die das Gehirn versorgen, durchgängig bleiben und auf diese Weise die Nervenzellen optimal ernährt werden. Aus dem Wirkmechanismus ergibt sich, dass diese Mittel vor allem beim Verdacht auf eine durch mangelnde Durchblutung bedingte Demenz sinnvoll sind.

Eine dieser Substanzgruppen ist seit längerer Zeit bekannt: die Mutterkornalkaloide mit Dihydroergotoxinmesylat (DEM) bzw. Hydergin als Vertreter.

Der Wirkmechanismus von DEM bei der AD ist unbekannt. Es wird angenommen, dass der Stoffwechsel von Gehirnzellen durch verstärkte Bildung von zyklischem Adenosin 3',5'-monophosphat (cAMP) verbessert wird. Außerdem wird die Durchblutung

verstärkt und die Sauerstoffversorgung verbessert (Burian E. 1974; Yesavage et al. 1979). Weiterhin wird vermutet, dass DEM den Stoffwechsel von Serotonin und Dopamin regulierend beeinflussen kann (Thienhaus et al. 1987).

Es wurde gezeigt, dass sich nach drei Monaten DEM-Therapie (3 mg- und 6 mg-Dosis) das Befinden der Patienten mit fortgeschrittener Verwirrung, Gedächtnisminderung, Desorientiertheit und aggressivem Verhalten bemerkenswert verbessert hat (weniger Verwirrung, vermehrte Motivation, kurzfristige Gedächtnisverbesserung) (Burian 1974; Yesavage et al. 1979). In einem anderen Fall wurden weitere Verbesserungen der Bewältigung des Alltagslebens bei einer Dosis von 3 mg DEM pro Tag registriert (Burian 1974). Andere Arzneimittel, die zur Gruppe der Nootropika gehören, sind Piracetam (Flicker and Grimley-Evans 2000), Nicergolen (Fioravant and Flicker 2001), Vinpocetin (Szatmari and Whitehouse 2003), Acetyl-L-Carnitin (Hudson and Tabet 2003) und Gingko-biloba-Extrakt (Andrieu et al. 2003).

Neue Ansätze in der Therapie

Antioxidantien/ Radikalfänger

Das Schutzsystem von Antioxidantien in den Zellen unterteilt sich in das enzymatische Schutzsystem (Superoxid-Dismutase) und das nicht enzymatische Schutzsystem (Glutathion (GSH), Vitamine A, C und E). Die antioxidative Aktivität von GSH hat großen Einfluss auf den Zellmetabolismus, speziell auf die DNA-Synthese und -Reparatur sowie auf den Metabolismus von Toxinen und Karzinogenen (Cerutti 1991). Freie Radikale sind durch oxidative Prozesse vermutlich an der Entwicklung verschiedener Krankheiten beteiligt. Dazu gehören beispielsweise Arteriosklerose, Krebs, Diabetes mellitus und Asthma. Antioxidanzien können oxidativen Prozessen vorbeugen und sie wirksam verringern (Willcox et al. 2004). Oxidative Schäden an den Lipidmembranen können wichtige Funktionen neuronaler Zellen stören. In der Folge entstehen mehr (β -Amyloid-) Ablagerungen, schließlich kommt es zum Zelltod. An der Entstehung von der AD sind unter andere aggressive freie Radikale beteiligt, deshalb können Antioxidantien gegen die AD helfen. Die Ergebnisse zweier großer Bevölkerungsstudien aus Rotterdam und Chicago unterstützen die Theorie, dass Antioxidantien die oxidativen Belastungen neuronaler Zellen senken können, indem sie die Anzahl aggressiver freier Radikale verringern (Engelhart et al. 2002; Morris et al. 2002).

Vitamin E

Die regelmäßige Aufnahme von Vitamin E soll vor der Entstehung der AD schützen. Vitamin E kann die freien Radikale zerstören, die zu Zellschäden führen. Sano et al. zeigten, dass die Aufnahme von 2 000 IE Vitamin E (Tocopherol) täglich das Fortschreiten der AD um 6.5 Monate bremst (Sano et al. 1997). Dagegen konnten Mishra et al. keine Beweise finden, dass Vitamin E bei der Behandlung erfolgreich ist (Mishra et al. 2003).

Neue Ansätze zur Phytotherapie

In den letzten Jahren wurden viele Studien durchgeführt, die sich mit den positiven Effekten von einigen pflanzlichen Stoffen zur AD-Therapie beschäftigt haben.

Zu diesen Naturstoffen gehören Grüntee-Extrakt, Flavonoide und Ginkgo-Biloba-Extrakt.

Grüntee-Extrakt

Tee ist das am häufigsten konsumierte Getränk weltweit. Grüner Tee wird aus den jungen, frischen Blättern der Teepflanze (*Camellia sinensis* L.) gewonnen, die zunächst mit Wasserdampf erhitzt, dann gerollt und bei hohen Temperaturen getrocknet werden. Grüner Tee gilt seit mehr als 4000 Jahren als Gesundheitstrank mit erstaunlicher Einsatzvielfalt. Viele Studien wurden durchgeführt um seine heilkräftigen Wirkungen zu beschreiben (Weisburger 1999). Grüner Tee enthält Polyphenole, Carotinoide, Flavonoide, Saponine, ätherische Öle, Coffein, die Aminosäure L-Theanin, Antioxidantien (z. B. die Vitamine A, B2, B12, C und E) und viele Mineralien wie Aluminium, Calcium, Eisen, Fluor, Kalium, Magnesium, Natrium, Spurenelemente und Phosphor (Yamamoto 1997). Grüner Tee enthält zwei Arten von Polyphenolen: Catechine und Gallate (Abb. 5). Die Epigallocatechingallate wirken auf das Tumorstadium hemmend (Fujiki 1999). Grüner Tee kann als Diuretikum wirken. Catechin, welches im grünen Tee vorkommt, kann den Anstieg von Cholesterol im Blut vermindern (Osada et al. 2001).

Catechin kann auch die Aktivität des Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) inhibieren, hierdurch kontrolliert es den erhöhten Blutdruck (Hara et al. 1987). Eine experimentelle Tierversuchsstudie zeigte, dass grüner Tee den Blutzucker senken kann (Shimizu et al. 1988). Grüner Tee wirkt als Entzündungshemmer (Haqqi et al. 1999) und als Antioxidans durch den Anstieg der GSH-Konzentration (Benzie et al. 1999). Es wurde belegt, dass Grüntee als Antioxidans 20-mal stärker als Vitamin E wirkt.

Dadurch soll er den Alterungsprozess inhibieren (Okuda et al. 1983). Es wurde vermutet, dass das regelmäßige Trinken von Grüntee vor der AD schützen kann. Es wird aufgezeigt, dass Grüntee die Acetylcholinesterase inhibieren kann (Okello et al. 2004). Acetylcholinesterase-Hemmer sind für die Behandlung der AD zugelassen, deshalb besitzt Grüntee für die Behandlung eventuell eine Bedeutung.

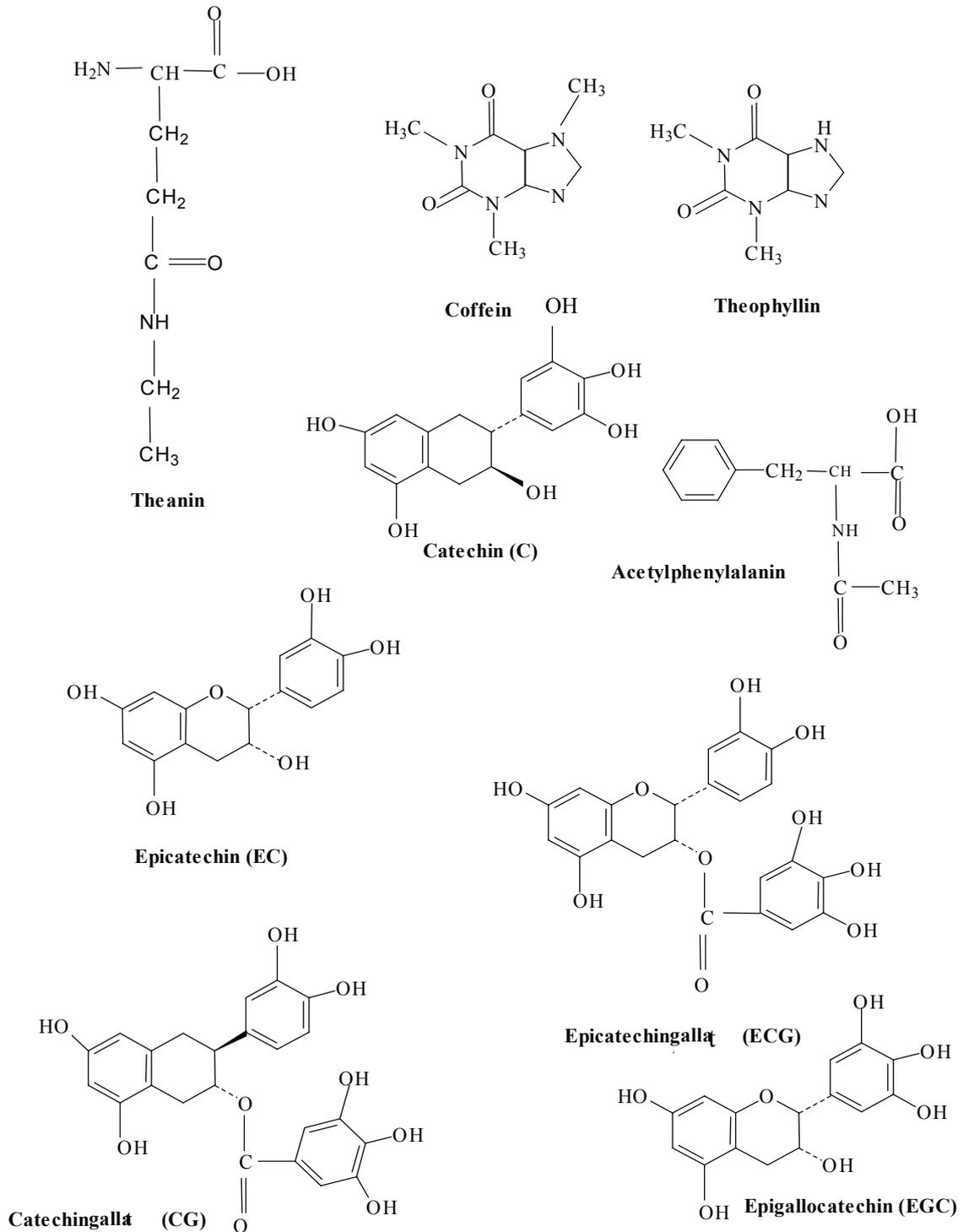


Abbildung 5: Chemische Struktur der Inhaltsstoffe aus *Camellia sinensis* L.

Flavonoide

Flavonoide und Biflavonoide bilden eine häufig vorkommende Gruppe von Polyphenolen, die sich in den Blättern, in den Samen, in der Fruchthaut oder -schale, in der Rinde und in den Blüten konzentrieren. Viele Flavonoide haben antibakterielle, entzündungshemmende, antiallergische, antimutagene, antivirale, antineoplastische, antithrombotische und vasodilatatorische Eigenschaften (Knekt et al. 2002).

In einer Reihe von Studien wird gezeigt, dass Flavonoide starke Antioxidantien sind. Sie können die Hydroxyradikale, Superoxidanionen und die Lipidperoxyradikale inaktivieren (Schmitt-Schillig et al. 2005).

Die Flavonoide können freie Radikale unschädlich machen, die im Körper die Entstehung und die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs, Entzündungen, Arthritis und AD begünstigen können (Hertog et al. 1995).

Ginkgo-biloba-Extrakt

Ginkgo-biloba-Extrakt (EGb 761[®]) wird aus den Blättern von *Ginkgo biloba* L. gewonnen. Es enthält Substanzen, die positive Wirkungen auf Zellen des Gehirns haben. EGb 761[®] enthält zwei Anteile: Der Flavon-Anteil enthält Quercetin, Kampferol und Isorhamnetin. Der Anteil ohne Flavon enthält Bilobalid und Ginkgolide A, B, C und J (Abb. 6) (DeFeudis 1998). EGb 761[®] enthält auch Biflavonoiden wie, Amentoflavon, Bilobetin und Ginkgetin.

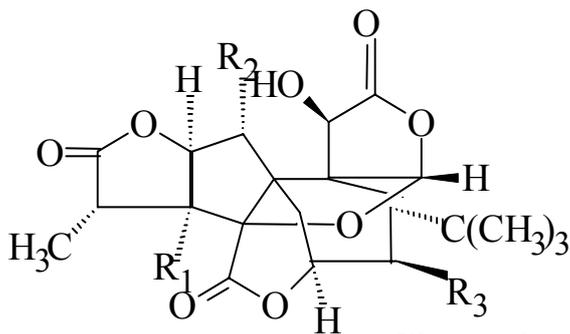
Zahlreiche Studien zeigten, dass Ginkgo-biloba-Extrakt EGb 761[®] die Neurone schützen kann. Es wird belegt, dass die Aufnahme von EGb 761[®] oder Bilobalid vor Ischämie schützt, die zum Neuronentod führt (Chandrasekaran et al. 2001). Ginkgo biloba hat auch einen Effekt als Antioxidans (McKenna et al. 2001).

Während der letzten 25 Jahre bestätigten zahlreiche Studien die positive Wirkung des Ginkgospezialextrakts EGb 761[®] auf die mentale Kompetenz und die emotionale Befindlichkeit von Patienten mit kognitiven Störungen vaskulärer Ursache und Demenz vom Alzheimer-Typ.

Eine Studie zeigte einen deutlich positiven Effekt des Ginkgo-biloba-Extrakts EGb 761[®] auf die subjektive emotionale Befindlichkeit gesunder älterer Menschen (Gieza et al. 2003). Der Ginkgoextrakt (EGb 761[®]) und Ginkgolid B können Neurone vor der Toxizität von Glutamat durch Reduktion des Anstiegs von intrazellulären Calcium (Ca^{2+}) schützen (Zhu et al. 1997).

Eine weitere Studie belegt, dass Ginkgo-biloba-Extrakt (EGb 761[®]) bei Alzheimer-Patienten wirkt. Der Anteil von EGb 761[®] ohne Flavone besitzt Neuronenschutz und Antiapoptose-Effekte, speziell das Bilobalid (Ahlemeyer and Krieglstein 2003).

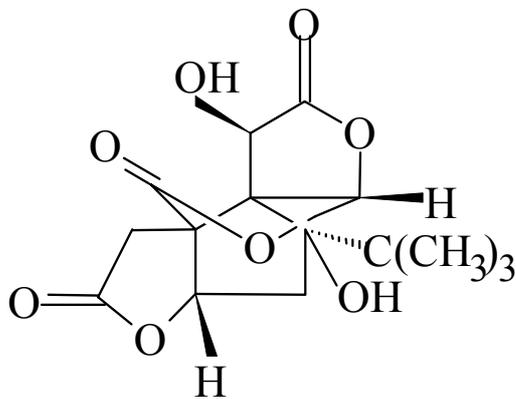
EGb 761[®] schützt die Neurone vor oxidativem Stress, der durch Hydroperoxide (Oyama et al. 1996), Apolipoprotein E (Schindowski et al. 2001) und A β -Peptide (Zhou et al. 2000) induziert wird.



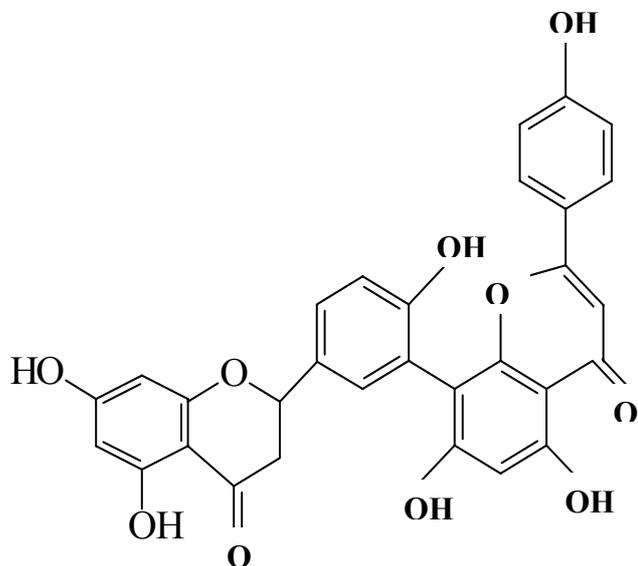
Ginkgolid A (GA): $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$

Ginkgolid B (GB): $R_1 = R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$

Ginkgolid C (GC): $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$



Bilobalid



Amentoflavon

Abbildung 6: Chemische Struktur der Inhaltsstoffe aus *Ginkgo biloba* L.

Weitere Ansätze

Nichtsteroidale Antirheumatika (NSARs)

Mehrere Studien wiesen nach, dass Personen, die längere Zeit entzündungshemmende Medikamente einnahmen, ein niedrigeres Alzheimerisiko haben. Zurzeit laufen mehrere Interventionsstudien mit entzündungshemmenden Substanzen. Bis zum Vorliegen der Ergebnisse dieser kontrollierten Studien kann allein aufgrund von Resultaten epidemiologischer Studien die Einnahme von Entzündungshemmern jedoch nicht empfohlen werden. Einige Studien lassen verrufen, dass NSARs gegen die AD helfen könnten. NSARs können den Entzündungsprozess bremsen, deshalb könnten sie vor der Toxizität der Amyloid-Plaques schützen. Vorläufige Studien ergeben, dass eine dauerhafte Aufnahme von NSARs im Lauf des Lebens offenbar dazu beitragen kann, die Risiken an der AD zu erkranken, zu senken (In t’Veld et al. 2001; Szekely et al. 2004).

Chemotherapeutika

Ein Chemotherapeutikum scheint im Kampf gegen die AD zu helfen. Clioquinol bremst den Krankheitsverlauf und reduziert das Ausgangsmaterial für die Eiweißablagerungen. In Studien mit APP-Mäusen, die mit Clioquinol behandelt wurden, war eine Abnahme der Plaquedichte um 25 % zu messen, eine Verminderung von unlöslichem A β um 49 % und ein Anstieg an löslichem A β um etwa 50 %. In den APP-Mäusen wurde das APP durch eine Überexpressions-Mutation (Lys670 \rightarrow Asn, Met671 \rightarrow Leu) umgestaltet. Diese Veränderung führte dazu, dass das normale Lernen, das Gedächtnis und die Erinnerung ab 9 bis 10 Monaten von Alter behindert wurde.

Ein Anstieg an Cu und Zn ist im Hirngewebe der behandelten Mäuse zu messen. Clioquinol kann so den Cu-Gehalt im Gehirn erhöhen und damit ähnliche Effekte erreichen wie ein Kupferzusatz im Trinkwasser (Cherny et al. 2001).

B-Vitamine und Folsäure

Bei einem Mangel an B-Vitaminen ist Homocystein deutlich erhöht (Seshadri et al. 2002; Quadri et al. 2004). Hohe Homocysteinwerte lassen sich wirksam und kostengünstig durch die Gabe der Vitamine B6, B12 und Folsäure senken. In einer placebo-kontrollierten Studie konnte die tägliche Einnahme von Vitaminpräparaten den Gehalt von Homocystein im Blut im Lauf von wenigen Wochen um fast die Hälfte senken. B-Vitamine können Demenz-Erkrankungen vorbeugen. Eine Tierstudie zeigte,

dass Folsäure eine wichtige Rolle spielt. Folsäure schützt das Gehirn vor der AD und ist vermutlich an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt (Kruman et al. 2002).

Kupfergaben

Durch Studien verstärkten sich die Hinweise, dass Kupfergaben bei der Therapie helfen könnten. Tierstudien ergaben, dass die Bildung schädlicher Ablagerungen im Gehirn durch Kupfergaben verringert werden kann (Phinney et al. 2003).

Omega-3-Fettsäuren

Fisch und Meeresfrüchte enthalten mehrfach ungesättigte Fettsäuren, speziell Omega-3-Fettsäuren. Omega-3-Fettsäuren können entzündliche Prozesse im Gehirn verringern und spielen eine Rolle bei der Entwicklung und Regeneration von Nervenzellen. Omega-3-Fettsäuren, die in Fischen vorhanden sind, hemmen den oxidativen Stress. Es gibt Hinweise darauf, dass Omega-3-Fettsäuren das Risiko einer AD-Erkrankung senken. Senioren, die durchschnittlich einmal pro Woche Fisch essen, hatten ein deutlich geringeres Risiko zu erkranken, als solche, die kaum oder keinen Fisch zu sich nahmen (Barberger-Garteau et al. 2002).

Inhibitoren von „Advanced Glycation Endproducts“

An Proteine gebundener Zucker, die so genannten „Advanced Glycation Endproducts“ (AGEs), lagern sich verstärkt im Gehirn von Alzheimer-Patienten ab und vernetzen sich untereinander. Die Vernetzung der AGEs im Gehirn kann durch eine neue Substanzklasse, die „AGE-Inhibitoren“, verhindert werden. AGEs aktivieren Signalkaskaden in den Zellen des Gehirns, insbesondere die Immunzellen des Gehirns (Gliazellen). Die bilden daraufhin Botenstoffe und schütten freie Radikale aus, diese den schädlichen Effekt der Amyloid-Plaques verstärken (Munch et al. 1997; 2003).

Impfstoffe

Eine Tierversuchsstudie hatte mit Impfstoffe gegen Amyloidpeptide gute Ergebnisse gezeigt. Sie gründet sich auf aktive oder passive Immunisierung und die Entfernung von A β mit Antikörpern. Es gibt neue Hinweise darauf, dass eine abgeänderte Version eines Alzheimerimpfstoffes sich möglicherweise neu für einen klinischen Einsatz qualifizieren könnte. Die Impfung zielt darauf ab, dass sich das Immunsystem des Betroffenen gegen das A β im Gehirn richtet. Im Rahmen der Studie wurde den Patienten A β injiziert, um die Bildung von Antikörpern anzuregen, welche sich an den

Plaques anlagern und diese für den Angriff von körpereigenen Immunzellen zu markieren. Der Impfstoff hat im Rahmen der klinischen Tests an 372 Patienten im Januar 2002 bei einigen Personen eine lebensbedrohliche Gehirnentzündung ausgelöst, woraufhin die Studie unverzüglich abgebrochen wurde. Es ließ sich herausfinden, dass die Impfung bei zwei Dritteln der Untersuchten möglicherweise Erfolge gezeigt hat. Allzu große Hoffnungen sind verfrüht, da eine weitere Entwicklung des Impfstoffes erst dann vielversprechend wäre, wenn die Ursachen der bei einigen Patienten aufgetretenen gefährlichen Entzündung restlos geklärt werden. Ein möglicher Weg zu einem klinisch einsetzbaren Wirkstoff zu kommen, ist die Entfernung jener Abschnitte des Impf-Amyloids, welche für die Antikörperbildung zuständig sind. Alternativ dazu ist eine Passivimpfung möglich, bei der den Patienten fertige Antikörper injiziert werden (Schenk et al. 1999; DeMattos et al. 2001).

1.2 Neutrale Endopeptidase und Abbau von Amyloid-Plaques

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Naturstoffen hauptsächlich auf die Aktivität der Metallo-Protease Neutrale Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11) untersucht. Weiterhin wurde der Effekt von ausgewählten Naturstoffen, welche die Aktivität der NEP beeinflussten, auch auf die Aktivität der Peptidyl-Dipeptidase Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE, EC 3.4.15.1) untersucht, um herauszufinden, ob diese Substanzen die Aktivität der NEP spezifisch beeinflussten.

Trotz verschiedener EC-Klassifizierung besitzen die beiden Enzyme große Ähnlichkeit im Aufbau des aktiven Zentrums. Nach Art der zinkbindenden Liganden (hier His, His, Glu), deren Anordnung in der Aminosäuresequenz sowie der Beteiligung weiterer Aminosäuren (hier Glu) an der Katalyse, werden die beiden Enzyme der Familie „Gluzincins“ zugeordnet (Hooper 1994).

Bei der Entwicklung von Enzyminhibitoren wurden Substanzen synthetisiert, die als „mixed inhibitors“ mehrere Metallopeptidasen in ihrer Aktivität hemmen. Als Beispiele seien für NEP-ACE-Inhibitoren Mixanpril und Omapatrilat aufgeführt (Beaumont et al. 1996; Trippodo et al. 1998).

Eine weitere Gemeinsamkeit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyme ist ihre Lokalisation in bzw. an der Zelle. Als Ektoenzyme sind sie an der Außenseite der Zellmembran lokalisiert. Neben einem kurzen intrazellulären Bereich und einer Trans-Membran-Region ragt der Hauptteil, einschließlich des aktiven Zentrums, in den Extrazellulärraum hinein (Vlahovic und Stefanovic 1998; Konkoy und Davis 1996).

Enzyme stellen eine große Proteingruppe im menschlichen Organismus dar. Sie sind an der Synthese aller körpereigenen Moleküle beteiligt und auch für deren Modifikation und Abbau vorwiegend zuständig. Von den enzymatischen Abbauvorgängen sind die proteolytischen Prozesse von zentraler Bedeutung für essentielle Lebensfunktionen. Sie bewirken nicht nur den Proteinabbau in Zellen und Körperflüssigkeiten (katabole Funktion), sondern sind auch für die Regulation verschiedenster biologischer Prozesse unentbehrlich (anabole Funktion). So werden viele Peptide/Proteine zunächst als inaktive Vorstufen synthetisiert und erst unter geeigneten Bedingungen durch eine gezielte limitierte Proteolyse aktiviert.

Enzyme, die Peptidbindungen spalten können, Peptidasen bzw. Proteasen, bilden innerhalb der Hydrolasen die Untergruppe 3.4 Nach ihrem Angriffspunkt im

Substratmolekül werden die proteolytischen Enzyme weiter in Endo- und Exopeptidasen unterteilt (Abb. 7).

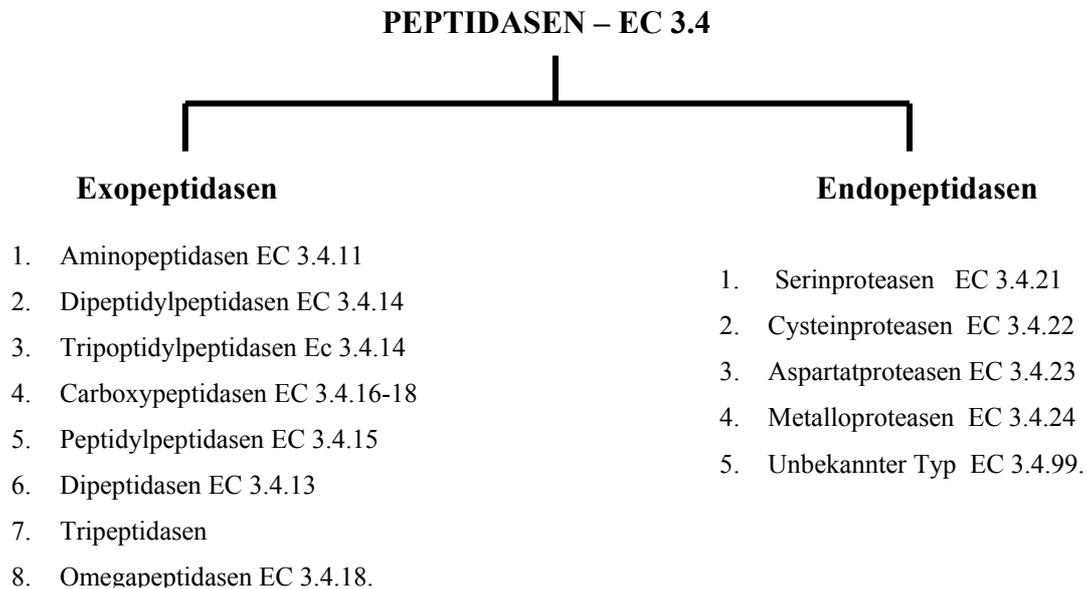


Abbildung 7: Klassifikation der Hydrolasen der Untergruppe 3.4 (Peptidasen; modifiziert nach McDonald, 1986).

Neben dieser EC-Klassifikation existieren noch weitere Klassifikationen, die auf der cDNA-Sequenz der Peptidasen, ihren Strukturdaten oder auf den im aktiven Zentrum befindlichen Aminosäuren basieren (Rawlings and Barrett 1993). Entsprechend dieser Ordnung werden Peptidasen erst nach ihrem katalytischen Typ und dann in Familien von evolutionär eng verwandaten Enzymen unterteilt:

1. Serintyp - 22 Familien (S1-S22)
2. Cysteintyp - 14 Familien (C1-C14)
3. Aspartattyp - 2 Familien (A1-A2)
4. Metallotyp - 25 Familien (M1-M25)
5. Unbekannter Reaktionstyp - 21 Familien (U1-U21).

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Beziehung der NEP zur AD. Die NEP ist ein im Säugetierorganismus weit verbreitetes Enzym. Sie beeinflusst eine Vielzahl von physiologischen/ pathophysiologischen Prozessen, indem sie endogene Mediatoren mit Peptidstruktur hydrolysiert. Sie ist in vivo für die Spaltung einer Vielzahl von Peptidhormonen bzw. –neurotransmittern verantwortlich, die oft aus nicht mehr als 10 bis 15 Aminosäuren bestehen, z. B. Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin, Substanz P oder Bradykinin. Allerdings sind auch größere Substrate der NEP bekannt, z. B. das Atriale Natriuretische Peptid (ANP, 28 Aminosäuren) oder das Neuropeptid Y (NPY, 36

Aminosäuren), darüber hinaus auch Peptide, die weder Neurotransmitter sind, noch Hormoncharakter haben, wie das AD-Peptid β -Amyloid (42 Aminosäuren).

1.2.1 Definition, Funktion und physiologische Bedeutung der NEP

Die neutrale Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11, weitere Synonyme Neprilysin, CD10, CALLA, Enkephalinase, Nullendopeptidase) ist eine Metallopeptidase, die für ihre Katalysefunktion Metal-Ionen (in der Regel Zink) als Cofaktor benötigt. Das Kation wird durch Chelatstrukturen an das Protein gebunden, das Substrat und ein Wassermolekül bilden weitere Liganden. Durch die Eigenschaft des Zentralatoms des Chelatkomplexes als Lewisäure wird das Substrat polarisiert, d. h., der Carbonylsauerstoff wird elektrophil. Das Wassermolekül wird ebenfalls durch die Wechselwirkung mit dem Metall-Ion aktiviert und es reagiert nukleophil. Das Ergebnis der Reaktion zwischen elektrophilem und nukleophilem Partner ist die hydrolytische Spaltung einer Peptidbindung des Substrates (Schellenberger 1989; Hooper 1996).

Die NEP wurde zuerst als eine unbekannte Aktivität in der Bürstensaummembran von Rattennieren beschrieben. Präparationen daraus hydrolysierten *in vitro* bei neutralem pH-Wert die B-Kette des Insulins (Wong-Leung and Kenny 1968), deshalb wurde das Enzym „kidney brush border“ neutrale Proteinase genannt. 1974 wurde die NEP aus Rattennieren homogen isoliert und als Metallopeptidase erkannt. Sie katalysiert vorzugsweise die Spaltung an der Aminogruppe der hydrophoben Überreste der B-Kette des Insulins (Kerr and Kenny 1974). NEP macht ungefähr 4 % der Proteinmasse der Bürstensaummembran der Niere aus. Das Enzym wurde 1987 kloniert und sequenziert (Devault et al. 1987). Hierbei wurde die Identität mit dem Leukozyten-Oberflächenantigen „common acute lymphoblastic leukemia antigen“ (CALLA oder CD 10) erkannt (Letarte et al. 1988). Der Name Neprilysin wurde von der IUBMB wegen der vielfältigen Bezeichnungen für diese Peptidase vorgeschlagen.

Die NEP wird bei der EC-Klassifizierung der Enzymnummer 3.4.24.11 zugeordnet (Teuscher 1997). Die Molmasse der NEP variiert in den verschiedenen Geweben von ca. 85 bis 100 kDa, abhängig vom Ausmaß der Glykosylierung an fünf bis sechs Glykosylierungsstellen. Mindestens vier Disulfidbrücken innerhalb des Proteins sind wichtig für die Aufrechterhaltung von Struktur und Aktivität (Tam et al. 1985). Insgesamt sind zwölf Cysteine im Molekül enthalten, von denen zehn innerhalb der gesamten M13-Familie der Metallopeptidasen konserviert sind. Die NEP als integrales Membranprotein vom Typ II ist in der Plasmamembran verankert mit Orientierung des

Aminoterminus zum Zellinneren und des Carboxyterminus zum Extrazellularraum. Der größte Teil des Moleküls inklusive des katalytischen Zentrums befindet sich im Extrazellularraum, weshalb auch von einem Ektoenzym gesprochen wird. In den meisten Spezies existiert die NEP als nichtkovalent assoziiertes Homodimer (Fulcher and Kenny 1983). Im Zentralnervensystem (ZNS) ist die NEP meist auf axonalen Membranen und in der perisynaptischen Region der Neurone prä- und postsynaptisch lokalisiert, oft in räumlicher Nähe mit dem Produktionsort ihrer Substrate oder mit deren Rezeptoren. Deshalb wird die NEP im ZNS auch als „Cholinesterase der peptidergen Synapsen“ bezeichnet (Turner et al. 2003). Die NEP wurde in hoher Konzentration im Striatum, im olfaktorischen Tuberkel, in der Substantia Nigra, im Choroidplexus, im endopeduncularem Kern, sowie im Kleinhirn gefunden. NEP existiert in löslicher Form im menschlichen Plasma und in der Zerebrospinalflüssigkeit. Im Zentralnervensystem (ZNS) trägt NEP als synaptische Peptidase zum Abbau der opioiden Peptide bei, weshalb die NEP auch die Bezeichnung Enkephalinase erhielt (Roques et al. 1980). Die NEP ist eine typische Zink-Metallopeptidase, die das kationische HeXXH-Zink-bindende Motiv sowie eine konservierte Übereinstimmung der Reihenfolge EXXA/GD besitzt, in der Glutamat als dritter Zinkligand dient. Das Enzym ist als „gluzincin“ der M13 Peptidase Familie kategorisiert (Barrett et al. 1998). Die NEP besteht aus einer 23-Aminosäuren enthaltenen N-terminalen zytoplasmatischen Domäne, einer 28-Aminosäurenmembran überspannenden Domäne und einer ungefähr 700-Aminosäuren umfassenden extrazellulären Domäne. Letztere enthält das aktive Zentrum. Die NEP spaltet Oligopeptide auf der N-terminalen Seite von hydrophoben Aminosäuren (Phe, Met, Leu). Als Substrate für NEP dienen das atrial-natriuretische-Peptid (ANP), Enkephaline, Endorphine, Substanz P und Bradykinin (Kenny 1988; Turner et al. 2001).

Das Enzym wird hauptsächlich durch EDTA, Phosphoramidon und Thiorphan gehemmt und wird durch Zink reaktiviert (Abb. 8). NEP-Inhibitoren erzeugen durch eine Halbwertszeitverlängerung der endogenen Opioiden oder vasoaktiven Peptide eine physiologische Analgesie und/oder Blutdrucksenkung (Chipkin et al. 1985; Roques and Beaumont 1990; Chen et al. 1998; Robl et al. 1997).

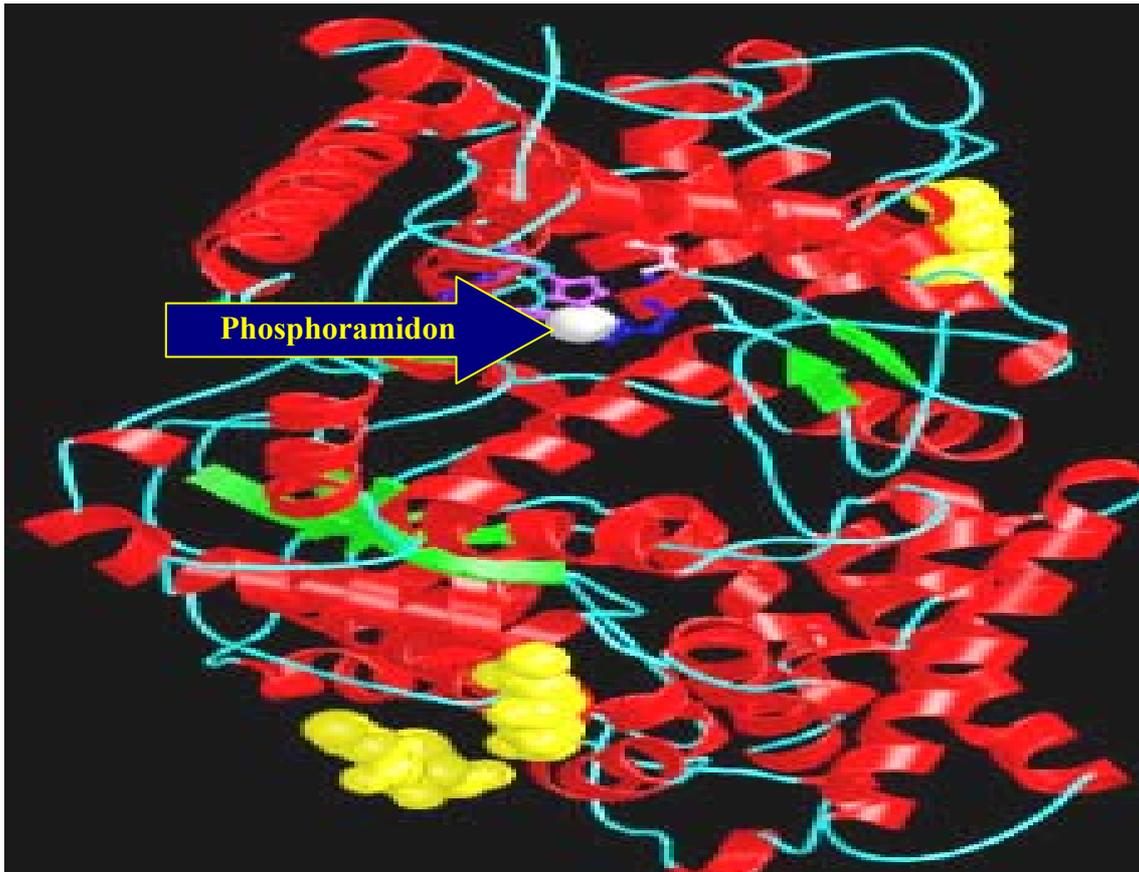


Abbildung 8: Die Struktur von Neprilysin mit Phosphoramidon (<http://www.biochem.ucl.ac.uk>).

Das Gen für die NEP existiert in einer einzelnen Kopie. Es umspannt mehr als 80 kb, besteht aus 24 Exons und ist innerhalb der Säugetiere hochkonserviert (D'Adamio et al. 1989). Das Gen wurde 1989 auf die chromosomale Region 3q21-q27 lokalisiert (Barker et al. 1989). Neuere Untersuchungen haben die Region auf 3q25.1-25.2 eingegrenzt (GeneCards 2004). Die Klonierung der cDNA ergab bei den untersuchten Säugerspezies relativ einheitliche Moleküllängen: 750 Aminosäuren beim Kaninchen (Devault et al. 1987), 742 Aminosäuren bei der Ratte (Malfroy et al. 1987) und 752 Aminosäuren für die menschliche NEP (Malfroy et al. 1988).

NEP ist ein weit verbreitetes, wenn auch nicht ubiquitär vorkommendes Enzym auf der Oberfläche von Säugetierzellen. Die bei weitem höchste Aktivität weist die NEP in der Bürstensaummembran der proximalen Tubuli und Glomeruli der Niere auf. Im Lunge, Darm, Plazenta, Prostata und dem Plexus chorioides des Auges konnten ebenfalls höhere NEP-Aktivität nachgewiesen werden. In vielen weiteren Geweben und Zellarten, wie z. B. im Gehirn, den Ovarien, im Fettgewebe oder im Pankreas, tritt sie mit geringeren Aktivitäten in Erscheinung, kann dort aber ebenso wichtige Aufgaben erfüllen. Im Blut und im Seminalplasma kommt die NEP in einer löslichen Form vor. Vermutlich wird sie hier durch unspezifische Abschilferungsprozesse oder in Analogie

zum Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) durch Sekretasen von den Zellmembranen der Blutgefäße bzw. der Leydig-Zellen in den Testes enzymatisch abgelöst (Soleilhac et al. 1996). Die besonders hohe Aktivität der NEP in der Niere und der Lunge versetzt das Enzym in die Lage, wichtige blutdruckregulierende Peptide wie ANP und den stärksten bekannten Vasokonstriktor, Endothelin-1, aus dem Blutkreislauf abzufangen und zu inaktivieren (Kenny et al. 1988; Yamaguchi et al. 1992). Hierbei zeigt sich das oftmals ambivalente Verhalten der NEP, da das ANP erheblich zur Natriuresis und damit zur Senkung des Blutdrucks beiträgt, wohingegen Endothelin-1 durch Verengung der Gefäße blutdrucksteigernd wirkt. Außerdem bewirkt das Enzym die Umsetzung von Angiotensin II zum vasodilatatorischen und kardioprotektiven Angiotensin (1-7) und entzieht damit dem Blutkreislauf das vasokonstriktorische Angiotensin II. Aus solchen in vitro oder in einfachen physiologischen Abbaubersuchen gewonnenen Erkenntnissen lässt sich nur bedingt die physiologische Hauptwirkung bei der Hemmung des Enzyms vorhersagen. Der therapeutische Nutzen von NEP-Inhibitoren in der Bluthochdruck-Therapie wurde allerdings deutlich durch kombinierte Inhibitoren, so genannte Vasopeptidase-Hemmer, übertroffen (d'Uscio et al. 2001).

Eine weitere wichtige Funktion übt die NEP beim Metabolismus chemotaktischer und proinflammatorischer Peptide aus, was z. B. bei Entzündungsprozessen der Lunge eine Rolle spielt, bei denen die Aktivität der NEP deutlich reduziert ist (Shipp et al. 1991a). Kürzlich ist NEP als ein wichtiges extrazelluläres Enzym im Gehirn identifiziert worden, dass A β abbauen kann (Shirohane et al. 2001). Wegen dieser Rolle bei der AD steht die NEP in den letzten Jahren im Mittelpunkt des Interesses vieler Peptidase-Forscher.

NEP spielt auch eine wichtige Rolle bei verschiedenen Krebserkrankungen. Es wird vermutet, dass die Hemmung von NEP in der Lunge durch Zigarettenrauch mit der Entwicklung des kleinzelligen Lungenkarzinoms in Verbindung gebracht werden kann (Shipp et al. 1991). Die Aktivität der NEP wird auch bei bestimmten Formen von Prostatakrebs gehemmt. Diese Hemmung bewirkt, dass die Androgen-unempfindliche Tumorprogression von mitogenen Peptiden gefördert wird (Papandreou et al. 1998).

Eine verstärkte NEP-Expression kann zur Apoptose in Prostatakarzinomzellen und in Jurkat-T-Zellen gebunden an der Proteinkinase C (PKC) führen (Mari et al. 1997; Sumitomo et al. 2000). Auch in der Plazenta befindet sich NEP.

NEP könnte weiter eine physiologische Rolle in der Erhaltung der Schwangerschaft durch Verminderung von spezifischen bioaktiven Peptiden, wie dem Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH), spielen (Mizutani et al. 1995; Ino et al. 2000).

1.2.2 Abbau von Amyloid-Plaques

Der Grad der A β -Akkumulation ist von seiner Produktion und von seinem Abbau abhängig. Bei jungen und gesunden Menschen erfolgt die Degradation von A β schnell. Sie geschieht, bevor A β im Gehirn abgelagert werden kann. Ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Abbau von A β ist für die Degeneration der Neurone und so für die Entwicklung der AD verantwortlich (Glabbe 2000). Obwohl beträchtliche Aufmerksamkeit auf das Verständnis der Enzyme und ihrer Prozesse gerichtet worden ist, die an der Bildung von A β beteiligt sind, fehlen immer noch Kenntnisse hinsichtlich der Prozesse, durch die A β normalerweise entfernt und abgebaut wird. Eine Stimulation des Abbaus von A β soll dazu führen, dass die Ablagerung von A β vermindert wird. Der Abbau von A β kann in der Form des Transports des A β -Peptids in der Zerebrospinalflüssigkeit (periphere Clearance), durch Bindung an die Proteine, die das A β in einer nichtaktiven Form sequestrieren oder durch direkten enzymatischen Abbau geschehen. Die Stimulation von Proteasen, die A β degradieren, gilt als neuer therapeutischer Ansatz um Ablagerungen von A β zu verhindern und damit zur Behandlung der AD (Leissring et al. 2003). Neue Berichte zeigten eine wichtige Rolle für das Insulin-abbauende-Enzym (IDE) im Abbau von A β . IDE kann A β und APP abbauen. IDE-Mangel führte zu einer mehr als 50%-igen Abnahme im Abbau des A β -Peptids in Membran-Fractionen des Gehirns und in primären neuronalen Zellkulturen (Farris et al. 2003). Auch Plasmin kann das A β -Peptid abbauen (Iwata et al. 2000; Tucker et al. 2002; Iwata et al. 2001, Exley and Korchazhkina 2001; Ledesma et al. 2000). Das Angiotensin Converting Enzyme (ACE; EC 3.4.15.1) kann die Aggregation, die Ablagerung und die Zytotoxizität von A β durch Abbau von A β (1-40) an Asp7-Ser8 in vitro hemmen (Hu et al. 2001).

Auch Matrix Metalloproteinase-9 (EC 3.4.24.15) und der α -2-Macroglobulin-Komplex können das A β -Peptid abbauen (Yamin et al. 1999; Qiu et al. 1996).

In verschiedenen Zell- und in vitro-Modellen wurde gezeigt, dass ECE-1 (Endothelin Converting Enzyme-1) and ECE-2 (Endothelin Converting Enzyme-2) intrazellulär die

A β -Peptide abbauen können. ECE-1 and ECE-2 begrenzen damit die Akkumulation von A β im Gehirn (Eckman et al. 2003).

1.2.3 Bedeutung der NEP für den Abbau der Amyloid-Plaques

In der Literatur wurde über den Einfluss von NEP auf die β -Amyloid-Konzentration im Gehirn von Knock-out-Mäusen berichtet, da NEP A β in vivo abbauen kann (Iwata et al. 2001; Selkoe 2001b; Marr et al. 2003; 2004). Die wichtige Rolle von NEP für den Abbau des A β -Peptids wurde durch Infusion des Metalloprotease-Inhibitors Thiorphan in den Hippocampus von Ratten gezeigt. Diese Infusion zeigte einen eingeschränkten A β -Abbau durch Hemmung von Neprilysin (Iwata et al. 2000). Es ist auch wichtig festzustellen, dass die Wirkung von NEP in vivo im Gehirn für A β selektiv ist. Denn ein Mangel an NEP im ZNS erhöht nicht die Konzentration solcher Neprilysinsubstrate, wie Enkephalin, Cholecystokinin, Neuropeptide Y und Substanz P. Folglich sind andere Mechanismen für den Abbau dieser Peptide verantwortlich (Saria et al. 1997). Die NEP-Konzentration ist vor allem in den Bereichen gering, in denen sich die Amyloid-Plaques befinden (Akiyama et al. 2001; Reilly 2001; Yasojima et al. 2001a; b). Es wurde weiterhin gezeigt, dass nur die Hemmung von NEP, aber von keiner anderen Peptidase dazu führte, dass die Konzentration von A β im Gehirn erhöht wurde (Iwata et al. 2000; 2001; Marr et al. 2004). Die verstärkte Gen-Expression von NEP verringert dagegen die A β -Konzentrationen in vitro. Es wurde untersucht, ob sich NEP als mögliches therapeutisches Target nutzen lässt, um die Ablagerung von A β im Gehirn zu verhindern. Die Gabe von NEP-exprimierenden Lentiviren in den Hippocampus von transgenen Mäusen führt zu einer ca. 50%-igen Verringerung der Menge an A β -Plaques (Marr et al. 2003; 2004). Auch eine Infektion primärer Neurone mit einem Sindbis-Vektor, der NEP-Expression induziert, verringert die A β -Produktion in vitro (Hama et al. 2001). Das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) kann die NEP-Expression induzieren (Kikkawa et al. 2004). Außerdem gibt es einen indirekten Zusammenhang zwischen der Expression von NEP und der Empfindlichkeit zur Bildung von A β -Plaques in Mäusen (Fukami et al. 2002). Es ist unklar, ob der genetische Hintergrund von NEP an der Ätiologie der AD beteiligt ist, da die genetische Analyse keine Wechselbeziehung zwischen dem Ort der NEP-Expression und dem Risiko für die Entstehung der AD zeigte (Sodeyama et al. 2001; Oda et al. 2002). Eine neue Studie zeigte, dass NEP-Genpolymorphismen die Ablagerung von A β verstärken und auch das

Risiko an der AD zu erkranken erhöhen (Clarimon et al. 2003; Helisalmi et al. 2004). In einer weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass das Lebensalter die Aktivität von NEP beeinflusst (Kletsas et al. 1998). Die effektivste Wirkung von NEP entfaltet sich nur am Anfang des Verlaufs einer AD (Mohajeri et al. 2004). Die NEP-Expression und -Aktivität speziell im Hippocampus und Neocortex sind vom Alter abhängig. Sie nehmen mit dem Alter ab. Dies scheint ein natürlicher Prozess bei Mäusen und anderen Nagetieren in den frühen Stadien der sporadischen AD zu sein (Fukami et al. 2002; Iwata et al. 2002; Yasojima et al. 2001a; b). Es wurde bewiesen, dass die „lipid-rafts“ der Zellmembranen, in welchen NEP nachweisbar ist (Angelisova et al. 1999; Kanemitsu et al. 2003), an der Bildung von A β beteiligt sein könnten (Wolozin 2001; Cordy et al. 2003).

Zusammenfassend lässt sich darauf feststellen, dass NEP ein vielversprechendes therapeutisches Target für die Behandlung von der AD sein könnte.

1.3 Ziele der Arbeit

Die Alzheimer-Demenz (AD) stellte eine Erkrankung mit schlechter Prognose und unbefriedigenden Behandlungsmöglichkeiten dar. Daher sind neue Therapieansätze dringend erforderlich.

In den letzten Jahren hat die Neutrale Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11) als interessante neue Zielstruktur in der Alzheimertherapie immer mehr Beachtung gefunden.

Die NEP kann die Amyloid- β -Peptide (A β), welche für die AD charakteristisch sind, abbauen und ist daher mit der Pathogenese von der AD verbunden. Die Induktion des NEP-Enzyms kann den Abbau von A β katalysieren und damit die Ablagerung von A β in den Gehirnzellen verhindern. Zur Steigerung der NEP-Aktivität stehen jedoch bislang noch keine Arzneimittel zur Verfügung.

Ziel dieser Arbeit ist es, nach Naturstoffen zu suchen, die die Aktivität der NEP erhöhen können. Anschließend sollten Ansätze zu möglichen Wirkungsmechanismen der vermuteten neuroprotektiven Wirkung der ausgewählten Drogen und Naturstoffe bei neurodegenerativen Erkrankungen aufgezeigt werden. Der Einfluss von ausgewählten Arzneipflanzenextrakten (Ginkgo, Grüner Tee), phenolischen und anderen Naturstoffen (Flavonoide, Proanthocyanidine, Alkaloide), die als Neuroprotektiva bekannt sind, sollte auf die NEP-Aktivität der humanen Neuroblastomazelllinie (SK-N-SH) untersucht werden.

Ferner sollte der Effekt der gesteigerten NEP-Aktivität auf die Menge der endogen produzierten und ins Medium sezernierten A β 1-42, welche eine größere Tendenz als andere A β zu aggregieren hat, und der Zusammenhang zwischen der Erhöhung des zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) und der NEP-Aktivität untersucht werden.

Zusätzlich sollte der Einfluss von ausgewählten Naturstoffen, welche die Aktivität der NEP erhöhen, auf das Angiotensin-Konversionsenzym (Angiotensin-Converting Enzyme, ACE) untersucht werden, um die Spezifität dieser Naturstoffe auf die NEP-Aktivität zu prüfen.

Im Rahmen der Untersuchungen sollte somit der Frage nachgegangen werden, ob und in welchem Ausmaß ausgewählte Drogen in der Lage sind, ein für die Verhinderung neurodegenerativer Erkrankungen wichtiges Enzym, die NEP, zu induzieren und damit einen naturwissenschaftlich begründbaren Mechanismus zum therapeutischen Einsatz zu bieten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Allgemeine Hinweise

Alle Puffer und Lösungen wurden - falls nicht anders angegeben - mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Die verwendeten Materialien für die Zellkultur waren entweder vom Hersteller steril verpackte Einmalartikel oder sie wurden vor ihrer Verwendung in einem Autoklaven bei 121 °C 20 min dampfsterilisiert. Sofern bei einigen der folgenden Methoden und Inkubationsschritte keine Temperatur angegeben worden ist, wurde bei Raumtemperatur gearbeitet.

2.2 Geräte

2.2.1 Zellkultur

- Begasungsbrutschrank Cellstar; Nunc Intermed GmbH, Wiesbaden, Deutschland
- CASY-Zellzählgerät; Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
- Gasbrenner Schütt Flamy S; Schütt GmbH, Göttingen, Deutschland
- Lichtmikroskop TMS-F; Nikon, Japan
- Mikroplattenphotometer Tecan Spectra Fluor; Tecan, Österreich
- Rundschüttler, SLT Shaker; Elmech GmbH, Celle, Deutschland
- SLT-Mikrotiterplattenreader; SLT Labinstrument, Wien, Österreich
- Sterile Laminar-Flow-Box Herasafe; Heraeus-Christ, Hanau, Deutschland
- Vakuumpumpe Vacusafe; Integra Biosciences, Schweiz
- Werkbank Clean Air CLF 360; Woerden, Niederlande.

2.2.2 Sonstige Geräte

- Analysenwaage AC 210 D; Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Fluoreszenzmikroskop BX 41; Olympus, Japan
- Heizbäder B-480/ 485; Büchi AG, Schweiz
- pH-Meter CG 817-T; Schott Geräte, Hofheim, Deutschland
- Spektrofluorometer RF-5001 PC, Fa; Shimadzu, Japan
- Trockenschrank WTB; Binder, Tutlingen, Deutschland
- Ultraschallbad Sonorex RK 100; Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
- Vortex Genie II; Scientific Industries, USA
- Wasserbäder 1002-1013, GFL, Burgwedel, Deutschland.

2.3 Verbrauchsmaterialien

2.3.1 Untersuchungsmaterialien

- Amentoflavon; Roth, Wiesbaden, Deutschland
- Apigenin; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Arabinosylcytosin HCl; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Bilobalid; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Coffein; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Curcumin; Eastman, USA
- Deoxyepiganin; Frau Prof. Dr. Winterhoff, Münster, Deutschland
- (-)-Epicatechin; Roth, Wiesbaden, Deutschland
- (-)-Epigallocatechin (EGC); Roth, Wiesbaden, Deutschland
- (-)-Epigallocatechingallate (EGCG); Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Forskolin; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Ginkgolid A; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Ginkgolid B; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Ginkgo-biloba-Extrakt; Schwabe GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Grüner Tee Extrakt (EFLA[®]85942); Emil Flachsmann AG, Schweiz
- L-Theanin; Chromadex, USA
- Luteolin; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- N⁶, 2'-O-dibutylryladenosine-3', 5'-cyclic monophosphate, Sodium Salt; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- (-)-Nicotin, sterile; Roth, Wiesbaden, Deutschland
- Rolipram; MB Biomedicals, USA
- Theobromin; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Theophyllin; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Vinpocetin; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- 3,3',5'-Triiodo-L-Triiodotyronine, Sodium salt; Sigma, Deisenhofen, Deutschland.

2.3.2 Zellkultur

- 24/ 6-Well-Tissue Culture Plate; Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
- Casy Clean Lösung; Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
- Casy Ton Lösung; Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland

- Einmal-Injektionskanülen Gr. 1, Sterican; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Fetales Kälberserum (FBS); Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- Flüssigkeitsreservoir steril 55 ml; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Hämatoxylinlösung III nach Gill; Merck, Darmstadt, Deutschland
- MEM-Earle's; Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container; Nalge Nunc International, Großbritannien
- Natrium Pyruvat; Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- Nicht-essentielle Aminosäure; Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- Omnifix-Einmalspritzen 1 ml/ 2 ml/ 10 ml; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- PBS-Dulbecco-Puffer; Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- Sterilfilter Minisart, Porengröße 0.2 µm; Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Tissue Culture Flask 50/ 250 ml, steril; Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
- Trypsin/ EDTA Solution 0.05 %/ 0.02% (w/v); Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- Zentrifugenröhrchen 15/ 50 ml, steril; Corning Inc., USA.

Sterile Einwegware, wie Pipetten, Schraubdeckelröhrchen, Zentrifugenröhrchen und Gefäße für die Zellkultur wurden von den Firmen Nunc (Wiesbaden, Deutschland), Roth (Wiesbaden, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Greiner (Nürtingen, Deutschland) bezogen.

2.3.3 Chemikalien

- 7-Amino-4-methylcumarin (AMC); Serva, Heidelberg, Deutschland
- Aceton; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Bisbenzimid, (Hoechst33258); Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Desoxyribonucleic acid (DNA) Sodium salt, Type XIV: From Herring Testes; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Dimethylsulfoxid (DMSO); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Dinatriumhydrogenphosphat*12H₂O (Na₂HPO₄); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol (EtOH); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA); Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Formaldehyd; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glycerol; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Hämatoxylin-Lösung III nach Gill, Merck, Darmstadt, Deutschland
- HEPES, Hemisodium salt; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- H-Histidyl-L-Leucin (H-His-L-Leu); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin-OH* 4 H₂O; Bachem, Schweiz
- Isopropanol; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Leucin Aminopeptidase, microsomal (LAP) (EC: 3.4.11.2); Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Lisinopril; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Methanol (MeOH); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumchlorid; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumdihydrogenphosphat * H₂O (NaH₂PO₄); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumhydroxid; Merck, Darmstadt, Deutschland
- o-Phthalaldehyd; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Phosphoramidone disodium salt; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Salzsäure (HCl); Merck, Darmstadt, Deutschland
- SAAP-AMC (N-Succinyl-Ala-Ala-Phe-7-Amido-4-methylcumarin); Bachem AG, Schweiz.

2.3.4 Puffer und weitere Lösungen

- PBS-Puffer 150 mM NaCl, 8,33 mM Na₂HPO₄, 1,67 mM KH₂PO₄, pH 7,4
- HEPES-Puffer 50 mM HEPES, 154 mM NaCl, pH 7,4
- Phosphat-Puffer 83 mM K₂HPO₄*3 H₂O, 326 mM NaCl, pH 8,3
- DNA-Puffer 41 mM Na₂HPO₄ * 12H₂O, 9 mM NaH₂PO₄ * H₂O, 2 mM EDTA, pH 7,4 (2x konzentrierter DNA-Puffer für die Kalibriergerade)
- DNA-Stammlösung 1.0 mg DNA/ml H₂O
- Hoechst 33258 Stammlösung 1.0 mg/ml H₂O, Lagerung bei 4 °C
- Hoechst 33258 Arbeitslösung 10.0 µl Stammlösung + 990 µl H₂O PBS-Puffer.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivieren und Passagieren von SK-N-SH Zellen

SK-N-SH Zellen, (humane Neuroblastom-Zelllinie aus Knochenmarksmetastasen, ATCC Nr. HTB11) sind adhärent wachsende Zellen. Sie wurden in Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von $A = 25 \text{ cm}^2$ in 5 ml Minimal Essential Medium-(MEM mit Earls Salz) mit 10 % FBS, Natriumpyruvat und nicht-essentiellen Aminosäuren im Brutschrank bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5 % CO₂ und 95 % Luft enthielt, als Monolayer kultiviert.

Zum Passagieren wurde zunächst das Medium jede Woche abgesaugt und die maximal 90 % konfluent gewachsenen Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 2.5 ml Trypsin-EDTA-Lösung für ein bis zehn Minuten zugegeben. Die Trypsinlösung sollte nicht länger als 10 min auf den Zellen sein, da sie zellschädigend wirken kann. Nach Ablösung der Zellen durch leichtes Klopfen gegen den Kulturflaschenboden wurden sie von der Kulturflasche abgespült. Durch Zugabe von 30 ml frischem MEM Earle Medium (37 °C, 10 % FBS) wurde die Trypsinierung gestoppt und die Zellen durch mehrfaches Pipettieren suspendiert und in 24-Well-Platten á 1 ml vereinzelt.

Die übrig gebliebenen fünf bis sechs ml der Zellsuspension wurden in eine neue Zellkulturflasche mit einer Bodenfläche von $A = 25 \text{ cm}^2$ ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Während der nächsten 24 Stunden erfolgte kein weiterer Mediumwechsel oder eine andere Manipulation mit den frisch eingesäten Zellen. Mit jeder Passage nahm der Anteil gut proliferierender Zellen zu und der schlecht proliferierenden ab. Damit wurde die Zellkultur von Passage zu Passage uniformer und homogener (bis zu 40 Passagen). Sämtliche Arbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank.

2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Konservierung von Kulturzellen erfolgte durch Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff bei -195 °C. Nach Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen in einer konfluent bewachsenen Gewebekulturplatte (Durchmesser 100 mm, ca. 5×10^6 Zellen) abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Durch Zentrifugation (200 x g, 3 min) wurden die Zellen anschließend pelletiert und in 1.0 ml Einfriermedium (Medium, 10 % (v/v) FBS, 10 % DMSO) resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension

wurde in Kryoröhrchen überführt und innerhalb von zwei Tagen im Nalgene Cryo Freezing Container in Isopropanol kontinuierlich auf -80 °C abgekühlt. Für eine längere Lagerzeit wurde flüssiger Stickstoff verwendet.

Das Auftauen der Zellen erfolgte in einem Wasserbad (37 °C). Schrittweise wurden die Zellen im Medium ($5\text{ ml } 4\text{ °C}$) resuspendiert. Nach schonender Zentrifugation ($200 \times g$, 3 min) wurden die Zellen erneut im Medium resuspendiert. Zum vollständigen Auswaschen des aus dem Einfriermedium stammenden DMSO wurde dieser Vorgang erneut wiederholt. Die Zellen wurden zur ersten Passage mit Medium, dem 20% FBS zugesetzt wurde, kultiviert.

2.5 Methoden der Enzymbestimmungen

2.5.1 Bestimmung der Aktivität der NEP

2.5.1.1. Aufnahme einer Kalibriergeraden für 7-Amino-4-methylcumarin

Die NEP- Aktivitätsmessung beruht auf der Fluoreszenzmessung des 7-Amino-4-methylcumarin (AMC). Zunächst musste eine Kalibriergerade mit bekannten AMC-Konzentrationen erstellt werden und die dazugehörige Fluoreszenz wurde anschließend gemessen. Dafür wurden bei Raumtemperatur aus einer 1 mg/ml AMC-Stammlösung Verdünnungen von 10.0 ; 5.0 ; 2.5 ; 1.0 ; 0.5 und $0.1\text{ }\mu\text{g/ml}$ AMC mit HEPES-Puffer hergestellt und jeweils $50\text{ }\mu\text{l}$ der jeweiligen Verdünnung in 1.5 ml Eppendorfröhrchen gegeben.

Anschließend erfolgte in jedes Eppendorfröhrchen die Zugabe von $350\text{ }\mu\text{l}$ HEPES-Puffer und $800\text{ }\mu\text{l}$ Aceton. Nach sorgfältigem Mischen wurde jede AMC- Verdünnung drei-mal gegen einen Nullwert aus $350\text{ }\mu\text{l}$ HEPES-Puffer und $800\text{ }\mu\text{l}$ Aceton bei einer Extinktion von $\lambda_{\text{ex}} = 367\text{ nm}$ und einer Emmision von $\lambda_{\text{em}} = 440\text{ nm}$ (Spaltbreiten 3 nm) vermessen (Spectrofluorometer RF 5001 PC, Fa. Shimadzu).

Kalibriergerade für 7-Amino-4-methylcumarin in HEPES-Puffer pH 7,4

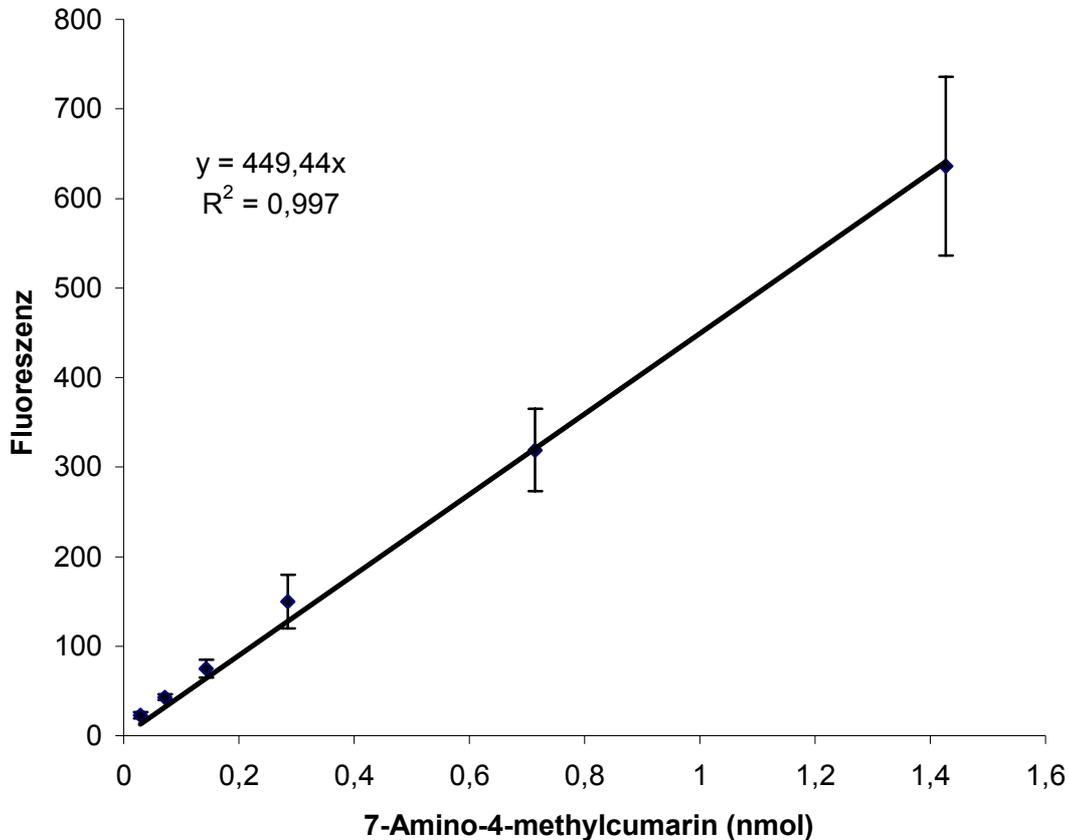


Abbildung 9: Kalibriergerade für NEP-Assay. Jeweils 50 µl jeder AMC wurde bei einer Extinktion von λ_{ex} = 367 nm und einer Emmision von λ_{em} = 440 nm in 350 µl HEPES-Puffer und 800 µl Aceton bei einem Split von 3 nm gegen die Kontrolle gemessen.

2.5.1.2. NEP-Bestimmung im Akutversuch

Die Bestimmung basierte auf der von Bormann und Melzig (2000) beschriebenen, zweistufigen Methode mit N-Succinyl-Ala-Ala-Phe-7-Amino-4-methylcumarin (SAAP-AMC) als Substrat. Während der ersten Reaktion setzte NEP aus dem Substrat Phe-AMC frei, das in einer weiteren enzymatischen Reaktion durch Leucin-Aminopeptidase-Zugabe (LAP) zu AMC abgebaut wurde, dessen Konzentration fluorimetrisch bestimmt werden konnte.

Hierzu musste das Medium von den in den Wells adhären gewachsenen Zellen abgesaugt werden. Danach wurden 50 µl Testlösung mit 50 µl SAAP-AMC (50 µM) und 400 µl HEPES-Puffer (50 mM + 154 mM NaCl, pH 7,4) auf die Zellen gegeben und die Ansätze wurden für 60 Min bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von 50 µl Phosphoramidon (50 µM) wurde die Reaktion gestoppt. 400 µl Überstand wurden in 1.5 ml Eppendorfröhrchen überführt. Die Zugabe von 20 µl LAP (1:235 in HEPES-Puffer

verdünnt), die zeitgleich zur ersten Reaktionszeit bei 56 °C vorinkubiert worden war, startete die zweite Reaktion zur Bildung von AMC. Die Ansätze wurden dabei für 60 min bei 56 °C inkubiert. Durch 800 µl Aceton wurde die Reaktion durch Proteindenaturierung gestoppt. Danach wurde die Fluoreszenz der Ansätze bei einer Anregungswellenlänge von 367 nm, einer Emissionswellenlänge von 440 nm und Spaltbreiten von jeweils 3 nm gemessen (Spectrofluorometer RF 5001 PC, Fa. Shimadzu).

Zeitgleich wurde je Testwert ein Kontrollwert, der 50 µl SAAP-AMC, 400 µl HEPES-Puffer, 50 µl Phosphoramidon, 20 µl LAP und 800 µl Aceton enthielt, mitgeführt.

2.5.1.3. NEP-Bestimmung im Langzeitversuch

Bei den Langzeitversuchen mussten die Extrakte sowie Reinsubstanzen zunächst in Wasser oder DMSO gelöst werden. Diese wurden anschließend unter der Sterilbank durch einen Sterilfilter von 0.2 µm Porendurchmesser filtriert und 24 Stunden nach dem Passieren der Zellen zum Medium zugegeben. Dabei wurde die gewünschte Konzentration angesetzt. Analog zu den Akutversuchen wurde ebenfalls eine Kontrolle mitgeführt. Nach weiteren drei bis vier Tagen wurde das Medium vollständig abgesaugt und 400 µl HEPES-Puffer, 50 µl SAAP-AMC wurden auf die Zellen pipettiert und für 60 min im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Der weitere Ablauf entsprach dem Vorgehen im Abschnitt 2.5.1.2.

2.5.2 Bestimmung der Aktivität des ACE

2.5.2.1. Aufnahme einer Kalibriergeraden für das Reaktionsprodukt aus H-Histidyl-L-Leucin (H-His-L-Leu) und o-Phthalaldehyd

Durch die Fluoreszenzmessung eines Komplexes aus H-His-L-Leu mit o-Phthalaldehyd konnten Rückschlüsse auf die ACE-Aktivität gewonnen werden. Hierzu musste zunächst eine Kalibriergerade mit bekannten H-His-L-Leu-Konzentrationen erstellt und die dazugehörige Fluoreszenz gemessen werden. Dafür wurden bei Raumtemperatur aus einer 1 mg/ml H-His-L-Leu –Stammlösung Verdünnungen von 10.0; 5.0; 2.5; 1.0; 0.5 und 0.1 µg/ml L-His-L-Leu mit Phosphat-Puffer hergestellt und jeweils 20 µl der jeweiligen Verdünnung in 2.0 ml Eppendorfröhrchen gegeben.. Anschließend erfolgte in jedes Eppendorfröhrchen die Zugabe von 230 µl Phosphat-Puffer, 1.0 ml NaOH (0.4 N), 100 µl o-Phthalaldehyd und 300 µl HCl (2.0 N). Nach sorgfältigem Mischen wurde jede Verdünnung dreimal gegen einen Nullwert aus 250 µl Phosphat-Puffer, 1 ml NaOH (0.4 N), 100 µl o-Phthalaldehyd und 300 µl HCl (2 N) bei einer

Anregungswellenlänge von 360 nm, einer Emissionswellenlänge von 500 nm und Spaltbreiten von jeweils 3 nm gemessen (Spectrofluorometer RF 5001 PC, Fa. Shimadzu).

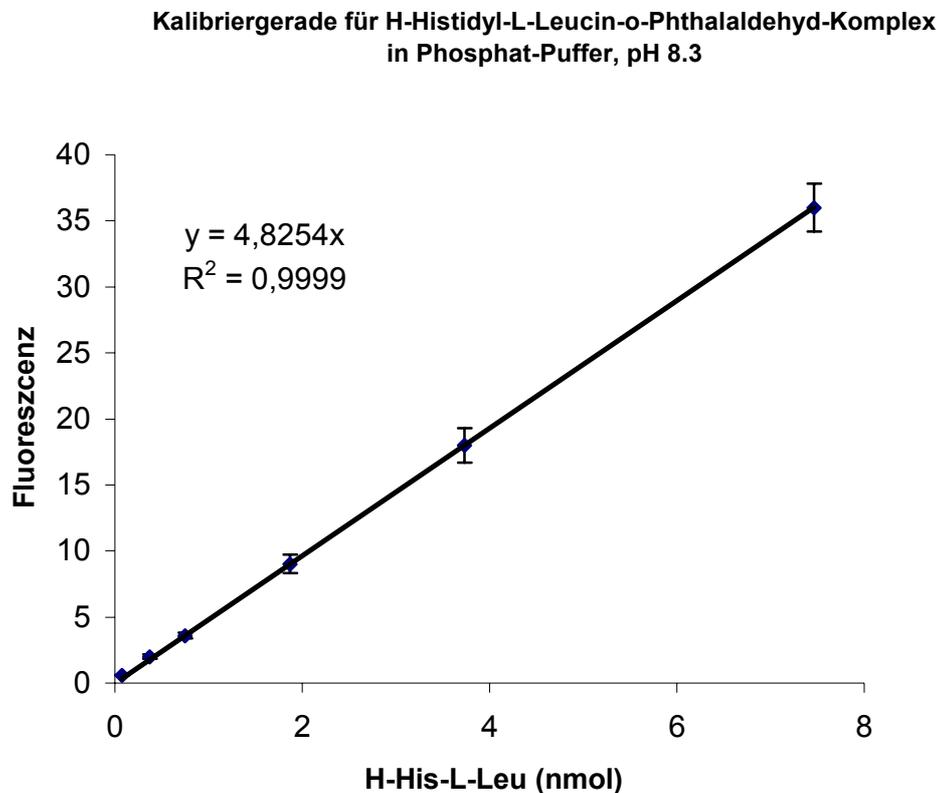


Abbildung 10: Kalibriergerade für ACE-Assay. Jeweils 20 µl jeder H-His-L-Leu-Verdünnungen wurde bei einer Extinktion von $\lambda_{ex} = 360$ nm und einer Emission von $\lambda_{em} = 500$ nm in 230 µl Phosphat-Puffer, 1 ml (0.4 N) NaOH und 100 µl o-Phthalaldehyd bei einem Split von 3 nm gemessen.

2.5.2.2. ACE-Bestimmung im Langzeitversuch

Die Bestimmung wurde nach der Vorschrift von Bormann und Melzig (2000) durchgeführt. Das Enzym ACE katalysiert dabei die Bildung von His-Leu aus Hip-His-Leu. Nach Ende der Reaktionszeit bildete das Dipeptid mit o-Phthalaldehyd einen fluoreszierenden Komplex, dessen Emission als Maß für die Enzymaktivität benutzt wurde.

Bei den Langzeitversuchen mussten die Extrakte sowie Reinsubstanzen zunächst in Wasser oder in DMSO gelöst werden. Diese wurden anschließend unter der Sterilbank durch einen Sterilfilter mit 0.2 µm Porendurchmesser filtriert und 24 Stunden nach dem Passieren der Zellen zum Medium zugegeben. Dabei wurde eine Konzentration angesetzt. Nach weiteren 72-96 Stunden wurde das Medium vollständig abgesaugt und 260 µl Phosphat-Puffer, 20 µl Hip-His-Leu wurden auf die Zellen pipettiert und für 20

min im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. 250 µl davon wurden in 2 ml Eppendorfröhrchen gegeben und die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1.0 ml NaOH (0.4 N) gestoppt.

Nach der Zugabe von 100 µl einer frisch hergestellten methanolischen o-Phthalaldehydlösung (2 % in Methanol) wurden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln gelassen. Durch Zusatz von 300 µl HCl (2 N) wurde die Reaktion beendet. Danach wurde die Fluoreszenz der Ansätze bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm, einer Emissionswellenlänge von 500 nm und Spaltbreiten von je 3 nm gemessen (Spectrofluorometer RF 5001 PC, Fa. Shimadzu). Zeitgleich wurde je Testwert ein Kontrollwert, der 20 µl Hip-His-Leu, 260 µl Phosphat-Puffer, 1.0 ml NaOH (0.4 N), 100 µl o-Phthalaldehydlösung und 300 µl HCl enthielt, mitgeführt.

2.6 DNA-Bestimmung

2.6.1 Prinzip der Bestimmung

Die Menge an Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist ein zuverlässiger Endpunkt für einen Zellproliferations-Assay. Die Bestimmung der DNA-Menge innerhalb weniger Minuten mit Bisbenzimid (Hoechst 33258) ist bereits eine etablierte Methode (Brunk et al. 1979; Cesarone et al. 1979; Labarca and Paigen 1980). Die Messung basiert auf der Verstärkung der Fluoreszenz und der Verschiebung der Emissionswellenlänge des Bisbenzimids nach Bindung an die zelluläre DNA. Daraus folgt eine lineare Abhängigkeit zwischen der Fluoreszenz und der DNA-Konzentration über einen weiten Konzentrationsbereich. Diese Reaktion war selbst bei Vorhandensein von anderen zellulären Komponenten wie RNA, Proteinen oder Carbohydraten sehr spezifisch (Brunk et al. 1979). Der Assay wurde mit zellulären Extrakten in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen durchgeführt, da hier wahrscheinlich durch Dissoziation der DNA und Chromatin die DNA-Bindungsstellen besser zugänglich sind, was mit einer Erhöhung der Fluoreszenz einhergeht (Labarca and Paigen 1980). Es zeigte sich, dass mit Zellrohextrakten und hohen Salzkonzentrationen diese fluorimetrische Methode der DNA- Bestimmung zuverlässig und bis zu einer DNA-Konzentration von 10 ng (DNA-Menge in ca. 1000 Zellen) sensitiv ist (Labarca and Paigen 1980).

2.6.2 Aufnahme einer Kalibriergeraden

Um Rückschlüsse auf die Zellzahl pro Well zu erhalten, musste zunächst eine Kalibriergerade mit bekannten DNA-Konzentrationen erstellt und die dazugehörige Fluoreszenz gemessen werden. Dafür wurden bei Raumtemperatur aus einer 1 mg/ml DNA-Stammlösung (Typ XIV) Verdünnungen von 10.0; 5.0; 2.5; 1.0 und 0.5 µg/ml DNA mit H₂O hergestellt und jeweils 370 µl der jeweiligen Verdünnung in 1.5 ml Eppendorfröhrchen gegeben.

Anschließend erfolgte in jedes Eppendorfröhrchen die Zugabe von 370 µl 2fach konzentriertem DNA-Puffer und 60 µl Hoechst-33258-Arbeitslösung. Nach sorgfältigem Mischen wurde jede DNA-Verdünnung drei-mal gegen einen Nullwert aus 740 µl 2fach konzentriertem DNA-Puffer und 60 µl Hoechst-33258-Arbeitslösung bei einer Anregungswellenlänge von 356 nm, einer Emissionswellenlänge von 458 nm und Spaltbreiten von je 5 nm gemessen (Spectrofluorometer RF 5001 PC, Fa. Shimadzu).

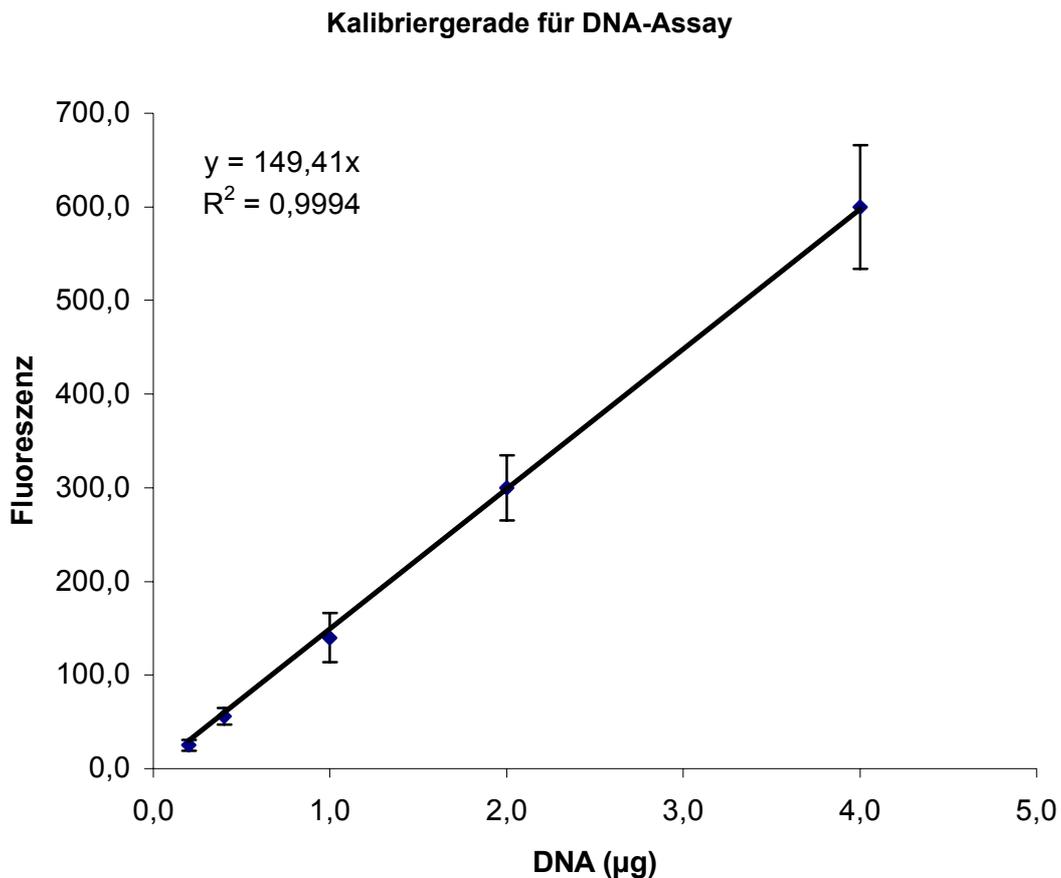


Abbildung 11: Kalibriergerade für DNA-Assay. Jeweils 370 µl jeder DNA-Verdünnung wurde bei einer Extinktion von $\lambda_{ex}=356$ nm und einer Emmision von $\lambda_{em}=458$ nm in 370 µl 2fach konzentriertem DNA-Puffer und 60 µl Hoechst 33258 Arbeitslösung bei Spaltbreiten von 5 mm gemessen.

2.6.3 Bestimmung der DNA-Konzentration in 24-Well Zellkulturplatten

Die Bestimmung wurde in 24-Well Zellkulturplatten mit Hoechst 33258 Reagenz nach der Lyse der Zellen durch Einfrieren in deionisiertem destillierten Wasser durchgeführt (Labarce et al. 1980; Rago et al. 1990). Für die DNA-Bestimmung wurden die in den Wells adhärent gewachsenen Zellen nach dem Enzym-Assay vorsichtig mit 1.0 ml 37 °C warmer 0.9 % NaCl-Lösung gewaschen. Danach wurden 400 µl H₂O zugegeben und die Platten bei -20 °C eingefroren. Ein erneutes Auftauen und Einfrieren der Platten erfolgte nach 24 Stunden. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Zellen aufbrachen und die DNA freigesetzt wurde. Für den DNA-Assay wurden die Platten aufgetaut, die Lösungen in jedem Well durch mehrfaches Pipettieren resuspendiert und jeweils 50 µl in ein 1.5 ml Eppendorfröhrchen überführt, in denen 690 µl DNA-Puffer und 60 µl Hoechst-33258-Arbeitslösung vorgelegt wurden. Nach sorgfältigem Mischen, wurde jedes Röhrchen dreimal gegen einen Nullwert aus 740 µl DNA-Puffer und 60 µl Hoechst-33258-Arbeitslösung bei einer Anregungswellenlänge von 356 nm und einer Emissionswellenlänge von 458 nm (Spaltbreiten von je 5 nm) gemessen (Spectrofluorometer RF 5001 PC, Fa. Shimadzu). Mit den erhaltenen Werten wurde über die zuvor erstellte Kalibriergerade die DNA-Menge in µg ermittelt.

2.7 Bestimmung des β-Amyloid-Peptids (1-42)

Die Bestimmung wurde nach der Vorschrift des menschlichen β-Amyloid-Peptids (1-42) (N) Assay Kit (L), (Code Nr.27712 Immuno-Biological Laboratories Co.) durchgeführt. Dieser Kit ist ein Sandwich ELISA, welcher zwei Arten hoch spezifischer Antikörper benutzt. Tetramethylbenzidine (TMB) wird als Substrat (Chromogen) verwendet.

Die Methode kann 6.25 - 400 pg/ml Aβ₁₋₄₂ erfassen, das entspricht 1.4 - 88.7 pmol/l. Aβ₁₋₄₂ (N) Assay Kit (L) ist für die qualitative Ermittlung von menschlichem Aβ₁₋₄₂ in der Cerebrospinal-Flüssigkeit, in Zellkulturmedien oder im Extrakt von Gehirngewebe geeignet (Horikoshi et al. 2004). Sowohl rekombinante als auch native Formen von menschlichem Aβ₁₋₄₂ können mit diesem Kit erfasst werden.

2.7.1 Vorbereitung der Lösungen

- **Wasch-Puffer:**

Der Wasch-Puffer wurde auf Raumtemperatur eingestellt. Vor dem Gebrauch sollte der Wasch-Puffer vollständig gemischt werden, danach wurden 50 ml Wasch-Puffer mit 1.950 l destilliertem Wasser verdünnt und gemischt. Er wurde im Kühlschrank aufbewahrt und musste innerhalb von zwei Wochen nach der Verdünnung verbraucht werden.

- **Antikörperlösung**

Der Antikörper war 30fach konzentriert. Er wurde mit 11.6 ml der entsprechenden Lösung für die Antikörper verdünnt. Dieser Schritt erfolgte kurz vor der Anwendung des Antikörpers.

- **Standardlösung**

Der Standard wurde mit 1.0 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Die vorbereitete Lösung enthielt 800 pg/ml A β 1-42.

- **Verdünnung der Standardlösung**

Für die Verdünnung der Standardlösung wurden acht Eppendorfröhrchen vorbereitet. Es erfolgte die Zugabe von 230 μ l EIA-Puffer in jedes Eppendorfröhrchen.

Anschließend wurden 230 μ l aus der 800 pg/ml Standardlösung bei Raumtemperatur in das erste Eppendorfröhrchen überführt. Die Lösung wurde gemischt. Die Konzentration der Lösung betrug 400 pg/ml. Danach wurden 230 μ l aus der 400 pg/ml Lösung in das zweite Eppendorfröhrchen gegeben und die Lösung wurde gemischt. Die Konzentration der Lösung betrug 200 pg/ml. Die folgenden Verdünnungen (100; 50; 25; 12.5; 6.25 pg/ml) wurden in der gleichen Art und Weise durchgeführt.

2.7.2 Vorbereitung der Testproben

2.7.2.1. Erste Experimentserie

Zellen in Konzentrationen von 100000 Zellen/ml wurden in 6-Well-Platten (a` 2ml) ausgesät und für weitere ein bis zwei Tage, bis die Zellen konfluent waren, kultiviert. Anschließend wurde das Medium (10 % FBS) abgesaugt und durch 1 ml FBS (1 %) Medium ersetzt. Die Extrakte und die Reinsubstanzen mussten zunächst in Wasser oder in DMSO gelöst werden. Im nächsten Schritt wurden die Extrakte und Reinsubstanzen unter der Sterilbank durch einen Sterilfilter von 0.2 μ m Porendurchmesser filtriert, auf die gewünschte Konzentration verdünnt und zum Medium zugegeben. Die Zellen in den

Platten wurden drei Tage im Brutschrank bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5 % CO₂ und 95 % Luft enthielt, kultiviert. Daraufhin wurde das Medium bei -20 °C gesammelt und bis zur Bestimmung des Aβ1-42 Peptids gelagert.

2.7.2.2. Zweite Experimentserie

Die Platten wurden wie oben (erster Kit) beschrieben, vorbereitet. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden die zu untersuchenden Substanzen und Extrakte in die Platten für zwei Tage zum Medium zugegeben. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 1.0 ml 1 % FBS Medium ersetzt. Nach 24 Stunden wurde das Medium bei -20 °C gesammelt und bis zum Zeitpunkt der Bestimmung des Aβ1-42 Peptids gelagert.

2.7.3 Messverfahren

Alle Reagenzien wurden ungefähr 30 Minuten vor der Weiterverarbeitung auf Raumtemperatur gebracht. Sie wurden vollständig vor dem Gebrauch gemischt. Die Standardkurve wurde gleichzeitig mit den Testproben vorbereitet. Hierzu mussten 100 µl der Standardlösung, Nullwert und Testproben in die geordneten Wells zugegeben werden. Die Platte wurde für eine Nacht bei 4 °C nach Bedeckung mit einer Plattenkappe inkubiert. Am nächsten Tag folgte der zweite Schritt bei dem die Wells kräftig mit dem Wasch-Puffer gewaschen wurden. Jedes Well wurde mit dem Wasch-Puffer aufgefüllt, 15-30 Sekunden inkubiert. Anschließend wurde der Wasch-Puffer aus den Well vollständig entfernt. Dieser Schritt wurde sieben bis neun-mal wiederholt. Anschließend wurde 100 µl von der Antikörperlösung in die Wells zugegeben und die Platte wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Wells mit dem Wasch-Puffer neun-mal wie vorher gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl Chromogen (TMB) wurde die Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen belassen. Es entstand eine blaue Lösung. Durch 100 µl Stopplösung (1.0 N H₂SO₄) wurde die Reaktion beendet. Danach wurde die Absorption der Ansätze bei einer Wellenlänge von 450 nm innerhalb von 30 Minuten gemessen (Spectrafluor, Tecan).

2.8 Bestimmung der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP)

Intrazelluläres cAMP wurde mit Hilfe des „Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit“ der Firma Cayman Chemical (Vertrieb BIOZOL Diagnostica GmbH, Eching, Germany) bestimmt. Der Test basiert auf einer Konkurrenzreaktion vom freien (zu bestimmenden) cAMP und Acetylcholinesterasegebundenen cAMP um eine limitierte Anzahl an Bindungsstellen eines cAMP-spezifischen Antikörpers. Bei dem Test wird die bekannte Konzentration des an die Acetylcholinesterase gebundenen cAMP konstant gehalten, während die Konzentration des zu bestimmenden cAMP variiert. Der letztlich an den Antikörper gebundene Anteil des cAMP mit konjugierter Acetylcholinesterase ist umgekehrt proportional zur unbekanntem Menge an freiem cAMP. Der cAMP-spezifische Antikörper bindet an einen sekundären Antikörper auf einer Mikrotiter-Platte. Gemessen wird die Aktivität der Acetylcholinesterase, die Acetylcholin in Thiocholin spaltet. Thiocholin reagiert in einer weiteren Reaktion mit 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure zu 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure. Die resultierende Gelbfärbung kann spektralphotometrisch mit Hilfe der Absorption bei 412 nm bestimmt werden. Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.8.1 Vorbereitung der Testproben

Zellen in Konzentrationen von 100000 Zellen/ml wurden in 6-Well-Platten (a` 2ml) ausgesät und für weitere zwei bis drei Tage, bis die Zellen konfluent waren, kultiviert. Die Extrakte und die Reinsubstanzen mussten zuerst in Wasser oder in DMSO gelöst werden. Im nächsten Schritt wurden die Extrakte und Reinsubstanzen unter der Sterilbank durch einen Sterilfilter von 0.2 µm Porendurchmesser filtriert, auf die gewünschte Konzentration verdünnt und zum Medium zugegeben. Die Zellen in den Platten wurden drei Tage im Brutschrank bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5 % CO₂ und 95 % Luft enthielt, kultiviert. Anschließend wurde die Isolierung des intrazellulären cAMP durchgeführt.

2.8.2 Isolierung des intrazellulären cAMP

Nach drei Tagen Kultivation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2.0 ml PBS gewaschen. Zunächst wurden 300 µl HCl (0.1 M) in jedes Well zugegeben. Die Zellen mit HCl wurden bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Danach wurden die

Zellen abgekratzt und durch mehrfaches Pipettieren suspendiert. Die Zellen wurden in Eppendorfröhrchen umgefüllt und für 10 min zentrifugiert (1000 g). Der Überstand wurde in neue saubere Eppendorfröhrchen umgefüllt und konnte entweder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder sofort für die Bestimmung der cAMP-Konzentration verwendet werden.

2.8.3 Vorbereitung der Lösungen

- **Wasch-Puffer:**

Der Wasch-Puffer wurde auf Raumtemperatur eingestellt. Vor dem Gebrauch sollte der Wasch-Puffer vollständig gemischt werden, danach wurden 5.0 ml des Wasch-Puffer-Konzentrats mit 1.995 l destilliertem Wasser verdünnt und gemischt. Anschließend wurde 1.0 ml von Tween 20 hinzugefügt und gemischt. Er wurde im Kühlschrank aufbewahrt. Die Haltbarkeit dieser Verdünnung betrug zwei Monate.

- **EIA Puffer**

Der EIA Puffer war 10fach konzentriert. Es wurden 10.0 ml vom EIA Puffer mit 90.0 ml destilliertem Wasser verdünnt und gemischt. Der Puffer wurde im Kühlschrank aufbewahrt. Die Haltbarkeit betrug zwei Monate.

- **cAMP AChE Tracer (Acetylcholinesterasegebundener cAMP)**

Der cAMP AChE Tracer wurde mit 6.0 ml EIA Puffer verdünnt. 60 μl Tracer-Farbstoff wurden zugegeben. Die Lösung wurde gemischt und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Haltbarkeit betrug vier Wochen.

- **cAMP Antiserum**

Das cAMP Antiserum wurde mit 6.0 ml EIA Puffer verdünnt, 60 μl Antiserum-Farbstoff wurden zugegeben. Die Lösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt. Die Haltbarkeit betrug vier Wochen.

- **Standardlösung**

Der Standard wurde mit 1.0 ml EIA Puffer aufgelöst. Die vorbereitete Lösung enthielt 3.0 pmol/ml cAMP. Die Lösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt und musste innerhalb von sechs Wochen nach der Verdünnung verbraucht werden.

- **Verdünnung der Standardlösung**

Für die Verdünnung der Standardlösung wurden acht Eppendorfröhrchen vorbereitet. In Eppendorfröhrchen Nr. 1 wurden 900 μl EIA Puffer gegeben. Es erfolgte die Zugabe von 500 μl EIA-Puffer in die Eppendorfröhrchen zwei bis acht. Zunächst wurden 100 μl aus der 3.0 pmol/ml Standardlösung bei Raumtemperatur in das erste Eppendorfröhrchen überführt. Die Lösung wurde gemischt. Die Konzentration der

Lösung betrug 1.5 pmol/ml. Danach wurden 500 µl aus der 1.5 pmol/ml Lösung in das zweite Eppendorfröhrchen gegeben und die Lösung wurde gemischt. Die Konzentration der Lösung betrug 0.75 pg/ml. Die folgenden Verdünnungen (0.375; 0.187; 0.093; 0.046; 0.023 pg/ml) wurden in der gleichen Art und Weise hergestellt.

2.8.4 Messverfahren

Die Bestimmung erfolgte in einer 96 Well-Platte (Abb. 14). Ungefähr 30 Minuten vor der Weiterverarbeitung wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht. Sie wurden vollständig vor dem Gebrauch gemischt. Die Standardkurve wurde gleichzeitig mit den Testproben vorbereitet.

Zuerst wurden 50 µl EIA Puffer in die sogenannte „non-spezifische Binding“ (NSB) Wells und 50 µl EIA Puffer in die sogenannte „die Maximum-Bindung“ (B₀) Wells zugegeben. Danach wurden 50 µl Verdünnung der Standardlösung in die sogenannte „Standardwells“ und 50 µl Untersuchungslösung in die sogenannte „Samples“ Wells gegeben (Abb. 12).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17
B	Blk	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18
C	NSB	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19
D	NSB	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20
E	B ₀	S5	S5	5	5	5	13	13	13	21	21	21
F	B ₀	S6	S6	6	6	6	14	14	14	22	22	22
G	B ₀	S7	S7	7	7	7	15	15	15	23	23	23
H	TA	S8	S8	8	8	8	16	16	16	24	24	24

BLK-Blank

TA-Total Aktivität

NSB-Non-specific Binding

S1-S8 – Standards 1-8

1-24 Samples

Abbildung 12: Format der 96 Well-Platte für die Bestimmung der Konzentration des intrazellulären cAMP.

Dann wurden 50 µl von cAMP AChE Tracer in die Wells mit Ausnahme der Total Aktivität (TA) und Blank (Blk) Wells zugegeben. Anschließend wurden 50 µl von cAMP Antiserum in die Wells mit Ausnahme von TA, NSB und Blk Wells zugegeben. Die Platte wurde für 18 Stunden bei 4 °C nach Bedeckung mit einer Plattenkappe inkubiert, und am nächsten Tag folgte der zweite Schritt, bei dem die Wells kräftig mit dem Wasch-Puffer gewaschen wurden. Jedes Well wurde mit dem Wasch-Puffer aufgefüllt, 15–30 Sekunde inkubiert und anschließend wurde der Wasch-Puffer aus den Wells vollständig entfernt. Dieser Schritt wurde fünfmal wiederholt. Anschließend wurden 200 µl von dem Ellman's Reagenz in die Wells und 5 µl vom Tracer in die TA

Wells zugegeben. Die Platte wurde nach Bedeckung mit einer Plattenkappe für 90-120 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Danach wurde die Absorption der Ansätze bei einer Wellenlänge von 405 bis 420 nm gemessen (B_0 Wells gleich 0.3 A.U.) (Spectrafluor, Tecan).

2.9 Hämatoxylin-Färbung von Zellkulturen nach Arabinosylcytosin-Behandlung

Material:

1. Brenner zur Sterilisation der Deckgläschen
2. Deckgläschen, steril
3. Objektträger, steril
4. sterile 6-Well-Gewebekulturplatten

Bei allen folgenden Arbeitsschritten musste insbesondere darauf geachtet werden, dass die Zellen nicht austrockneten. Generell wurden die Deckgläschen mit Methanol/ HCl entfettet, mit Ethanol oder Methanol gewaschen und ggf. zum Sterilisieren abgeflammt.

Durchführung:

SK-N-SH-Zellen wurden auf sterilisierten Deckgläschen in einer 6-Well Gewebekulturplatte kultiviert (jeweils Zugabe von 2.0 ml Medium nach Anhaftung der Zellen auf dem Deckgläschen). Zur optimalen Vorbereitung der Zellen wurde auf eine gut vereinzelt Aussaat geachtet. Die Kultivierungsdauer betrug 24 h. Danach wurden die Zellen mit Arabinosylcytosin 60 ng/ml behandelt und weitere vier Tage inkubiert. Außerdem wurden Kontrollen ohne Arabinosylcytosin verwendet. Im ersten Schritt wurde das Kulturmedium vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Danach wurden die adhärenen SK-N-SH-Zellen zwei-mal mit PBS, pH 7.4, (1x konz., ca. 1.5 ml/ Schale) gewaschen.

Formaldehydfixierung:

Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer wurde 10 % Paraformaldehydlösung, pH 7.4, zupipettiert (2 ml/Well), für 30 min bei Raumtemperatur fixiert und danach 3x mit destilliertem Wasser gewaschen. Im folgenden Schritt wurde die Hämatoxylinfärbung vorgenommen. Danach wurden die Deckgläschen 3x mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Vorbereitung der Lagerung sowie der Beobachtung im Lichtmikroskop wurde das Deckgläschen umgekehrt (Zellen nach unten!) mit den präparierten Zellen auf einen Tropfen Glycerol-PBS-Lösung auf einen Objektträger gelegt. Zum Schluss wurden die Präparate getrocknet, lichtgeschützt und kühl gelagert.

3 ERGEBNISSE

Die Bestimmungsmethoden für die Enzymaktivität und die Zellproliferation wurden auf SK-N-SH-Zellen (humane Tumorzellen aus Neuroblastomgewebe) übertragen, auf deren Oberflächen NEP- und ACE-Enzyme lokalisiert sind. Durch die Arbeit an Zellen war es möglich, Langzeiteffekte der Naturstoffe zu untersuchen. Ermittelt und verglichen wurden die Veränderung der Enzymaktivitäten auf den Zelloberflächen sowie die Proliferationsentwicklung nach 96stündiger Inkubation unter Zusatz der untersuchten Substanzen. Die Enzymaktivität wurde in pmol/min/µg DNA berechnet. Die mittlere spezifische NEP-Aktivität betrug 2.8 ± 0.2 pmol/min/µg DNA (n=66 mit vier parallelen Proben), die mittlere spezifische ACE-Aktivität betrug 0.7 ± 0.06 pmol/min/µg DNA (n=39 mit vier parallelen Proben). Eine DNA-Menge von 1.0 µg entspricht ca. 100000 Zellen. Ein weiterer Mittelwert für die Enzymaktivität von allen Kontrollen wurde für die beiden Enzyme (NEP und ACE) in fmol/min/Zelle umgerechnet. Die NEP-Aktivität betrug 0.028 ± 0.002 fmol/min/Zelle, für die ACE-Aktivität 0.007 ± 0.0006 pmol/min/Zelle.

3.1 Einfluss von Grüntee-Extrakt und seinen Inhaltsstoffen auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation

3.1.1 Einfluss des Grüntee-Extrakts

Für die Klärung des Einflusses des Grüntee-Extraktes (Nr.85.942-3000220) auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation wurden Langzeitversuche in den Konzentrationsbereichen von 1.0 µg/ml bis 100.0 µg/ml durchgeführt (Tab. 1). Der Grüntee-Extrakt erhöhte in einer Konzentration von 25.0 µg/ml die NEP-Aktivität um 20 %. Bei 50.0 µg/ml konnte er die NEP-Aktivität sogar um 150 % erhöhen.

In der maximalen Konzentration wurde eine NEP-Aktivitätssteigerung von über 2000 % beobachtet. Die Induktion der NEP-Aktivität war von einer Hemmung der Zellproliferation begleitet.

Tabelle 1: Einfluss des Grüntee-Extrakts auf NEP-Aktivität und Zellproliferation

Extraktkonzentration in $\mu\text{g/ml}$	NEP-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
1.0	100 ± 7	100 ± 8
10.0	117 ± 7	91 ± 9
25.0	$122 \pm 5^*$	$87 \pm 12^{**}$
50.0	$250 \pm 4^*$	$45 \pm 5^{**}$
100.0	$2100 \pm 8^*$	$6 \pm 10^{**}$

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 8); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 6)).

3.1.2 Untersuchung von Coffein, Theophyllin, Theobromin und Theanin

In diesem Abschnitt wurden die Wirkungen der Inhaltsstoffe des Grüntee-Extraktes, Coffein, Theophyllin, Theobromin und Theanin auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation geprüft. Der Einfluss von diesen Substanzen auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation wurde im Rahmen von Langzeitversuchen im Konzentrationsbereich von $1.0 \mu\text{M}$ bis 1.0mM durchgeführt (Abb. 13).

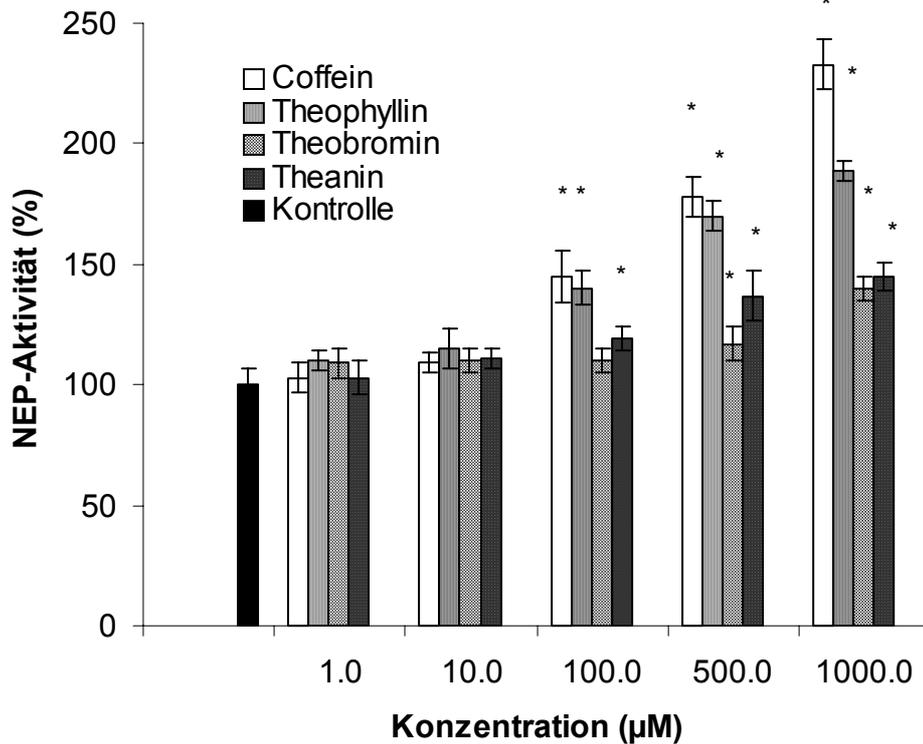


Abbildung 13: Untersuchung der Wirkungen von Coffein, Theophyllin, Theobromin und Theanin auf die NEP- Aktivität

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle)

Coffein erhöhte die NEP-Aktivität in der maximalen Konzentration um 130 % und hemmte die Zellproliferation um 55 %. Theophyllin konnte die NEP-Aktivität in der höchsten Konzentration um 90 % steigern bei einer gleichzeitigen Hemmung der Zellproliferation um 44 %. Theobromin ließ die NEP-Aktivität in der maximalen Konzentration um 40 % ansteigen und hemmte die Zellproliferation um 20 %. Theanin konnte die NEP-Aktivität in der maximalen Konzentration um 45 % erhöhen (Abb. 13) und die Zellproliferation um 18 % hemmen (Tab. 2).

Tabelle 2: Der Einfluss von Coffein, Theophyllin, Theobromin und Theanin auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation

	Konzentration in μM	NEP-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
Coffein	1.0	103 \pm 6	97 \pm 9
	10.0	109 \pm 4	95 \pm 10
	100.0	145 \pm 11*	83 \pm 9
	500.0	178 \pm 8*	64 \pm 11**
	1000.0	233 \pm 10*	45 \pm 10**
Theophyllin	1.0	110 \pm 4	93 \pm 8
	10.0	115 \pm 8	88 \pm 9
	100.0	140 \pm 7*	88 \pm 9
	500.0	170 \pm 6*	66 \pm 11**
	1000.0	189 \pm 4*	56 \pm 10**
Theobromin	1.0	109 \pm 6	99 \pm 4
	10.0	110 \pm 5	99 \pm 6
	100.0	110 \pm 5	99 \pm 5
	500.0	117 \pm 7*	90 \pm 9
	1000.0	140 \pm 5*	75 \pm 8**
Theanin	1.0	103 \pm 7	99 \pm 4
	10.0	111 \pm 4	96 \pm 4
	100.0	119 \pm 5*	91 \pm 4
	500.0	137 \pm 10*	83 \pm 11**
	1000.0	145 \pm 6*	82 \pm 5**

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 8)).

3.1.3 Untersuchung von Polyphenolen: (-) Epicatechin, (-)Epigallocatechin und Epigallocatechingallat

Zuerst wurden die Effekte des jeweiligen Polyphenols einzeln auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation in den Konzentrationen von 1.0 μM und 10.0 μM untersucht (Tab. 3 und 4). Der Einfluss von diesen Substanzen wurde im Rahmen von Langzeitversuchen auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation untersucht.

Epicatechin (EC) erhöhte die NEP-Aktivität in 10.0 μM Konzentration um 20 % und hemmte die Zellproliferation um 12 %. Epigallocatechin (EGC) konnte die Aktivität der NEP um 29 % steigern mit gleichzeitiger Hemmung der Zellproliferation um 16 %. Das Epigallocatechingallat (EGCG) hatte keinen Einfluss auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation.

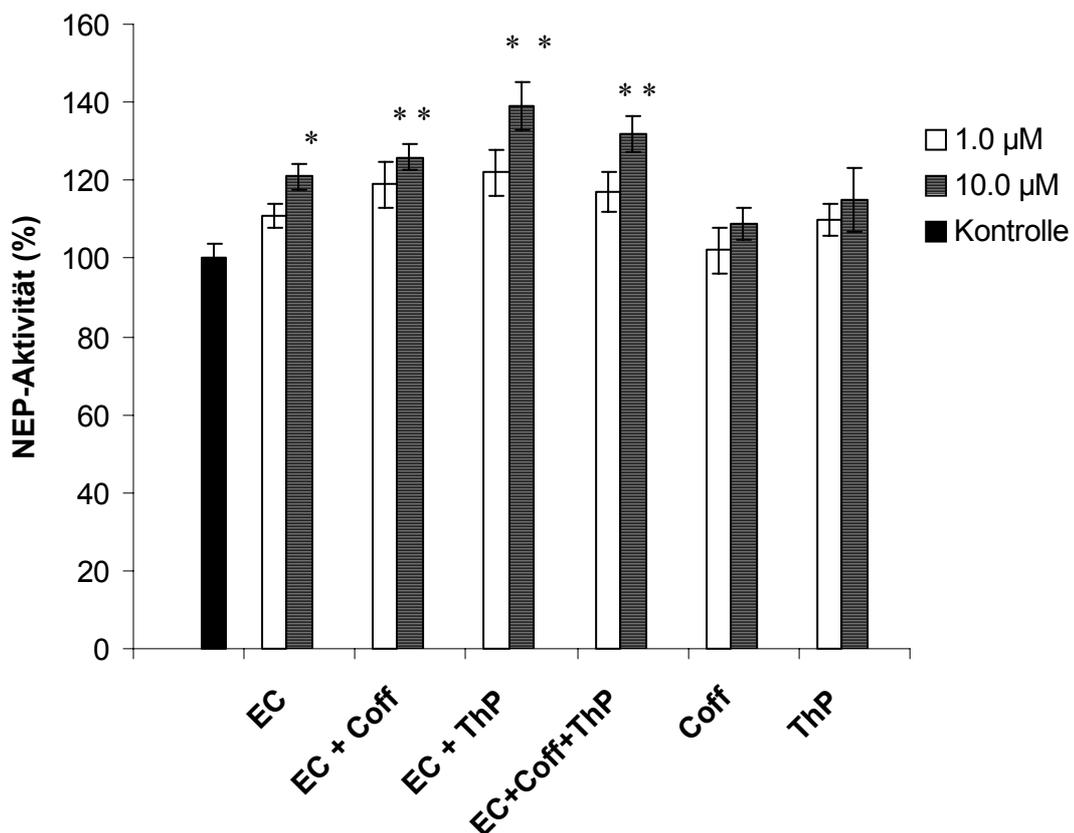


Abbildung 14: Einfluss von Epicatechin (EC), Coffein (Coff) und Theophyllin (ThP) sowie deren Kombinationen auf die NEP-Aktivität

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, $n=3$ mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle).

Die Einflüsse von EC, EGC und EGCG auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation wurden weiterhin in Kombination mit Coffein und/oder Theophyllin und/oder Theobromin untersucht. EC in Kombination mit Coffein steigerte die NEP-Aktivität um 25 % und erhöhte die Zellproliferation bis 95 %, anstatt 88 % mit EC allein. EC mit Theophyllin hob die Enzymaktivität um 39 % ohne signifikante Hemmung der Zellproliferation an. Während EC mit Coffein und Theophyllin zusammen die Enzymaktivität um 30 % erhöhten (Abb. 14), wurde auf die Zellproliferation kein Einfluss registriert (Tab. 3).

Tabelle 3: Einfluss von Epicatechin (EC) und seinen Kombinationen auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation

	Konzentration in μM	NEP-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
EC	1.0	111 \pm 3	95 \pm 7
	10.0	121 \pm 3*	88 \pm 6**
EC + Coff	1.0	119 \pm 6*	95 \pm 5
	10.0	125 \pm 3*	95 \pm 5
EC + ThP	1.0	121 \pm 6*	94 \pm 4
	10.0	139 \pm 6*	94 \pm 4
EC + ThB	1.0	109 \pm 6*	98 \pm 3
	10.0	120 \pm 5*	98 \pm 4
EC + Coff + ThP	1.0	117 \pm 5*	98 \pm 1
	10.0	132 \pm 5*	94 \pm 2

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; p < 0.05; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 5); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 6).

Die Kombination von EGC mit Coffein und/oder Theophyllin steigerte die Enzymaktivität um 50 % (Abb. 15) wobei bei der Zellproliferation keine Hemmung festgestellt wurde (Tab. 4).

Die Kombination von EGCG mit Coffein und/oder Theophyllin hatte weder Auswirkungen auf die NEP-Aktivität noch auf die Zellproliferation (Tab. 4). Die Kombination von EC, EGC und EGCG mit Theobromin hatte auf die NEP-Aktivität

keinen Effekt mehr, führte jedoch zum Anstieg der Zellproliferation im Gegensatz zur Hemmung der Zellproliferation mit EC und EGC als Einzelsubstanzen (Tab. 3 und 4).

Tabelle 4: Einfluss von Epigallocatechin (EGC), Epigallocatechingallat (EGCG) und ihren Kombinationen auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation

	Konzentration in μM	NEP-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
EGC	1.0	116 \pm 4*	89 \pm 9
	10.0	129 \pm 2*	84 \pm 9**
EGC + Coff	1.0	119 \pm 9*	97 \pm 3
	10.0	150 \pm 7*	95 \pm 3
EGC + ThP	1.0	140 \pm 7*	94 \pm 4
	10.0	148 \pm 4*	95 \pm 3
EGC + ThB	1.0	114 \pm 5*	100 \pm 3
	10.0	125 \pm 3*	99 \pm 3
EGC + Coff + ThP	1.0	115 \pm 2*	99 \pm 2
	10.0	125 \pm 2*	96 \pm 4
EGCG	1.0	108 \pm 10	99 \pm 7
	10.0	112 \pm 6	99 \pm 5
EGCG + Coff	1.0	113 \pm 8	100 \pm 7
	10.0	113 \pm 9	103 \pm 6
EGCG + ThP	1.0	110 \pm 6	100 \pm 4
	10.0	119 \pm 9	97 \pm 6
EGCG + ThB	1.0	104 \pm 5	104 \pm 5
	10.0	105 \pm 8	100 \pm 6
EGCG + Coff + ThP	1.0	114 \pm 3	97 \pm 6
	10.0	117 \pm 5	97 \pm 5

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 5); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 6).

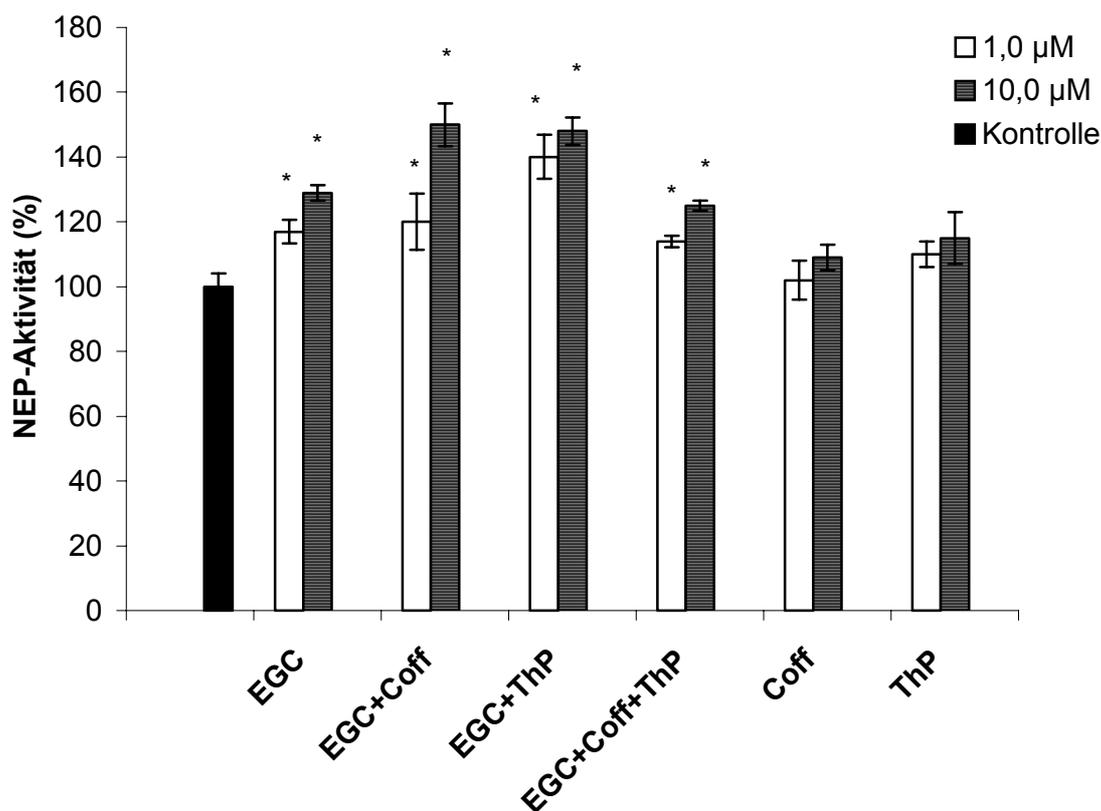


Abbildung 15: Einfluss von Epigallocatechin (EGC), Coffein (Coff) und Theophyllin (ThP) sowie deren Kombinationen auf die NEP-Aktivität

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle).

3.2 Einfluss von Ginkgo-biloba-Extrakt und seinen Inhaltsstoffen auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation

3.2.1 Einfluss des Ginkgo-biloba-Extrakts

Der Einfluss des Ginkgo-biloba-Extrakts auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation wurde im Rahmen von Langzeitversuchen ermittelt. Der Ginkgo-biloba-Extrakt (EGb 761[®]) wurde in unterschiedlichen Lösungsmitteln (Wasser, Ethanol 50 %, DMSO 50 %) aufgenommen.

Die wässrige Lösung des Extrakts induzierte signifikant ab einer Konzentration von 50 µg/ml die NEP-Aktivität. In der maximalen Konzentration des Extraktes wurde die NEP-Aktivität um 80 % erhöht. Die ethanolische Lösung des Extrakts steigerte die Enzymaktivität in der Konzentration von 100.0 µg/ml um 82 %. Durch den DMSO-

Lösung des Extrakts stieg die NEP-Aktivität in der maximalen Konzentration um 20 % (Tab. 5).

Tabelle 5: Einfluss des Ginkgo-biloba-Extrakts auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation

Extrakt- konzentration in µg/ml	NEP-Aktivität in % zur Kontrolle			Zellproliferation in % zur Kontrolle		
	Wasser 100 %	Ethanol 50 %	DMSO 50 %	Wasser 100 %	Ethanol 50 %	DMSO 50 %
1.0	103±9	100±14	100±6	101±7	100±7	100±5
5.0	100±8	99±14	100±6	103±5	103±4	100±6
10.0	108±19	106±12	98±4	103±4	100±6	105±7
25.0	118±17	130±12*	98±3	96±8	83±10**	101±6
50.0	138±19*	173±16*	108±9	82±10**	63±12**	92±9
75.0	140±16*	175±14*	118±6	80±13**	61±12**	86±8
100.0	180±19*	182±8*	128±7*	73±11**	53±5**	78±7**

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert ± SD, n=3 mit vier parallelen Proben; p < 0.05; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 8); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 8)); Ethanol und DMSO wurden in der Konzentration von 0.5 % auf die Kontrolle gegeben.

3.2.2 Einfluss von Bilobalid, Ginkgolid A, Ginkgolid B und Amentoflavon

Da der Ginkgo-biloba-Extrakt das Enzym induzierte, wurden zunächst die Substanzen, die im Extrakt vorhanden sind, einzeln hinsichtlich ihrer Wirkung auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation untersucht. Hierdurch konnten Hinweise auf die verantwortlichen Inhaltstoffgruppen gewonnen werden. Es wurden die Einflüsse des Bilobalids, der Ginkgolide A und B sowie des Amentoflavons auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation im Rahmen von Langzeitversuchen im Konzentrationsbereich von 1.0 µM bis 50.0 µM geprüft. Bilobalid, Ginkgolid A und B hatten keinen Einfluss auf die Enzymaktivität und auf die Zellproliferation.

Amentoflavon hemmte in der maximalen Konzentration sowohl die NEP-Aktivität als auch die Zellproliferation (Tab. 6).

Tabelle 6: Einfluss von Bilobalid, Ginkgolid A, Ginkgolid B und Amentoflavon auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation

	Konzentration in μM	NEP-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
Bilobalid	1.0	97 \pm 10	104 \pm 6
	10.0	103 \pm 9	105 \pm 7
	20.0	102 \pm 10	107 \pm 8
	50.0	107 \pm 9	102 \pm 7
Ginkgolid A	1.0	101 \pm 7	102 \pm 14
	10.0	105 \pm 9	99 \pm 13
	20.0	108 \pm 12	98 \pm 9
	50.0	113 \pm 10	99 \pm 4
Ginkgolid B	1.0	108 \pm 9	97 \pm 7
	10.0	109 \pm 13	95 \pm 10
	20.0	108 \pm 14	99 \pm 11
	50.0	112 \pm 11	91 \pm 6
Amentoflavon	1.0	104 \pm 6	100 \pm 12
	10.0	98 \pm 4	107 \pm 8
	20.0	98 \pm 12	105 \pm 7
	50.0	85 \pm 9*	73 \pm 7**

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant schwächere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 9); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 9)).

3.2.3 Einfluss von Bilobalids und der Ginkgolide A und B in Kombination

Zunächst wurden die Substanzen als Kombination bei den Konzentrationen 10.0 μM und 20.0 μM im Rahmen von Langzeitversuchen auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation untersucht. Die Kombination von Bilobalid, Ginkgolid A und B hemmte die NEP-Aktivität und die Zellproliferation in den getesteten Konzentrationen (Tab. 7).

Tabelle 7: Einfluss der Kombination von Bilobalid, Ginkgolid A und B auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation

Konzentration in μM	NEP-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
10.0	$62 \pm 7^*$	$56 \pm 14^{**}$
20.0	$67 \pm 7^*$	$52 \pm 8^{**}$

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant schwächere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 10); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 11)).

3.3 Einfluss von Flavonoiden auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Experimente mit Apigenin und Luteolin zusammengefasst. Der Einfluss von Apigenin und Luteolin auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation wurde in den Konzentrationsbereichen von $1.0 \mu\text{M}$ bis $50.0 \mu\text{M}$ im Rahmen von Kurz- und Langzeitversuchen erfasst.

In den Kurzzeitversuchen hemmte Apigenin die NEP-Aktivität bei der Konzentration $10.0 \mu\text{M}$ um 20 % und in der maximalen Konzentration um 32 %. Luteolin konnte die NEP-Aktivität in der maximalen Konzentration um 47 % hemmen (Tab. 8).

In den Langzeitversuchen konnten Apigenin und Luteolin bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ die NEP-Aktivität um 150 % erhöhen (Abb. 16) und die Zellproliferation um 70 % hemmen (Tab. 9).

Tabelle 8: Einfluss von Apigenin und Luteolin (Kurzzeit) auf die NEP-Aktivität

	Konzentration	NEP-Aktivität
	in μM	in % zur Kontrolle
Apigenin	10.0	80 \pm 9*
	20.0	73 \pm 12*
	30.0	69 \pm 9*
	50.0	68 \pm 10*
Luteolin	10.0	80 \pm 7*
	20.0	77 \pm 8*
	30.0	67 \pm 9*
	50.0	53 \pm 8*

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.2), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 1 Stunde (Kurzzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; p < 0.05; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 10)).

Tabelle 9: Einfluss von Apigenin und Luteolin (Langzeitversuche) auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation.

	Konzentration	NEP-Aktivität	Zellproliferation
	in μM	in % zur Kontrolle	in % zur Kontrolle
Apigenin	1.0	104 \pm 11	92 \pm 10
	5.0	106 \pm 7	86 \pm 5
	10.0	254 \pm 17*	31 \pm 13**
	20.0	507 \pm 18*	15 \pm 11**
	30.0	638 \pm 13*	12 \pm 13**
	50.0	816 \pm 9*	10 \pm 7**
Luteolin	1.0	105 \pm 8	97 \pm 11
	5.0	107 \pm 7	85 \pm 6
	10.0	250 \pm 13*	23 \pm 22**
	20.0	580 \pm 7*	9 \pm 12**
	30.0	623 \pm 16*	8 \pm 10**
	50.0	1452 \pm 17*	5 \pm 9**

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 72–96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; p < 0.05; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 11); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 12)).

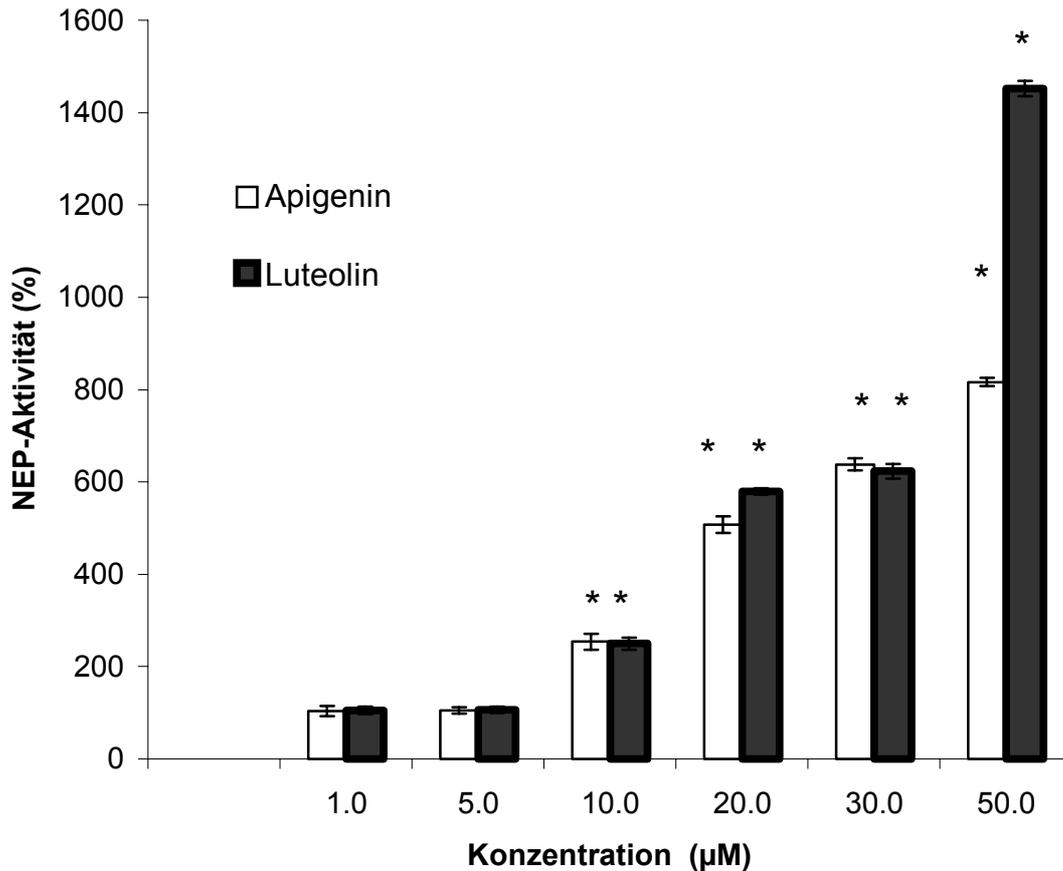


Abbildung 16: Untersuchung des Einflusses von Apigenin und Luteolin auf die NEP-Aktivität
 Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 5.2.1.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche);
 Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; *
 signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle 100 ± 11).

3.4 Untersuchung von weiteren Naturstoffen

In diesem Kapitel wurden die Einflüsse der folgenden Substanzen im Rahmen von Langzeitversuchen dargestellt: Vinpocetin, Curcumin, Nikotin, Deoxyepiganin und Triiodotyronin (T3). Die Auswahl der Substanzen erfolgte aufgrund ihrer positiven Wirkungen bei Demenz und AD (Imamoto et al. 1984; Ono et al. 2004; Belluardo et al. 2004; Tarasiuk et al. 1989; Latasa et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Substanzen hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation untersucht.

Vinpocetin wurde im Konzentrationsbereich von 1.0 µM bis 50.0 µM untersucht. In der maximalen Konzentration induzierte Vinpocetin die NEP-Aktivität um 62 % und hemmte die Zellproliferation um 72 % (Tab. 10). Curcumin wurde im Konzentrationsbereich von 0.5 µM bis 5.0 µM untersucht. In der maximalen Konzentration konnte Curcumin die NEP-Aktivität um 190 % erhöhen und die Zellproliferation um 73 % hemmen (Tab. 10). Triiodotyronin wurde bei

Konzentrationen von 0.01 μM bis 10.0 μM untersucht. Triiodotyronin hatte weder Einfluss auf die NEP-Aktivität noch auf die Zellproliferation (Tab. 10).

Tabelle 10: Einfluss von Vinpocetin, Curcumin und Triiodotyronin (T3) auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation

	Konzentration in μM	NEP-Aktivität in %	Zellproliferation in %
Vinpocetin	Kontrolle	100 \pm 9	100 \pm 7
	1.0	100 \pm 5	100 \pm 4
	10.0	119 \pm 4*	80 \pm 8**
	20.0	128 \pm 10*	52 \pm 9**
	30.0	137 \pm 10*	39 \pm 12**
	50.0	162 \pm 5*	28 \pm 6**
Curcumin	Kontrolle	100 \pm 10	100 \pm 7
	0.5	101 \pm 8	95 \pm 5
	1.0	107 \pm 16	85 \pm 8
	2.5	143 \pm 11*	60 \pm 13**
	5.0	290 \pm 10*	27 \pm 15**
Triiodotyronin	Kontrolle	100 \pm 8	100 \pm 6
	0.01	99 \pm 8	100 \pm 6
	0.1	102 \pm 7	101 \pm 4
	1.0	98 \pm 9	101 \pm 6
	5.0	93 \pm 10	102 \pm 5
	10.0	90 \pm 9	102 \pm 4

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle; ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle).

Nikotin und Deoxyepiganin wurden in Konzentrationen von 1.0 μM bis 1.0 mM untersucht. Deoxyepiganin erhöhte in der maximalen Konzentration die NEP-Aktivität um 44 % mit gleichzeitiger Hemmung der Zellproliferation um 34 %. Nikotin hatte keinen Einfluss, weder auf die NEP-Aktivität, noch auf die Zellproliferation (Tab. 11).

Tabelle 11: Einfluss von Deoxypeganin und Nikotin auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation

	Konzentration in μM	NEP-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
Deoxypeganin	1.0	105 \pm 10	98 \pm 5
	10.0	120 \pm 12	85 \pm 11
	100.0	126 \pm 8*	80 \pm 9**
	500.0	132 \pm 5*	68 \pm 12**
	1000.0	144 \pm 11*	66 \pm 49**
Nikotin	1.0	100 \pm 5	100 \pm 4
	10.0	99 \pm 7	100 \pm 6
	100.0	100 \pm 5	101 \pm 7
	500.0	105 \pm 7	99 \pm 9

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; p < 0.05; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 7); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle(100 \pm 10)).

3.5 Untersuchungen zu Wirkungsmechanismen der untersuchten Extrakte und Reinsubstanzen

3.5.1 Blockade der Synthese von DNA durch Arabinosylcytosin

Die ersten Untersuchungen zu den Wirkungsmechanismen wurden an SK-N-SH-Zellen mit Blockade der DNA-Synthese durchgeführt. Arabinosylcytosin wirkt als ein selektiver Blocker der DNA-Synthese (Kufe and Major 1982). Verschiedene Konzentrationen (5.0-100.0 ng/ml) von Arabinosylcytosin wurden über einen Zeitraum von 96 Stunden ins Zellsystem appliziert und die Auswirkungen auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation untersucht.

Am Verlauf der Kurve der Wachstumshemmung wurde deutlich, dass kein plötzlicher Zelltod stattfand, sondern eine Hemmung des Zellwachstums vorlag, welche von der Konzentration abhängig war. Arabinosylcytosin induzierte allein die NEP-Aktivität in Zusammenhang mit einer starken Hemmung der Zellproliferation. Bei einer Konzentration von 60.0 ng/ml wurde die Aktivität der NEP um 264 % erhöht und die Zellproliferation um 72 % gehemmt (Abb. 17). Dies wies auf eine Erhöhung der Zelldifferenzierung hin.

Mit Hilfe der Hämatoxylinfärbung konnte die vermutete Zelldifferenzierung durch 60.0 ng/ml Arabinosylcytosin bestätigt werden, die verstärkte Ausbildung von Neuriten-ähnlichen Ausläufer (Abb. 18).

Alle weiteren Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus fanden bei einer Konzentration von 60.0 ng/ml statt.

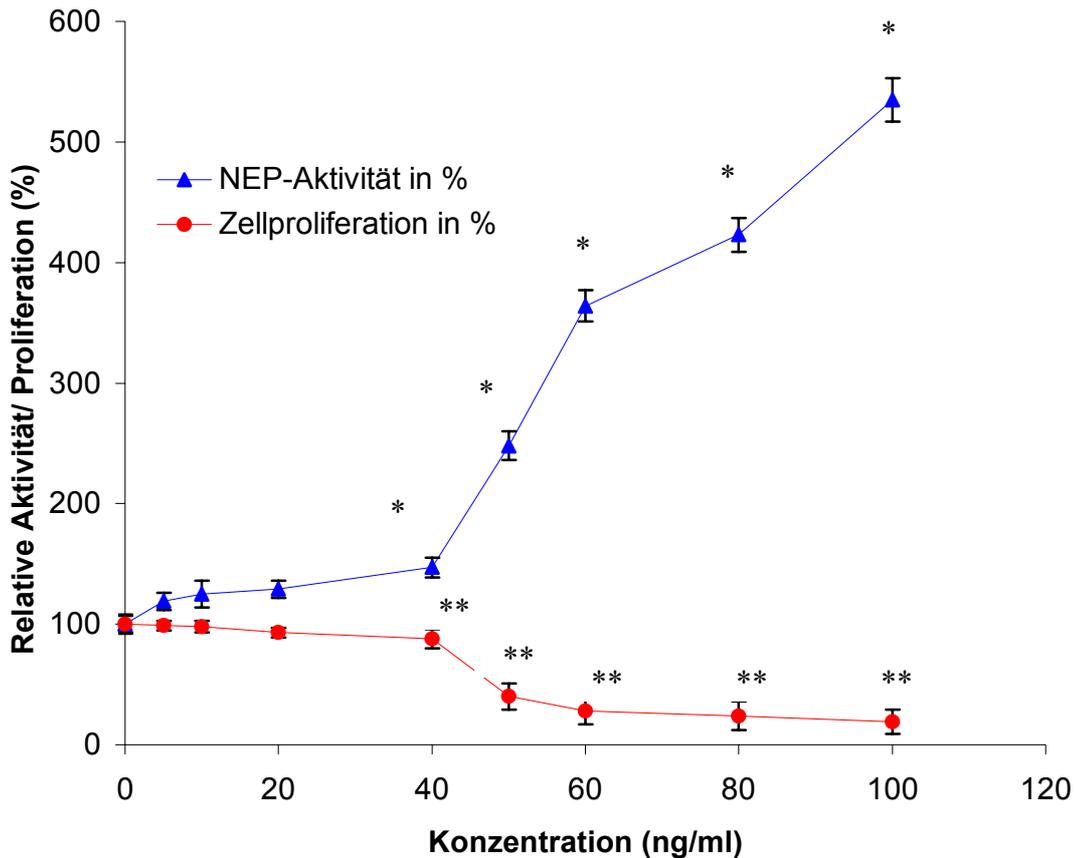
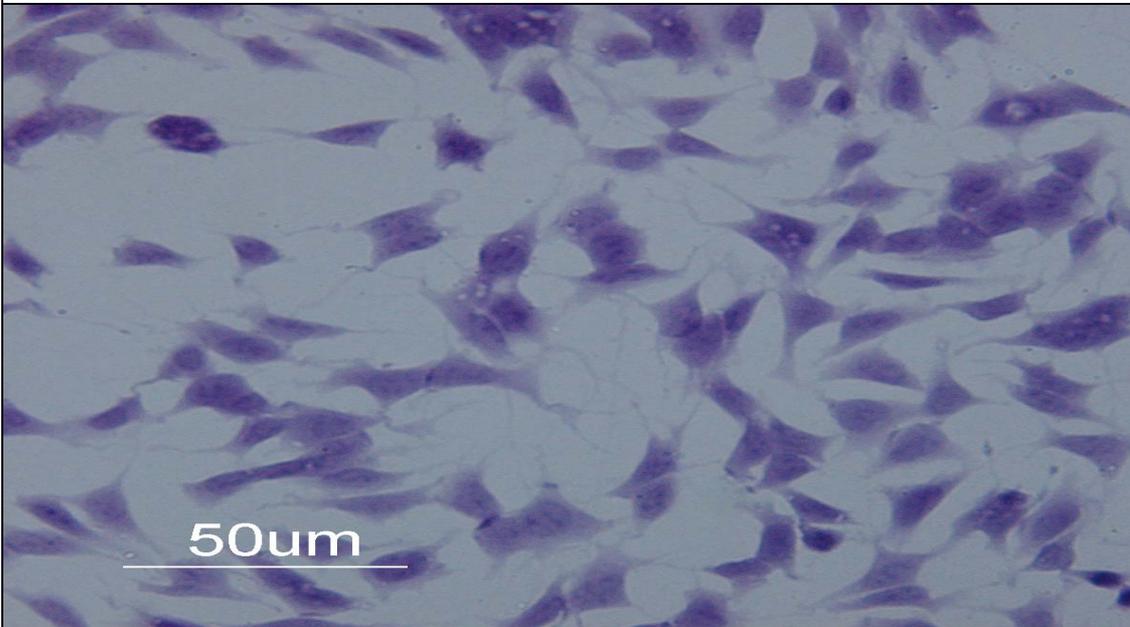


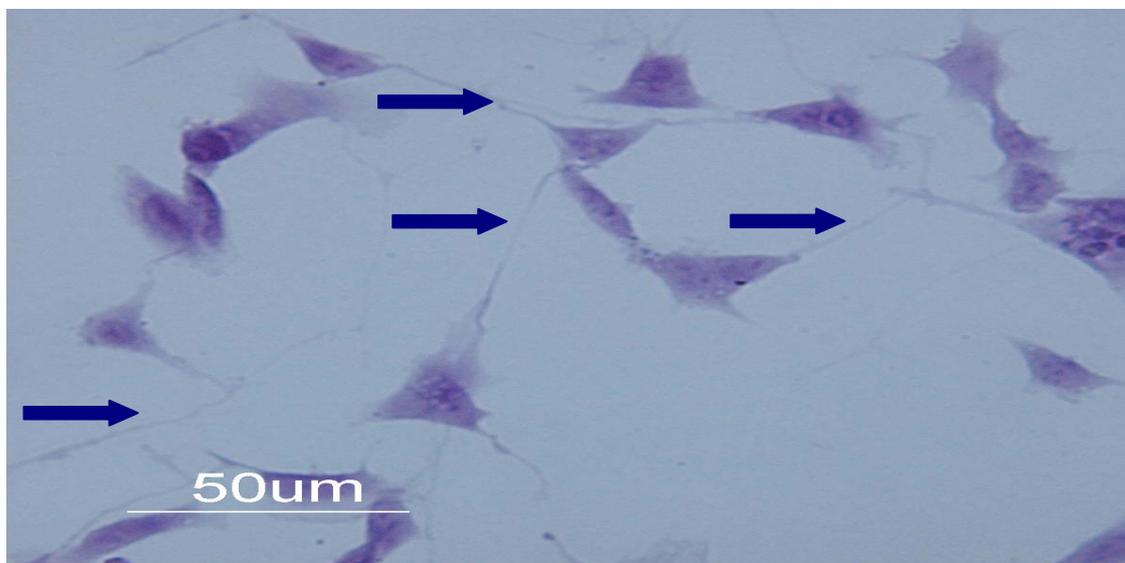
Abbildung 17: Untersuchung des Einflusses von Arabinosylcytosin auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle 100 ± 10 ; ** signifikant stärkere Proliferationshemmung im Vergleich zur Kontrolle 100 ± 11).

Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Abbildung von SK-N-SH-Monolayern mit und ohne Arabinosylcytosin (60.0 ng/ml)



a) Monolayer einer intakten SK-N-SH-Zelllinie
(Proliferationszeit: 72h, Hämatoxylinfärbung)



b) SK-N-SH-Zellen mit Arabinosylcytosin (60.0 ng/ml)
(Proliferationszeit: 72h, Hämatoxylinfärbung)

Hämatoxylinfärbung: siehe Abschnitt 2.9

Abbildung 18: Einfluss von Arabinosylcytosin auf die Proliferation der SK-N-SH-Zelllinie

a) SK-N-SH-Zellen ohne Arabinosylcytosin

b) SK-N-SH-Zellen mit Arabinosylcytosin (60.0 ng/ml)

 Neuriten-ähnliche Ausläufer → Kennzeichen für differenzierte Nervenzellen

3.5.2 Einfluss von ausgewählten untersuchter Substanzen in Kombination mit Arabinosylcytosin

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente dargestellt, die den Einfluss von ausgewählten Substanzen auf die NEP-Aktivität nach der Blockade der DNA-Synthese untersuchten. Diese Substanzen konnten konzentrationsabhängig die NEP-Aktivität erhöhen und die Zellproliferation hemmen (siehe Tab. 2; 3; 4; 9 und 10). Aus diesem Grund wurden sie für diese Versuche ausgewählt. Es sollte herausgefunden werden, ob die Erhöhung der Enzym-Aktivität durch diese Substanzen von der Zelldifferenzierung abhängig war. Für diese Untersuchungen wurde Arabinosylcytosin, als Blocker der DNA-Synthese, in einer Konzentration von 60.0 ng/ml verwendet. Im Rahmen von Langzeitversuchen wurden die untersuchten Substanzen zusammen mit Arabinosylcytosin (60.0 ng/ml) auf die SK-N-SH-Zellen gegeben. Coffein, Theophyllin und Theanin wurden in der Konzentration von 50 μ M untersucht, während Apigenin, Luteolin und die Kombination von EC, EGC, EGCG und Coffein in der Konzentration von 10 μ M untersucht wurden. Vinpocetin wurde in der Konzentration von 10 μ M und 20 μ M untersucht und Curcumin wurde in in der Konzentration von 2.5 μ M und 5 μ M getestet. Nach der Blockade der DNA-Synthese durch Arabinosylcytosin hatten Coffein, Theophyllin und Theanin keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität der NEP. Die Kombination von EC, EGC, EGCG und Coffein erhöhte die NEP-Aktivität um 20 %.

Curcumin hatte keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität der NEP. Apigenin und Luteolin konnten die NEP-Aktivität zusätzlich um 35 % bzw. 38 % erhöhen (Tab. 12).

Vinpocetin hemmte bei 10.0 μ M die NEP-Aktivität um 30 % und erhöhte die Zellproliferation um 59 %. In der Konzentration von 20 μ M konnte Vinpocetin die NEP-Aktivität um 55 % hemmen und die Zellproliferation um 90 % im Vergleich zur Kontrolle erhöhen. Im Vergleich zur Zellproliferation ohne Arabinosylcytosin könnte diese Erhöhung damit erklärt werden, dass Vinpocetin den totalen Effekt von Arabinosylcytosin auf die Zellproliferation nicht aufhebt (Tab. 12).

Tabelle 12: Einfluss von Coffein (Coff), Theophyllin (ThP), EC in Kombination mit EGC, EGCG und Coffein (Coff), Theanin (ThN), Curcumin (Cur), Apigenin (Api), Luteolin (Lut) und Vinpocetin (Vin) nach der Blockade der DNA-Synthese durch Arabinosylcytosin (ARC) (60.0 ng/ml) auf die Aktivität der NEP

	Konzentration	NEP-Aktivität in %	Zellproliferation in %
Ohne ARC	00.00	100 ± 10	100 ± 11
ARS	60.0 ng/ml	364 ± 13*	28 ± 11
Coff	50.0 µM	377 ± 12	27 ± 12
ThP	50.0 µM	366 ± 11	27 ± 13
EC+EGC+EGCG+Coff	10.0 µM	384 ± 8*	25 ± 6
ThN	50.0 µM	368 ± 10	25 ± 11
Cur	2.5 µM	370 ± 10	25 ± 5
	5.0 µM	377 ± 5	28 ± 9
Api	10.0 µM	499 ± 12*	34 ± 13
Lut	10.0 µM	500 ± 6*	25 ± 9
Vin	10.0 µM	334 ± 10*	34 ± 10**
	20.0 µM	309 ± 7*	45 ± 9**

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert ± SD, n=3 mit vier parallelen Proben; p < 0.05; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (60 ng/ml Arabinosylcytosin)); ** signifikant stärkere Erhöhung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (60 ng/ml Arabinosylcytosin)).

3.5.3 Einfluss von Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram

Trotz der Blockade der DNA-Synthese durch Arabinosylcytosin wurde die NEP-Aktivität durch einige der untersuchten Substanzen erhöht. Das könnte dadurch erklärt werden, dass andere Wirkungsmechanismen neben der Zelldifferenzierung für die Induktion der NEP-Aktivität verantwortlich sind. Es wurde vermutet, dass die Erhöhung der NEP-Aktivität von der Erhöhung des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP), das die NEP Gen-Expression über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren erhöht, abhängig ist. Deshalb wurde der Einfluss anderer Substanzen, welche den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen können, geprüft. Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram wurden in den Konzentrationsbereichen von 1.0 µM bis 10.0 µM untersucht. Die drei Substanzen erhöhten die Aktivität der NEP

ohne die Zellproliferation zu hemmen (Abb. 19). Die NEP-Aktivität konnte durch Rolipram (10.0 μM) um 50 %, durch Forskolin um 35 % und durch Dibutyryl-cAMP um 26 % erhöht werden (Tab. 13).

Tabelle 13: Einfluss von Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation

Konzentration in μM	NEP-Aktivität in %	Zellproliferation in %
Rolipram		
Kontrolle	100 \pm 8	100 \pm 8
1.0	115 \pm 6*	100 \pm 8
5.0	122 \pm 5*	102 \pm 6
10.0	150 \pm 9*	101 \pm 7
Forskolin		
Kontrolle	100 \pm 11	100 \pm 8
1.0	110 \pm 6	106 \pm 6
5.0	118 \pm 4*	100 \pm 5
10.0	132 \pm 10*	106 \pm 10
20.0	135 \pm 8*	90 \pm 8
Dibutyryl-cAMP		
Kontrolle	100 \pm 6	100 \pm 5
0.5	110 \pm 5	99 \pm 5
1.0	113 \pm 7	97 \pm 3
2.5	117 \pm 6*	95 \pm 6
5.0	124 \pm 6*	95 \pm 6
10.0	126 \pm 5*	94 \pm 8

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; p < 0.05; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle; keine signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle).

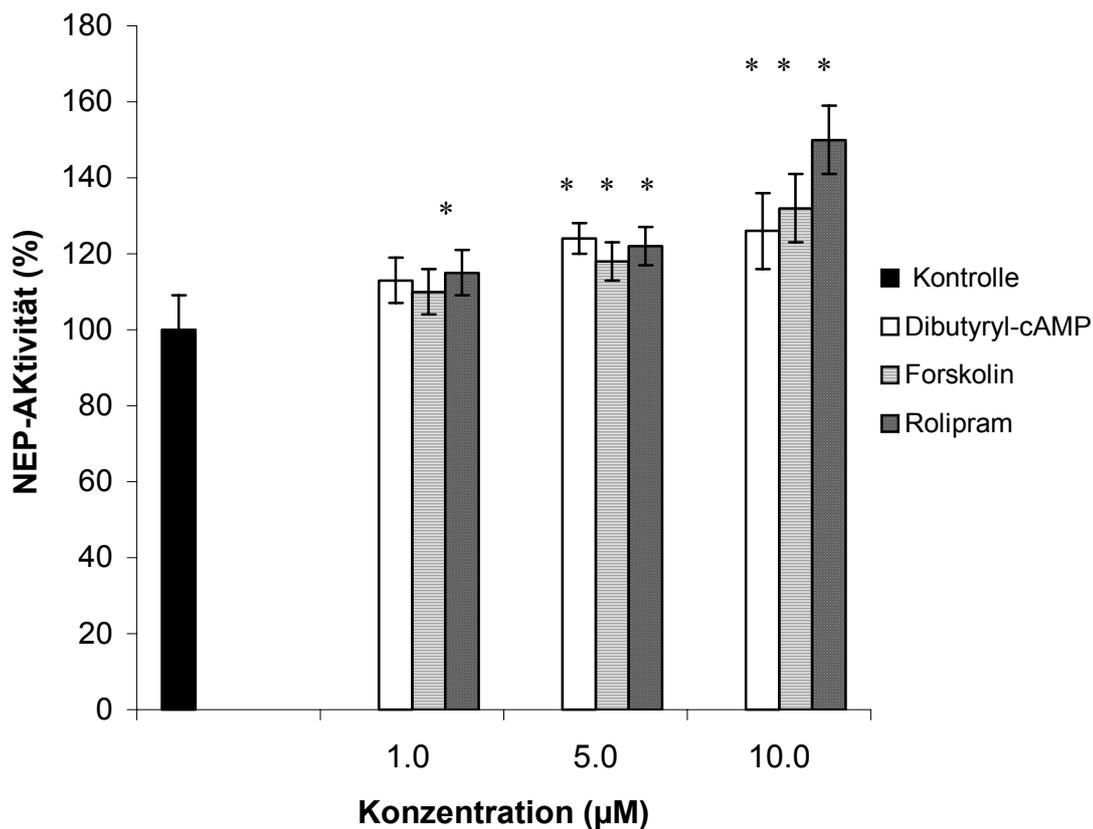


Abbildung 19: Untersuchung des Einflusses von Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram auf die NEP-Aktivität

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle).

3.6 Einfluss ausgewählter Substanzen auf die ACE-Aktivität

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente zusammengefasst, die den Einfluss von ausgewählten Substanzen, welche die NEP-Aktivität erhöhten, auf die ACE-Aktivität untersuchten. Diese Untersuchungen waren notwendig um herauszufinden, ob diese Substanzen spezifisch nur die NEP-Aktivität beeinflussten.

3.6.1 Einfluss von Coffein und Theophyllin

Der Effekt von Coffein und Theophyllin wurde in den Konzentrationsbereichen von 1.0 µM bis 1000.0 µM untersucht (Tab. 14). Coffein konnte die ACE-Aktivität nur in der maximalen Konzentration um 30 % erhöhen und die Zellproliferation um 28 % hemmen. Mit Theophyllin konnten keine signifikanten Effekte auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation registriert werden.

Tabelle 14: Einfluss von Coffein und Theophyllin auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation

Konzentration in μM	ACE-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
Coffein		
1.0	98 \pm 12	98 \pm 10
10.0	103 \pm 13	92 \pm 11
100.0	112 \pm 10	85 \pm 13
500.0	119 \pm 8*	80 \pm 10**
1000.0	130 \pm 9*	72 \pm 12**
Theophyllin		
1.0	108 \pm 13	96 \pm 8
10.0	110 \pm 13	97 \pm 6
100.0	110 \pm 9	97 \pm 7
500.0	124 \pm 6*	76 \pm 5**
1000.0	136 \pm 6*	64 \pm 9**

Methode: ACE-Assay (siehe Abschnitt 2.5.2.2), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 10); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 7)).

3.6.2 Einfluss von EC und EGC in Kombination

EC in Kombination mit Coffein hatte keinen Einfluss auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation. Während EC mit Theophyllin die Enzymaktivität um 14 % anhob und die Zellproliferation um 8 % hemmte, hatte EC mit Coffein und Theophyllin zusammen keinen Einfluss auf die Enzymaktivität und auf die Zellproliferation (Tab. 15).

EGC in Kombination mit Coffein und/oder Theophyllin konnte weder die ACE-Aktivität noch die Zellproliferation beeinflussen (Tab. 15).

Tabelle 15: Einfluss von Epicatechin (EC) und Epigallocatechin (EGC) in Kombination mit Coffein (Coff) und/oder Theophyllin (ThP) auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation

	Konzentration in μM	ACE-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
EC + Coff	1.0	106 \pm 7	100 \pm 6
	10.0	110 \pm 6	95 \pm 8
EC + ThP	1.0	110 \pm 4	95 \pm 9
	10.0	114 \pm 9*	92 \pm 8
EC + Coff + ThP	1.0	110 \pm 9	94 \pm 10
	10.0	111 \pm 8	95 \pm 11
EGC + Coff	1.0	99 \pm 10	100 \pm 8
	10.0	103 \pm 11	97 \pm 11
EGC + ThP	1.0	100 \pm 10	99 \pm 11
	10.0	103 \pm 11	94 \pm 9
EGC + Coff + ThP	1	98 \pm 6	100 \pm 10
	10	102 \pm 6	97 \pm 7

Methode: ACE-Assay (siehe Abschnitt 2.5.2.2), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0,05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle; keine signifikante Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle).

3.6.3 Einfluss des Ginkgo-biloba-Extrakts

Ginkgo-biloba-Extrakt wurde in Ethanol (50 %) gelöst und im Konzentrationsbereich von 1.0 $\mu\text{g/ml}$ bis 100.0 $\mu\text{g/ml}$ hinsichtlich seiner Auswirkungen auf die ACE-Aktivität und die Zellproliferation untersucht. Ab einer Konzentration von 50.0 $\mu\text{g/ml}$ wurde ein Induktionseffekt auf die Enzymaktivität und eine Hemmungswirkung auf die Zellproliferation registriert. In der maximalen Konzentration konnte Ginkgo-biloba-Extrakt die Enzymaktivität um 38 % erhöhen und die Zellproliferation um 36 % hemmen (Tab. 16).

Tabelle 16: Einfluss des Ginkgo-biloba-Extrakts auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation

Konzentration in µg/ml	ACE-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
1.0	100 ± 11	100 ± 7
5.0	99 ± 10	103 ± 4
10.0	107 ± 10	96 ± 8
25.0	112 ± 11*	86 ± 11**
50.0	121 ± 8*	76 ± 10**
75.0	131 ± 5*	65 ± 4**
100.0	138 ± 10*	64 ± 11**

Methode: ACE-Assay (siehe Abschnitt 2.5.2.2), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert ± SD, n=3 mit vier parallelen Proben; p < 0.05; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 12); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 9)).

3.6.4 Einfluss von Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram

Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram wurden in der Konzentration von 10.0 µM auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation untersucht. Hier konnte kein Einfluss auf die Enzymaktivität und auf die Zellproliferation festgestellt werden (Tab. 17).

Tabelle 17: Einfluss von Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation

	Konzentration in µM	ACE-Aktivität in %	Zellproliferation in %
Dibutyryl-cAMP	Kontrolle	100 ± 7	100 ± 7
	10.0	105 ± 10	101 ± 10
Forskolin	Kontrolle	100 ± 4	100 ± 3
	10.0	100 ± 6	104 ± 6
Rolipram	Kontrolle	100 ± 4	100 ± 3
	10.0	106 ± 8	98 ± 4

Methode: ACE-Assay (siehe Abschnitt 2.5.2.2), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert ± SD, n=3 mit vier parallelen Proben; p < 0.05; keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle).

3.6.5 Einfluss von Apigenin und Luteolin

Apigenin und Luteolin wurden in den Konzentrationen von 10.0 μM und 20.0 μM auf die Enzymaktivität und auf die Zellproliferation untersucht. Die Enzymaktivität konnte durch Apigenin in der Konzentration von 10.0 μM um 130 % gesteigert werden. Luteolin erhöhte die Enzymaktivität um 230 % (Abb. 20).

Die Zellproliferation wurde durch 10.0 μM Apigenin um 54 % und durch 10.0 μM Luteolin um 67 % gehemmt (Tab. 18). In der Konzentration von 20.0 μM konnten Apigenin und Luteolin die Enzymaktivität um über 700 % erhöhen und die Zellproliferation über 80 % hemmen (Tab. 18).

Tabelle 18: Einfluss von Apigenin und Luteolin auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation

Konzentration		ACE-Aktivität	Zellproliferation
in μM		in % zur Kontrolle	in % zur Kontrolle
Apigenin	10.0	230 \pm 16*	46 \pm 14**
	20.0	800 \pm 14*	13 \pm 4**
Luteolin	10.0	330 \pm 13*	33 \pm 11**
	20.0	850 \pm 11*	12 \pm 5**

Methode: ACE-Assay (siehe Abschnitt 2.5.2.2), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 13); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 7)).

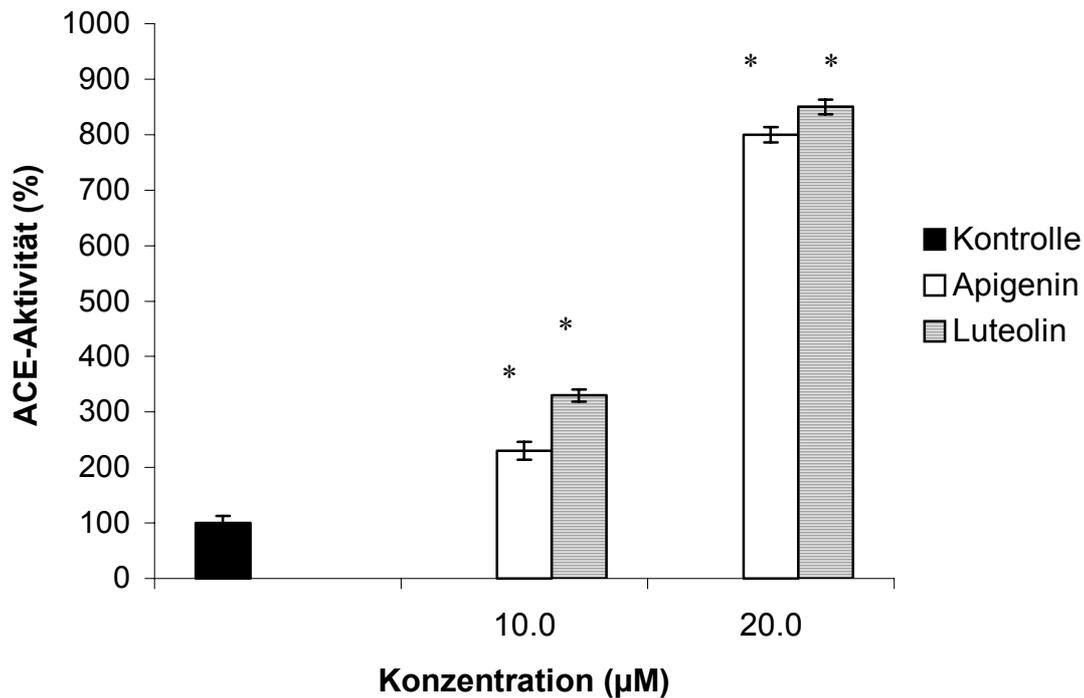


Abbildung 20: Untersuchung des Einflusses von Apigenin und Luteolin auf die ACE-Aktivität
 Methode: ACE-Assay (siehe Abschnitt 2.5.2.2); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche);
 Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; *
 signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle).

3.6.6 Einfluss von Vinpocetin, Curcumin und Triiodotyronin

Der Effekt von Vinpocetin auf die ACE-Aktivität und die Zellproliferation wurde in den Konzentrationen von 10.0 µM und 20.0 µM untersucht. Vinpocetin konnte die Enzymaktivität in der Konzentration von 10.0 µM um 30 % und in der Konzentration von 20.0 µM um 78 % erhöhen. Bei 20.0 µM Vinpocetin wurde eine Hemmung der Zellproliferation von über 40 % registriert. Curcumin wurde in den Konzentrationen von 2.5 µM und 5.0 µM auf die Enzymaktivität und die Zellproliferation untersucht. Durch 5.0 µM Curcumin konnte die Enzymaktivität um 147 % erhöht und die Zellproliferation um 65 % gehemmt werden (Tab. 19). Der Einfluss von Triiodotyronin auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation in den Konzentrationsbereichen von 0.1 µM bis 10.0 µM wurde untersucht. In der maximalen Konzentration hemmte Triiodotyronin die Enzymaktivität um 10 %, bei einer Erhöhung der Zellproliferation um 12 % (Tab. 19).

Tabelle 19: Einfluss von Vinpocetin, Curcumin und Triiodotyronin (T3) auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation

Konzentration	ACE-Aktivität	Zellproliferation
in μM	in %	in %
Vinpocetin Kontrolle	100 \pm 16	100 \pm 10
10.0	130 \pm 15*	81 \pm 13**
20.0	178 \pm 20*	54 \pm 10**
Curcumin Kontrolle	100 \pm 14	100 \pm 7
2.5	134 \pm 20*	76 \pm 15**
5.0	247 \pm 7*	35 \pm 11**
Triiodotyronin Kontrolle	100 \pm 6	100 \pm 3
0.1	99 \pm 5	105 \pm 5
1.0	97 \pm 6	101 \pm 8
5.0	92 \pm 9	110 \pm 6
10.0	90 \pm 10	112 \pm 6

Methode: ACE-Assay (siehe Abschnitt 2.5.2.2), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; p < 0.05; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle; ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle).

3.7 Einfluss von ausgewählten Substanzen auf die Menge von endogen gebildetem β -Amyloid-Peptid 1-42 ($\text{A}\beta$ 1-42)

Amyloid-Peptid 1-42 ($\text{A}\beta$ 1-42) wird durch verschiedene Enzyme in vivo abgebaut. NEP spielt eine große Rolle beim Abbau von β -Amyloid in vivo (Iwata et al. 2001). Die wichtige Rolle von NEP wurde durch die Infusion des Metalloprotease-Inhibitors Thiorphan in den Hippocampus von Ratten gezeigt. Diese Infusion zeigte einen eingeschränkten $\text{A}\beta$ -Abbau durch Hemmung von NEP (Iwata et al. 2000).

Die Bestimmung des $\text{A}\beta$ 1-42 wurde auf SK-N-SH-Zellen, die $\text{A}\beta$ produzieren können (Haugabook et al. 2001), übertragen (siehe Abschnitt 2.7). Die Menge von $\text{A}\beta$ 1-42 in pg/ml wurde für das erste Experiment nach der Kalibriergerade der Abbildung 23 und für das zweite Experiment nach der Kalibriergerade der Abbildung 24 berechnet.

3.7.1 Erste Experimentserie

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente dargestellt, die den Effekt von Grüntee-Extrakt, Apigenin, Luteolin, Curcumin, Rolipram und Phosphoramidon auf die Menge des A β 1-42 untersuchten. Diese Substanzen wurden zu 1.0 ml Medium (1 % FBS) in 6-Well Platten gegeben, in welche SK-N-SH-Zellen ausgesät worden waren. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5 % CO₂ und 95 % Luft enthielt, für 72 Stunden kultiviert. Dann wurde das Medium zur Bestimmung der endogenen A β 1-42 gesammelt (Kap. 2.7.2.1).

Grüntee-Extrakt wurde in der Konzentration von 50.0 μ g/ml getestet, während Apigenin, Luteolin, Rolipram und Phosphoramidon in der Konzentration von 10.0 μ M untersucht wurden. In der Konzentration von 5.0 μ M wurde Curcumin untersucht. Apigenin, Luteolin Curcumin und Rolipram hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Menge von A β 1-42. Grüntee-Extrakt konnte die Menge von endogenen produzierten und ins Medium sezernierten A β 1-42 um 162 % erhöhen. Phosphoramidon, ein NEP-Inhibitor, in der Konzentration von 10 μ M konnte die Menge von A β 1-42 um 31 % erhöhen (Tab. 20).

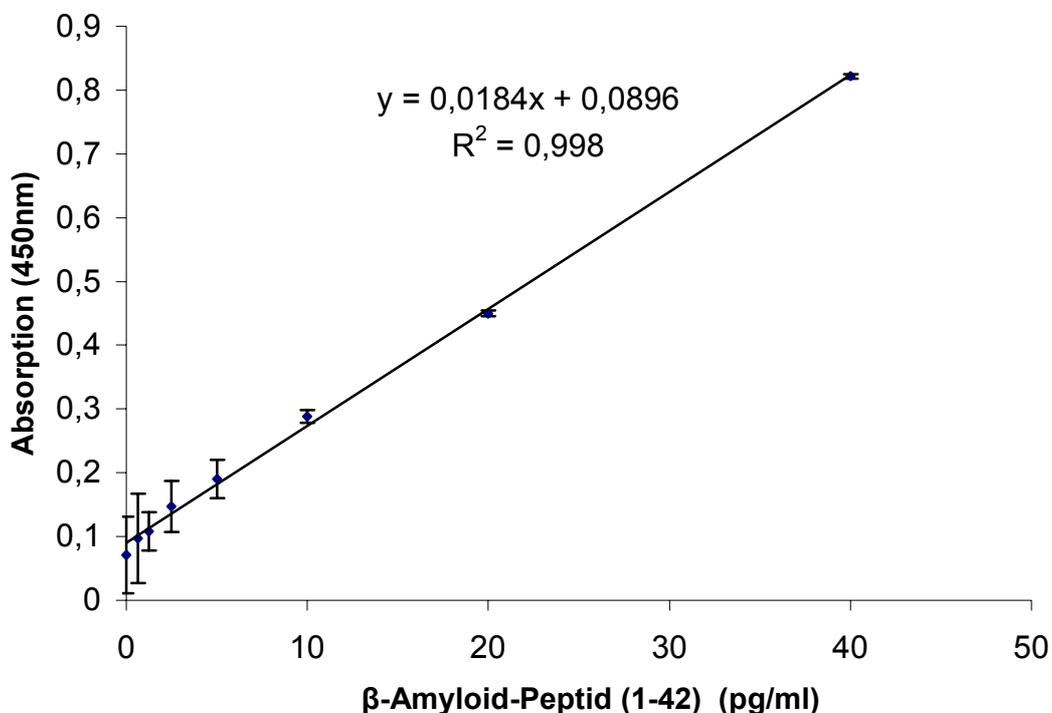


Abbildung 21: Kalibriergerade für β -Amyloid-Peptid-Assay von Kit (Nr. 1). Jeweils 100 μ l jeder β -Amyloid-Peptide-Verdünnung wurde mit 100 μ l Antikörperlösung, 100 μ l Chromogen und 100 μ l Stopplösung bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Tabelle 20: Einfluss von Grüntee-Extrakt, Apigenin, Luteolin, Curcumin und Rolipram auf die Menge von A β 1-42

Substanzen	A β 1-42 in pg/ml	A β 1-42 per μ g DNA	A β 1-42 per μ g DNA in %
Kontrolle	26.2 \pm 1.3	0.45 \pm 0.0225	100 \pm 5
Grüntee-Extrakt (50.0 μ g/ml)	70.0 \pm 4.9*	1.18 \pm 0.082*	262 \pm 7*
Apigenin (10.0 μ M)	22.1 \pm 1.32	0.44 \pm 0.026	98 \pm 6
Luteolin (10.0 μ M)	23.2 \pm 2.01	0.46 \pm 0.041	102 \pm 9
Curcumin (5.0 μ M)	20.0 \pm 0.6	0.43 \pm 0.012	96 \pm 3
Rolipram (10.0 μ M)	15.3 \pm 1.22	0.42 \pm 0.034	94 \pm 8
Phosphoramidon (10.0 μ M)	56.0 \pm 3.36*	0.59 \pm 0.035*	131 \pm 6*

Methode: Bestimmung von A β 1-42 mit ELISA-Kit (siehe Abschnitt 2.7.3); Inkubationszeit: 72 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH; Kalibriergerade: Abb. 21; 1.0 μ g DNA entspricht 100000 Zellen (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=8; p < 0.05; * signifikant stärkere Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle).

3.7.2 Zweite Experimentserie

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente wiedergegeben, die mit dem zweiten Kit (siehe Abschnitt 2.7.2.2) durchgeführt wurden. Hierbei wurde der Effekt von Grüntee-Extrakt, Apigenin, Luteolin und Curcumin auf die Menge des endogen gebildeten A β 1-42 untersucht. Phosphoramidon wurde zu 1.0 ml Medium (1 % FBS) in 6-Well-Platten gegeben, in welche SK-N-SH-Zellen ausgesät worden waren, und für weitere 3 Tage kultiviert. Grüntee-Extrakt, Apigenin, Luteolin und Curcumin wurden zu 2.0 ml Medium (10 % FBS) in 6-Well-Platten gegeben, in welche SK-N-SH-Zellen ausgesät worden waren. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5 % CO₂ und 95 % Luft enthielt, für 48 Stunden kultiviert. Das Medium wurde auf 1.0 ml (1 % FBS) Medium gewechselt und die Zellen wurden im Brutschrank für weitere 24 Stunden kultiviert.

Grüntee-Extrakt wurde in der Konzentration von 50.0 μ g/ml getestet, während Apigenin und Luteolin in der Konzentration von 10.0 μ M untersucht wurden. In der Konzentration von 5.0 μ M wurde Curcumin untersucht. Apigenin, Luteolin und Curcumin konnten signifikant die Menge von endogenen produzierten und im Medium sekretierten A β 1-42 hemmen. Grüntee-Extrakt konnte die Menge von A β 1-42 um 34 % erhöhen (Tab. 21).

Kalibriergerade für Beta-Amyloid-Peptid (1-42)-Assay

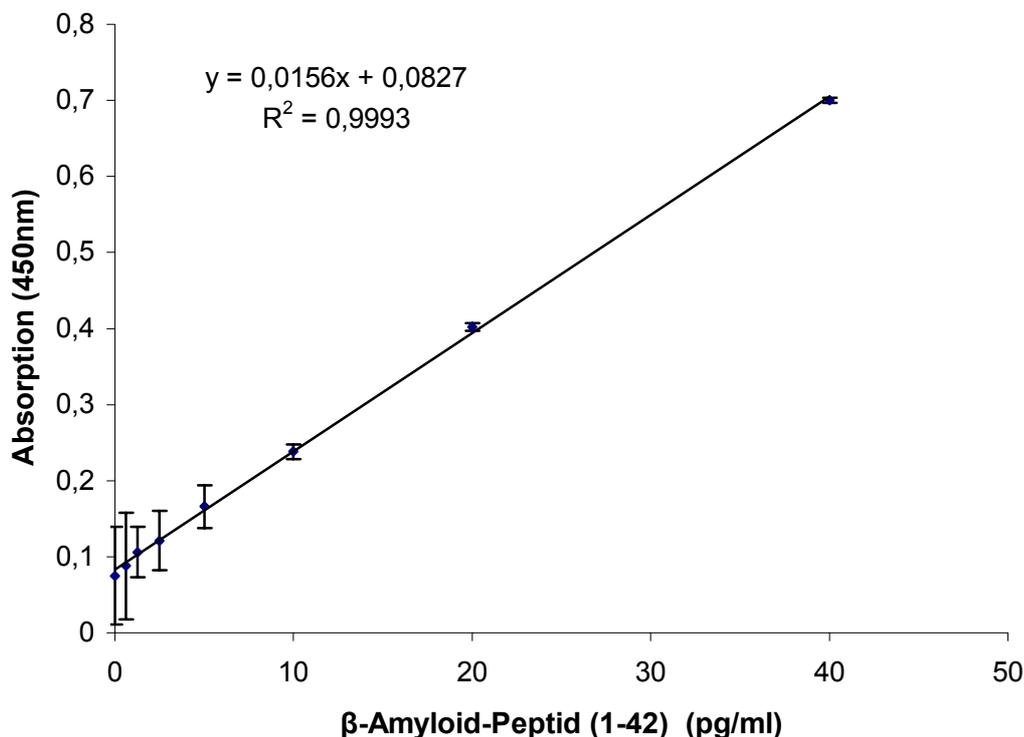


Abbildung 22: Kalibriergerade für β -Amyloid-Peptid ($A\beta$ 1-42)-Assay von Kit (Nr. 2). Jeweils 100 μ l jeder einzelnen β -Amyloid-Peptid-Verdünnung wurde mit 100 μ l Antikörperlösung, 100 μ l Chromogen und 100 μ l Stopplösung bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Tabelle 21: Einfluss von Grüntee-Extrakt, Apigenin, Luteolin und Curcumin auf die Menge von $A\beta$ 1-42

Substanzen	$A\beta$ 1-42 in pg/ml	$A\beta$ 1-42 per μ g DNA	$A\beta$ 1-42 per μ g DNA in %
Kontrolle	37.5 \pm 2.25	0.50 \pm 0.03	100 \pm 6
Grüntee-Extrakt (50.0 μ g/ml)	42.8 \pm 1.28*	0.67 \pm 0.02*	134 \pm 3*
Apigenin (10.0 μ M)	28.0 \pm 0.56*	0.43 \pm 0.009*	86 \pm 3*
Luteolin (10.0 μ M)	25.8 \pm 1.03*	0.44 \pm 0.017*	88 \pm 4*
Curcumin (5.0 μ M)	34.0 \pm 1.02*	0.45 \pm 0.018*	90 \pm 4*

Methode: Bestimmung von $A\beta$ 1-42 mit ELISA-Kit (Abschnitt 2.7.3); Inkubationszeit: 24 Stunden; Zelllinie: SK-N-SH; Kalibriergerade: Abb. 22; 1.0 μ g DNA entspricht 100000 Zellen (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=8; p < 0.05; * signifikant stärkere Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle).

3.8 Einfluss von ausgewählten Testsubstanzen auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration

Das cAMP kann als second Messenger verschiedene Enzyme durch Induktion der Phosphorylierung oder der Dephosphorylierung von den Enzymen aktivieren oder inhibieren. Um nachzuweisen, dass die Induktion der NEP-Aktivität mit einer Erhöhung von intrazellulärem zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) verbunden war, wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration nach der Inkubation von SK-N-SH-Zellen mit den ausgewählten Substanzen bestimmt (siehe Abschnitt 2.8). Die cAMP-Konzentration wurde in pmol/ml nach der Kalibrierkurve von Abbildung 23 berechnet und wiederum in pmol/min/ μ g DNA (1.0 μ g DNA entspricht ca. 100000 Zellen) kalkuliert.

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Experimente dargestellt, die den Effekt von Grüntee-Extrakt, Apigenin, Luteolin, Curcumin und Rolipram auf die intrazelluläre cAMP Konzentration untersuchten. Diese Substanzen wurden zu 2.0 ml Medium (10 % FBS) in 6-Well Platten gegeben, in welche SK-N-SH-Zellen ausgesät worden waren. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5 % CO₂ und 95 % Luft enthielt, für 72 Stunden kultiviert. Grüntee-Extrakt wurde in der Konzentration von 50.0 μ g/ml getestet, während Curcumin in der Konzentration von 5.0 μ M untersucht wurde. In der Konzentration von 10.0 μ M wurden Apigenin, Luteolin und Rolipram untersucht. Rolipram als positive Kontrolle konnte die intrazelluläre cAMP-Konzentration um 154 % erhöhen. Durch Grüntee-Extrakt konnte die intrazelluläre cAMP-Konzentration um 100 % erhöht werden. Apigenin und Luteolin hatten den stärksten signifikanten Einfluss auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Apigenin erhöhte die intrazelluläre cAMP-Konzentration um 539 %, Luteolin um 556 %. Curcumin erhöhte die intrazelluläre cAMP-Konzentration um 130 % (Tab. 22 und Abb. 24).

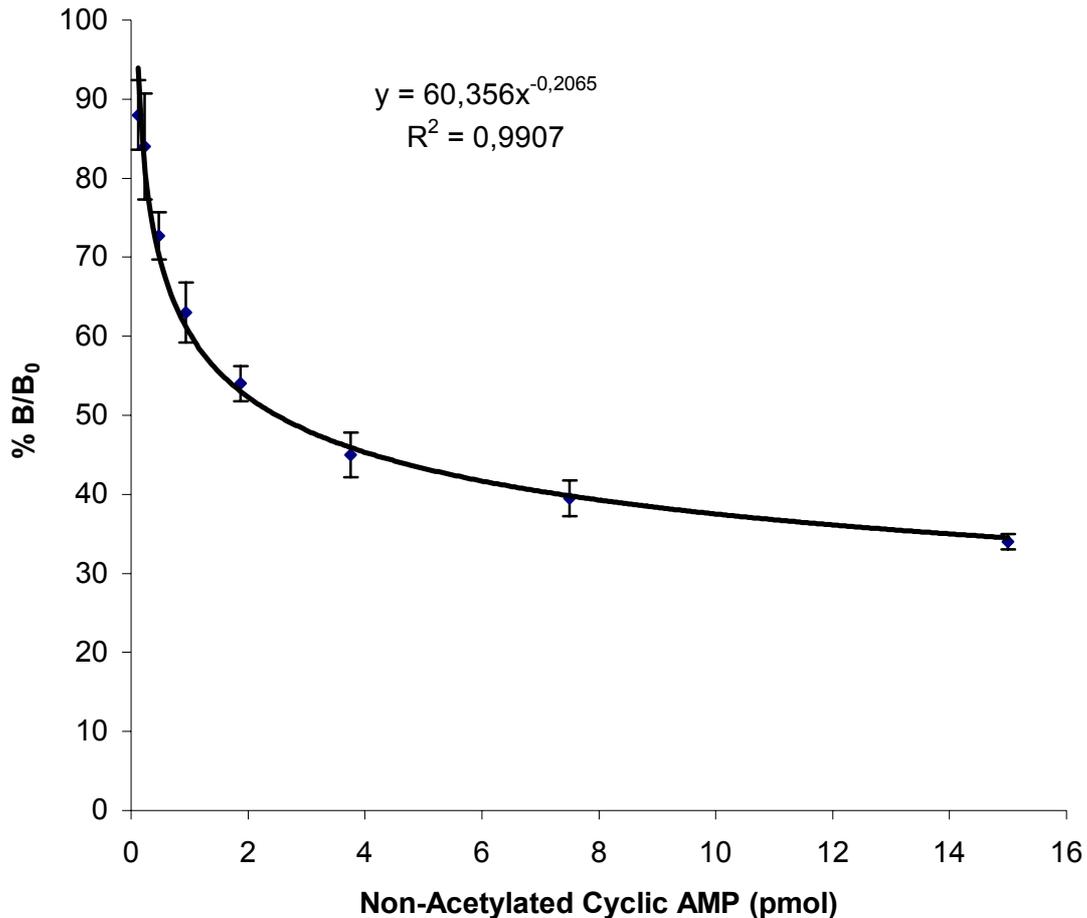


Abbildung 23: Kalibrierkurve für intrazelluläres cAMP-Assay. Jeweils 50 µl jeder cAMP-Verdünnung wurde mit 50 µl cAMP AChE Tracer, 50 µl cAMP-Antiserum und 200 µl Ellman's Reagent bei einer Wellenlänge von 405 nm bis 450 nm gemessen.

Tabelle 22: Einfluss von Grüntee-Extrakt, Apigenin, Luteolin, Curcumin und Rolipram auf die Konzentration des intrazellulären cAMP

Substanzen	cAMP in pmol/ml	cAMP in pmol/µg DNA	cAMP in pmol/µg DNA in %
Kontrolle	264 ± 13.2	1.22 ± 0.056	100 ± 5
Rolipram (10.0 µM)	1040 ± 52*	3.1 ± 0.14*	254 ± 5*
Apigenin (10.0 µM)	660 ± 39.6*	7.8 ± 0.21*	639 ± 6*
Luteolin (10.0 µM)	620 ± 37.2*	8.0 ± 0.18*	656 ± 6*
Curcumin (10.0 µM)	200 ± 8.0*	2.8 ± 0.044*	230 ± 4*
Grüntee-Extrakt (50.0 µg/ml)	440 ± 22.0*	2.45 ± 0.08*	200 ± 5*

Methode: Bestimmung von cAMP mit EIA-Kit (Abschnitt 2.8); Inkubationszeit: 72 Stunden; Zelllinie: SK-N-SH; Kalibriergerade: Abb. 23; 1.0 µg DNA entspricht 100000 Zellen (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert ± SD, n = 8; p < 0.05; * signifikant stärkere Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle).

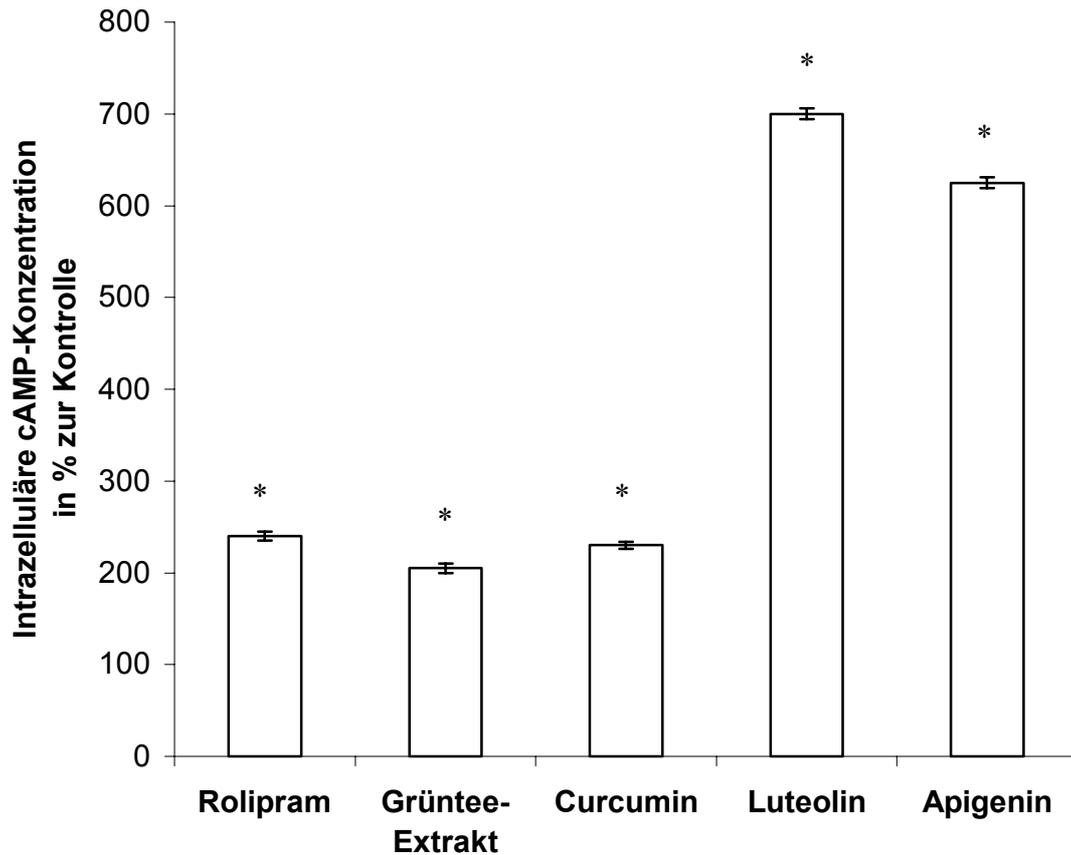


Abbildung 24: Untersuchung des Einflusses von Rolipram (10.0 μ M), Grüntee-Extrakt (50.0 μ g/ml), Curcumin (5.0 μ M), Apigenin (10.0 μ M) und Luteolin (10.0 μ M) auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration

Methode: Bestimmung von cAMP mit EIA-Kit (Abschnitt 2.8); Inkubationszeit: 72 Stunden; Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n = 8; p < 0.05; * signifikant stärkere Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle 100 \pm 5).

4 DISKUSSION

Seit etwa 15 Jahren wird mit großem Interesse an der AD geforscht, dennoch blieb die Ursache der Krankheit bisher unbekannt. Eine Diagnose der Krankheit ist bis heute nur durch Gespräche mit den Patienten und deren Angehörigen möglich. Obwohl die ersten Medikamente jetzt auf den Markt kommen, ist eine Heilung der Krankheit noch nicht in Sicht. Ein Grund, warum trotz intensiver Forschung der medizinische Fortschritt relativ klein ist, liegt unter anderem im Fehlen eines Modells für diese Krankheit. So ist es bisher noch nicht gelungen, die Krankheit auf ein Versuchstier zu übertragen. Sehr viele Experimente werden daher *in vitro* unter Bedingungen durchgeführt, die nicht den sehr komplexen *in vivo*- Bedingungen im Gehirn entsprechen. Da die bisherigen Medikamente, wie Donzepil, Galantamin, Tarcin und Memantine die Krankheit lediglich verzögern oder bestenfalls stoppen, nicht jedoch den Abbau der Gehirnzellen rückgängig machen können, ist eine frühzeitige Diagnose der Krankheit von grundlegender Bedeutung. Ein Molekül, das nach allgemeiner Auffassung mit der Krankheit in Verbindung steht, ist das A β 1-42. Es tritt verstärkt im Gehirn der Patienten in Form unlöslicher Plaques auf und kann auch in anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Derzeit wird intensiv nach Stoffen, die diese Plaques auflösen vermögen bzw. deren Bildung verhindern können, gesucht; bisher jedoch ohne größeren Erfolg. Als ein therapeutischer Ansatz gilt die Stimulation von Proteasen, die A β abbauen, um die Ablagerungen von A β zu verhindern und die AD zu behandeln (Leissring et al. 2003). In der Literatur wurde beispielsweise über den Einfluss der Protease NEP auf die A β -Konzentration im Gehirn von Knock-out-Mäusen berichtet: NEP kann A β *in vivo* abbauen (Iwata et al. 2001; Selkoe 2001b; Marr et al. 2003; 2004). Auch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) kann durch den Abbau von A β 1-40 an Asp7-Ser8 die Aggregation, die Ablagerung und die Zytotoxizität von A β *in vitro* hemmen (Hu et al. 2001).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Einflüsse von ausgewählten Arzneipflanzenextrakten (Ginkgo-Biloba- und Grüntee-Extrakt) und phenolischen Naturstoffen (Flavonoide, Proanthocyanidine) auf die Aktivität der NEP in SK-N-SH-Zellen *in vitro* hinsichtlich einer Induktion des Abbaus von A β -Peptid. Zusätzlich wurden die Effekte von ausgewählten Substanzen auf die ACE-Aktivität untersucht, um die Spezifität dieser Substanzen bezüglich der NEP-Aktivität nachzuprüfen. Außerdem

sollte die Arbeit Ansätze zum möglichen Wirkungsmechanismus der vermuteten neuroprotektiven Wirkung der ausgewählten Drogen und Naturstoffe bei neurodegenerativen Erkrankungen aufzeigen. Die Bestimmungsmethoden für die Enzymaktivität und die Zellproliferation wurden auf SK-N-SH-Zellen (humane Tumorzellen aus Neuroblastomgewebe) übertragen, auf deren Oberflächen NEP und ACE lokalisiert sind. Durch die Arbeit an Zellen war es möglich, Langzeiteffekte der Naturstoffe zu untersuchen. Ermittelt und verglichen wurden die Veränderungen der Enzymaktivitäten an den Zelloberflächen, sowie die Proliferationsentwicklung nach 96-stündiger Inkubation unter Zusatz der untersuchten Substanzen.

Ein Vorteil der Zellsysteme bestand darin, dass Effekte konzentrationsabhängig betrachtet werden können, unter der genauen Kenntnis der Toxizität für das entsprechende Modell. Ein Nachteil für die Arbeit mit Zellkulturen ist, dass die Wahl der Zelllinie die Ergebnisse entscheidend beeinflussen kann und somit Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen noch schwerer vergleichbar werden, als z. B. durch unterschiedliche Wahl von Substraten in Enzymassays.

4.1 Beeinflussung der NEP-Aktivität und der Zellproliferation durch Grüntee-Extrakt und seine Inhaltsstoffe

Die Kultivierung der Zellen mit Grüntee-Extrakt, Coffein, Theophyllin, Theobromin, Theanin, Epicatechin (EC), Epigallocatechin (EGC) und Epigallocatechingallat (EGCG) führte dazu, dass die Zellen vermehrt NEP bildeten. Bei Konzentrationen, die eine Aktivitätssteigerung der Enzyme hervorriefen, war parallel eine Proliferationshemmung zu verzeichnen (**Kap. 3.1**). Aufgrund der gleichzeitigen Aktivitätssteigerung der verbliebenen Zellen konnte abgeleitet werden, dass die Proliferationshemmung nicht auf einer toxischen Wirkung der Stoffe beruhte (Ayoub and Melzig 2006a).

Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Enzyminduktion könnte das Verhältnis zwischen der Zelldifferenzierung und der Zellproliferation sein. Für NEP wurde berichtet, dass in verschiedenen Zellarten die Zunahme der zellulären Enzym-Aktivität mit einer erhöhten Zelldifferenzierung sowie einer Hemmung der Zellproliferation verbunden ist. Gleichzeitig ist die Erhöhung der zellulären Enzym-Aktivität ein Beweis dafür, dass die Hemmung der Zellproliferation nicht auf einer toxischen Wirkung der Stoffe beruht (Uehara et al. 2001). Bei den verwendeten SK-N-SH-Zellen handelte es sich um eine Tumorzelllinie aus Neuroblastomgewebe, somit könnte die Zunahme der

Enzymaktivität als Differenzierungsförderung von Tumorzellen sowie die Proliferationshemmung als Hemmung des Tumorzellwachstums interpretiert werden.

Weiterhin wurde der Effekt der Polyphenole (EC, EGC und EGCG) in Kombination mit Coffein und/oder Theophyllin und/oder Theobromin auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation bestimmt, um einen synergistischen Effekt dieser Substanzen zu klären. Diese Kombinationen führten zu einer zusätzlichen Erhöhung der NEP-Aktivität ohne zusätzliche Hemmung der Zellproliferation bzw. mit einer Erhöhung der Zellproliferation (**Kap. 3.1.3**). Dies zeigte, dass diese Induktion der NEP-Aktivität unabhängig von der Hemmung der Zellproliferation erfolgte.

Eine Erklärung für diese zu beobachtende Enzyminduktion könnte die Erhöhung der Konzentration von cAMP sein, was durch Methylxanthine wie Coffein, Theophyllin und Theobromin verursacht wird. Nach der Spezifikation des Herstellers (HPLC) enthält der Grüntee-Extrakt 47.5-52.5 % Polyphenole (EGCG ca. 61 %), 5-10 % Coffein und 0.3-1.2 % Theobromin. Der Grüntee-Extrakt konnte die NEP-Aktivität erhöhen (Melzig and Janka 2003). In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Methylxanthine zu dem Induktionseffekt der NEP-Aktivität beitragen, sie sind jedoch nicht die hauptsächlich verantwortlichen Inhaltsstoffe für die Enzyminduktion.

Die Besonderheit vom Grünen Tee ist sein Gehalt an niedermolekularen Catechinen und deren Gallussäureestern. Der epidemiologisch nachgewiesene Zusammenhang zwischen der regelmäßigen Aufnahme von Grünem Tee und dem verringertem Auftreten von Krebs und koronarer Herzkrankheit konnte experimentell vor allem durch die pharmakologischen Eigenschaften der Komponente Epigallocatechingallat (EGCG) gestützt werden (Metz 2000; Dufresne and Farnworth 2001; Riemersma et al. 2001). Die wichtigsten Catechine im Tee sind EGCG, EGC, ECG und EC.

Coffein und andere Methylxanthine wie Theophyllin und Theobromin in hoher Konzentration ($>500 \mu\text{M}$) sind in der Lage, die Differenzierung von Neuroblastomzellen über eine Erhöhung der cAMP-Histone H1 Phosphorylierung, welche durch die Hemmung der Phosphodiesterase-Aktivität verursacht wird, zu erreichen (Ajiro et al. 1990). Dagegen erhöht sich in klinisch relevanten Konzentrationen von Coffein (10 bis $50 \mu\text{M}$) die cAMP-Konzentration in Gegenwart von Adenosin (Belibi et al. 2002). Die Gabe von Coffein in einer Dosis von 5 mg pro kg Körpergewicht resultiert in einer Plasmakonzentration von $\sim 45 \mu\text{mol/l}$ (Graham and Spriet 1995) und in bedeutend höheren Konzentrationen von cAMP (Thong et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte Coffein bei einer Konzentration von 100 μM die NEP-Aktivität um 45 % erhöhen. Es wurde berichtet, dass eine Konzentration von weniger als 100 μM Methylxanthin, die pharmakologischen Wirkungen von Adenosin in Nervengewebe hemmen kann (Daly et al. 1981). Coffein kann die Neurotoxizität, welche von A β verursacht wurde, sowohl in vitro als auch in vivo über die Blockade von Adenosin A_{2A} Rezeptoren hemmen (Dall'Igna et al. 2003).

Zusätzlich zu seinen neuroprotektiven Wirkungen können für Coffein gedächtnisverbessernde Wirkungen insbesondere bei älteren Menschen nachgewiesen werden (Brice and Smith 2002). Coffein hat ein Verteilungsvolumen ähnlich dem des Körperwassers, passiert schnell die Blut-Hirn-Schranke und dringt ins Gehirn ein (Axelrod and Reisenthal 1953). Letale Intoxikationen werden mit Blutkonzentrationen von höher als 500 μM beobachtet (Rall 1980). In der vorliegenden Arbeit wurde der Induktionseffekt der NEP-Aktivität durch 500 μM Coffein von einer Proliferationshemmung von über 60 %, welche als Zelltoxizität bezeichnet wurde, begleitet. Nach Administration einzelner oraler Dosen vom Grüntee-Extrakt (20 mg Teeextrakt/Kg, Gegenwert zu \sim 2 Tassen Tee) sind die maximalen Plasmakonzentrationen von EGCG, EGC und EC in drei wiederholten Versuchen 77.9 ± 22.2 , 223.4 ± 35.2 und 124.03 ± 7.86 ng/ml bzw. $0.17 \mu\text{M}$, $0.73 \mu\text{M}$, und $0.43 \mu\text{M}$. Die maximalen Konzentrationen werden nach 1.3-1.6 h erreicht (Lee et al. 2002). Diese Angaben konnten als Referenz für die Planung der in-vitro-Versuche zur Aufklärung der Wirkungsmechanismen der Catechine dienen. Da die Bedingungen in vitro weniger empfindlich und intensiv als in vivo sind, wurden EC, EGC und EGCG im Zellkultursystem im Konzentrationsbereich von 1.0 μM und 10.0 μM untersucht. Bei der Untersuchung von diesen Polyphenolen wurde ein Induktionseffekt der NEP-Aktivität ohne Proliferationshemmung gezeigt. Lee et al. wiesen weiterhin nach, dass EGCG im Plasma größtenteils frei vorliegt, während EGC und EC zumeist in der gebundenen Form auftreten (Lee et al. 2002). Das Niveau von EGC im Plasma liegt bei 0.2-2.0 % der aufgenommenen Menge (Nakagawa et al. 1997).

Zusammenfassend trifft für Grüntee-Extrakt und seine Inhaltsstoffe die Aussage zu, dass der Induktionseffekt der NEP-Aktivität durch Grüntee-Extrakt und seine Inhaltsstoffe nicht nur von der Proliferationshemmung abhängig war. Diese Substanzen könnten eventuell die Gen-Expression des NEP-Enzyms über die Erhöhung des Niveaus von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) beeinflussen.

Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram erhöhen die Konzentration des cAMP. Deshalb werden ihre beobachteten Induktionseffekte auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation in einem eigenen Abschnitt (**Kap. 4.6**) bewertet.

4.2 Beeinflussung der NEP-Aktivität und der Zellproliferation durch Ginkgo-biloba-Extrakt und seine Inhaltsstoffe

Ginkgo-biloba-Extrakt (EGb 761[®]) wird aus den Blättern von *Ginkgo biloba* L. gewonnen. Es enthält Substanzen, die positive Wirkungen auf die Zellen des Gehirns haben. EGb 761[®] enthält zwei Anteile: einen Flavon-Anteil mit Quercetin, Kampferol und Isorhamnetin und den Anteil ohne Flavon mit Bilobalid und den Ginkgoliden A, B, C und J (DeFeudis 1998). Für die Wirksamkeit des Extrakts sind nach heutigen Erkenntnissen die Diterpenlactone und Flavonolglykoside verantwortlich.

Zahlreiche Studien zeigten, dass Ginkgo-biloba-Extrakt (EGb 761[®]) die Neuronen schützen kann. Es wurde belegt, dass die Aufnahme von EGb 761[®] oder Bilobalid vor Ischämie schützt, welches zum Neuronentod führt (Chandrasekaran et al. 2001). *Ginkgo biloba* hat weiterhin einen Effekt als Antioxidans (McKenna et al. 2001). Ginkgo-biloba-Extrakt (EGb 761[®]) kann die kognitive Funktion bei Patienten mit Demenz (z. B. die AD) verbessern und die Produktion von A β hemmen (Le Bars et al. 1997; Yao et al. 2004).

Während der letzten 25 Jahre bestätigten zahlreiche Studien die positive Wirkung des Ginkgospezialextrakts EGb 761[®] auf die mentale Kompetenz und die emotionale Befindlichkeit von Patienten mit kognitiven Störungen vaskulärer Ursache und der AD. Eine Studie zeigte einen deutlich positiven Effekt des Ginkgo-biloba-Extrakts EGb 761[®] auf die subjektive emotionale Befindlichkeit gesunder älterer Menschen (Gieza et al. 2003). Das Ginkgo-Extrakt (EGb 761[®]) und Ginkgolid B können Neuronen vor der Toxizität von Glutamat durch Reduktion des Anstiegs von Calcium (Ca²⁺) schützen (Zhu et al. 1997). Eine weitere Studie belegte, dass Ginkgo-biloba-Extrakt (EGb 761[®]) bei Alzheimer-Patienten wirkt. Der Anteil von EGb 761[®] ohne Flavone besitzt Neuronenschutz und Antiapoptose-Effekte, speziell das Bilobalid (Ahlemeyer et al. 2003). EGb 761[®] schützte die Neuronen vor oxidativem Stress, der durch Hydroperoxide (Oyama et al. 1996), Apolipoprotein E (Schindowski et al. 2001) und A β -Peptid (Zhou et al. 2000) induziert wird. In einer Studie wurde nachgewiesen, dass EGb 761[®] in den PC12-Zellen die Verarbeitung des APP und die Cholesterolverursachte Überproduktion von APP reduzieren und damit die Produktion

von A β verhindern kann. Es kann in den NT2-Zellen den Influx des freien Cholesterols hemmen und seinen Efflux erhöhen (Yao et al. 2004).

Amentoflavon wurde als Neuroprotektivum gegen Zytotoxizität, die durch oxidative Belastungen und A β -Peptide verursacht wird, entdeckt. Deshalb wird Amentoflavon für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen (wie AD und Ischämie) vorgeschlagen (Kang et al. 2005). In einer neuen Studie wurde nachgewiesen, dass EGb 761[®] die Entstehung der Alpha-APPs (nicht schädlicher Metabolit) von Amyloid Precursor Protein (APP) erhöht (Colciaghi et al. 2004).

Im Rahmen von Langzeitversuchen wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt des Ginkgo-biloba-Extrakts und seiner Inhaltsstoffe (Bilobalid, Ginkgolid A, B und Amentoflavon) auf die NEP-Aktivität untersucht (**Kap. 3.2**). Der Ginkgo-biloba-Extrakt wurde in drei unterschiedlichen Lösungsmitteln (Wasser, Ethanol 50 %, DMSO 50 %) aufgenommen.

Die Untersuchungen bezüglich der Induktionsaktivität gegenüber NEP zeigten, dass die ethanolische Lösung die NEP-Aktivität am stärksten beeinflussen konnte. Im Vergleich zu den ethanolischen und wässrigen Lösungen war die DMSO-Lösung schwächer aktiv.

Die Enzyminduktion war mit einer Proliferationshemmung der Zellen verbunden, welche sich als Zelldifferenzierung erklären lässt (**Kap. 3.2.1**). Diese Ergebnisse konnten vor allem durch die Löslichkeit und Stabilität der Inhaltsstoffe des Ginkgo-biloba-Extrakts begründet werden. Da der Flavon-Anteil des Ginkgo-biloba-Extrakts in Alkohol besser löslich ist, induzierte der ethanolische Extrakt stärker die NEP-Aktivität. Von dem Anteil ohne Flavon wurde Bilobalid und die Ginkgolide A und B auf die NEP-Aktivität untersucht, um herauszufinden, ob sie auch für den Effekt des gesamten Extrakts verantwortlich waren.

Im Rahmen der Langzeitversuche der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass Bilobalid, Ginkgolid A und B die NEP-Aktivität nicht beeinflussen. Die Kombination von Bilobalid, Ginkgolid A und B führte in den Konzentrationen von 10 μ M und 20 μ M zur Aktivitätshemmung und Proliferationshemmung, welche als zumindest teilweise Zelltoxizität interpretiert werden kann (**Kap. 3.2.2 und Kap. 3.2.3**). Durch Amentoflavon konnte keine signifikante Steigerung der NEP-Aktivität registriert werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass diese Substanzen nicht für die Induktionsaktivität des Extrakts verantwortlich waren. Es wird vermutet, dass der

Flavon-Anteil und andere Inhaltsstoffe für die Induktionsaktivität des Extrakts verantwortlich waren.

4.3 Beeinflussung der NEP-Aktivität und der Zellproliferation durch Flavonoide

Von den weiteren Substanzen, die im Rahmen dieser Arbeit eine Induktionswirkung auf die NEP-Aktivität aufwiesen, hoben sich Apigenin und Luteolin als Einzelstoffe durch ihre starke Langzeitwirkung gegenüber NEP ab (**Kap. 3.3**). Die Feststellung dieses biochemischen Effektes ließ sich für die Erklärung der zwei Theorien, welche die Wirkungsweise von Grüntee-Extrakt und seinen Inhaltsstoffen beschreiben, nutzen. Die erste Theorie ist mit einer Differenzierungsförderung und einer Teilhemmung verbunden, während die zweite Theorie mit einer Erhöhung der cAMP-Konzentration korreliert. Die Erhöhung der cAMP-Konzentration durch die Hemmung des Phosphodiesterase-Enzyms (PDE), die durch den Effekt von Apigenin und Luteolin hervorgerufen wurde, könnte für die Enzyminduktion und die Teilungshemmung verantwortlich sein bzw. zu einem direkten Induktionseffekt auf die NEP-Gen-Expression führen.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die Untersuchungen von Apigenin und Luteolin in Kombination mit Arabinosylcytosin, als Hemmer der DNA-Synthese, dass die Enzyminduktion durch Apigenin und Luteolin nicht nur mit einer Proliferationshemmung und einer erhöhten Zelldifferenzierung einherging, sondern auch mit einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration verbunden war (Ayoub and Melzig 2006b).

Flavonoide sind eine in den meisten Pflanzen vorkommende Gruppe von Polyphenolen. Flavonoide zeigten in sehr vielen pharmakologischen Testsystemen Aktivität. Sie haben entzündungshemmende (Ferrandiz and Alcaraz 1991), antimutagene (Edenhardder et al. 1993), tumorsuppressive (Menon et al. 1995) und antioxidative (Chen et al. 1990) Eigenschaften. Eine reichliche Aufnahme von Flavonoiden trägt zum Schutz vor chronischen Krankheiten bei (Knekt et al. 2002). Flavonoide können auch verschiedene Enzyme wie die Xanthinoxidase (Hayashi et al. 1988), die Proteinkinase C (Ferriola et al. 1989) und das Phosphodiesterase-Enzym (PDE) (Kuppusamy and Das 1992) hemmen. Apigenin hemmt PDE1-3 mit einer IC_{50} von 10-25 μ M, während Luteolin PDE1-5 mit einer IC_{50} von 10-20 μ M hemmt (Ko et al. 2004). Deswegen wurden Apigenin und Luteolin in der vorliegenden Arbeit bei diesen Konzentrationen

untersucht. Bei diesen Konzentrationen konnten Apigenin und Luteolin die NEP-Aktivität signifikant erhöhen. Die chronische Behandlung mit Flavonoiden hebt die kognitiven Defizite bei alten und LPS-behandelten Mäusen auf (Patil et al. 2003). Apigenin hat eine neuroprotektive Wirkung durch die Abnahme des A β -verursachten Zelltods (Wang et al. 2001). Apigenin kann die Apoptose der BV-2-Zellen und den Zellzyklusarrest in aktivierter Microglia, welche zu Neurotoxizität beitragen, induzieren (Elsisi et al. 2005).

Flavonoide können den Lipopolysaccharid (LPS)-angeregten Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) und die Freisetzung von Interleukin 6 hemmen. Interleukin 6 und Tumornekrosefaktor-alpha regulieren die Entzündungsbotenstoffe, die in vielen progressiv neurodegenerativen Prozessen, einschließlich AD, viraler und bakterieller Meningitis nachgewiesen wurden (Patil et al. 2003). Flavonoide werden in Pflanzen entweder in Form von Aglykonen oder in Form von Glykosiden gefunden. Die Aglykone können im Dünndarm durch passive Diffusion absorbiert werden, während die Glykoside normalerweise zu den entsprechenden Aglykonmolekülen vor der weiteren gastro-intestinalen Absorption hydrolysiert werden (Manach et al. 1996). Die Bioverfügbarkeit der Flavonoide (sowohl Aglykone, als auch Glykoside) ist jedoch nicht so hoch wie aufgrund der Lipophilie zu erwarten wäre. Wahrscheinlich hat diese Diskrepanz seinen Grund hauptsächlich im umfangreichen First-Pass-Effekt im Dünndarm (Pietta et al. 1997). Daten über die genaue Konzentration von den Flavonoiden im Gehirn gibt es nicht.

4.4 Beeinflussung der NEP-Aktivität und der Zellproliferation durch weitere Substanzen

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente bewertet, die den Effekt von Vinpocetin, Curcumin, Nikotin, Deoxyepanin und Triiodotyronin (T3) auf die NEP-Aktivität untersuchten. Die Bestimmungen bezüglich der Induktionsaktivität gegenüber NEP zeigten, dass die Enzym-Aktivität durch Vinpocetin, Curcumin und Deoxyepanin erhöht wurde.

Triiodotyronin und Nikotin hatten keinen signifikanten Einfluss auf die NEP-Aktivität. Die Induktionsaktivität durch Vinpocetin, Curcumin und Deoxyepanin war von einer Proliferationshemmung begleitet (**Kap. 3.4**). Diese könnte so erklärt werden, dass die Induktionsaktivität mit einer Erhöhung der Zelldifferenzierung verbunden ist.

Die Untersuchungen von Vinpocetin und Curcumin als Einzelsubstanzen in Kombination mit Arabinosylcytosin als DNA-Synthese-Hemmer zeigten, dass die Erhöhung der Enzym-Aktivität nicht nur von der Zelldifferenzierung abhängt, sondern auch mit einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration verbunden ist.

Vinpocetin ist ein synthetischer Ethylester von Apovincamin, einem Vinca-Alkaloid, das aus den Blättern von *Vinca minor* L. erhalten wird. Vinpocetin wurde 1960 entdeckt (Lorinz et al. 1976). In Europa ist Vinpocetin unter dem Handelsnamen Cavinton® für die Behandlung zerebrovaskulärer Erkrankungen auf dem Markt (Bereczki and Fekete 1999). Vinpocetin kann den Gehirnblooddurchfluss und die zerebral-metabolische Rate erhöhen sowie Schäden von freien Radikalen durch die Verbesserung der Sauerstoffversorgung vermindern (Miyamoto et al. 1989; Stolz 1999). Vinpocetin ist ein spezifischer Hemmer der Phosphodiesterase Typ1 (PDE 1) Isoform (Beavo 1995). Diese Wirkung führt theoretisch zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration und der cGMP-Konzentration und kann für die positiven Effekte von Vinpocetin in der zerebralen Blutzirkulation und die Hemmung der Thrombozytenaggregation verantwortlich sein (Chiu et al. 1988). Vinpocetin kann die PDE1 von Meerschweinchen Taeniocoli-Präparation mit einer IC₅₀ von 30 µM hemmen und zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration führen (Kaneda et al. 2004).

Weiterhin kann Vinpocetin die Neurone vor toxischen Einflüssen von Glutamat und N-Methyl-d-aspartat schützen und wirkt als Antioxidationsmittel (Miyamoto et al. 1989). Zur Erklärung der neuroprotektiven Eigenschaften von Vinpocetin im ZNS werden zwei Mechanismen vorgeschlagen: eine direkte Hemmung der Ca²⁺-Kanäle und eine Hemmung der PDE (Sitges and Nekrassov 1999). Vinpocetin erreicht den Blutkreislauf ungefähr eine Stunde nach Einnahme, unabhängig davon, ob es mit der Nahrung oder auf nüchternem Magen aufgenommen wird (Lohmann et al. 1992). Es hat eine Absorptionsrate von 6.7 % ohne Nahrung und von 60-100 % mit Nahrung (Miskolczi et al. 1990). Nach intravenöser Infusion überwindet Vinpocetin bei Patienten mit zerebrovaskulären Störungen die Blut-Hirn-Schranke und wird in zerebrales Gewebe aufgenommen (Polgar et al. 1985; Gulyas et al. 1999). Eine weitere tierische Studie zeigte, dass Vinpocetin im ZNS in doppelt so hoher Konzentration wie im Gesamtkörper vorliegt. Die höchste Aufnahmefähigkeit wird für den Thalamus, das Putamen und die Neokortikalgewebe nachgewiesen (Gulyas et al. 2002). Aufgrund der beschriebenen Effekte wurde der Einfluss von Vinpocetin in der vorliegenden Arbeit auf die NEP-Aktivität untersucht (**Kap. 3.4**). Die NEP-Aktivität konnte durch

Vinpocetin in der Konzentration von 50 μ M um 62 % induziert werden. Nach diesem Ergebnis könnte der Induktionseffekt von Vinpocetin auf die NEP-Aktivität nützlich beim Abbau von A β sein.

Deoxypeganin wirkt als Cholin-Esterase-Hemmer und wird für die Behandlung der Schizophrenie und weiteren Nervenerkrankungen eingesetzt (Vovin et al. 1991; Tarasiuk et al. 1989). Aus diesen Gründen wurde Deoxypeganin in der vorliegenden Arbeit als Einzelsubstanz ausgewählt, um seinen Effekt auf die NEP-Aktivität zu untersuchen. Deoxypeganin konnte die Enzymaktivität von SK-N-SH-Zellen erhöhen mit einer gleichzeitigen Teilhemmung der Zellproliferation (**Kap. 3.4**).

Der Effekt von Nikotin auf die NEP-Aktivität wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Viele Studien wurden durchgeführt, um den schädlichen oder protektiven Effekt von Nikotin auf AD nachzuweisen. In einer Studie wurde gezeigt, dass Nikotin das Defizit der Langzeitpotenzierung, welches von A β 1-40 und A β 1-42 produziert wird, verstärkt (Freir and Herron 2003). Andere Studien zeigten, dass Nikotin einen neuroprotektiven Effekt hat. Es kann die Fibroblast-Wachstumsfaktor-Expression (FGF-2) im Gehirn der Ratten induzieren. Das führt dazu, dass FGF-2 RNA und Proteine im Gehirn zunehmen (Belluardo et al. 2004). Weitere Studien zeigten, dass Nikotin einen antioxidativen Effekt hat (Linert et al. 1999). In einer Studie erhielten 18 Patienten mit einer wahrscheinlichen AD jeweils vier Wochen lang im Cross-over-Tausch (nach einer zweiwöchigen Auswaschphase) Placebo oder ein Nikotinpflaster. Das Pflaster setzte 21 mg Nikotin pro Tag frei. Unter der Gabe von Nikotin und auch unter der Gabe von Placebo verbesserte sich das Kurzzeitgedächtnis signifikant (Snaedal et al. 1996). Aus diesen Gründen wurde der Effekt von Nikotin auf die NEP-Aktivität in der Arbeit untersucht. Es konnte kein signifikanter Effekt auf die NEP-Aktivität durch Nikotin gezeigt werden (**Kap. 3.4**).

Die Dysfunktion des Schilddrüsenhormons (TH) ist mit der Pathogenese der AD verbunden (Heyman et al. 1983; Mortimer 1989). Andere Studien zeigten, dass TH die Gen-Expression des Amyloid-Vorläuferproteins (APP-Amyloid Precursor Protein) regulieren kann (Belandia et al. 1998; Latasa et al. 1998). Viele epidemiologische Studien unterstützen die Vermutung über einen Zusammenhang zwischen Unter- oder Überfunktion der Schilddrüse und dem Risiko der Entstehung der AD bei älteren Menschen (Yoshimasu et al. 1991; Ganguli et al. 1996; Kalmijn et al. 2000). Eine

aktuelle Studie ergab, dass es einen abnormalen Metabolismus des Schilddrüsenhormons bei den Alzheimer-Patienten gibt (Sampaolo et al. 2005).

Aus diesen Gründen wurde in der Arbeit der Effekt von Triiodotyronin auf die NEP-Aktivität untersucht. Es konnte kein signifikanter Effekt auf die NEP-Aktivität durch Triiodotyronin registriert werden (**Kap. 3.4**).

Curcumin wurde in der vorliegenden Arbeit als Differenzierungagens für die NEP eingesetzt (**Kap. 3.4**). Die Untersuchung des Effektes von Curcumin auf die NEP-Aktivität, nach der Blockade der DNA-Synthese, zeigte, dass es keinen signifikanten Effekt auf die Enzymaktivität gab (**Kap. 3.5.2**). Dieses Ergebnis wurde damit erklärt, dass der Induktionseffekt durch Curcumin mit einer Teilhemmung der SK-N-SH-Zellen begleitet wurde. Der gelbe Curryfarbstoff Curcumin ist ein Hauptbestandteil von *Curcuma longa* L. Curcumawurzelstock ist als ein Currygewürz und als Bestandteil der Kräuterméizin in Indien bekannt. Seit Jahrtausenden wird Curcumin in der traditionellen indischen Méizin für die Behandlung einer Anzahl von Erkrankungen, z. B. Krebs genutzt (Ammon and Wahl 1991; Aggarwal et al. 2003; Bharti et al. 2003). Epidemiologische Studien in Indien, wo Curcumin regelmäßig benutzt wird, zeigten, dass das Vorkommen der AD bei Personen zwischen dem 70. und 79. Lebensjahre 4.4-mal seltener als in den USA ist (Ganguli et al. 2000). In einer Tierversuchsstudie und in in-vitro-Modellen wurde gezeigt, dass die Gabe einer geringen Dosis von Curcumin (0.1-1.0 μM) zur Reduktion der vorhandenen β -Amyloid-Plaques (43-50 %) im Gehirn von Mäusen und Sprage-Dawley Ratten, die ein altersgebundenes Gedächtnisdefizit aufzeigen, führt (Lim et al. 2001; Frautschy et al. 2001; Yang et al. 2004; Ono et al. 2004). Curcumin kann die Blut-Hirn-Schranke passieren und ebenso neuronale Zellen gegen β -Amyloidschädigung schützen (Park and Kim 2002). Curcumin bindet redox-aktive Metalle wie Eisen und Kupfer stärker als redox-inaktives Zink. Aufgrund dessen besitzt Curcumin eine schützende Wirkung gegenüber der Toxizität von A β und könnte entzündliche Schädigungen durch Verhinderung der Induktion des Nekrose Faktors-kappa B (NF-kappa B), der durch Metalle (Kupfer, Eisen und Zink) induziert wird, supprimieren (Baum and Ng 2004). In weiteren Studien wurde gezeigt, dass durch Curcumin die Phorbolster (4 β -Phorbol 12-myristat 13-acetat; PMA) aktivierte Reaktion von Early growth response-1 (Egr-1) und von Nekrose Faktor-Kappa-B (NF-kappa-B) in endothelialen Zellen gehemmt werden kann (Pendurthi et al. 1997; Pendurthi and Rao 2000). Curcumin kann sowohl PC12-Zellen von Ratten, als auch

HUVECs (humane Nabelschnur-Endothelzellen) vor dem A β 1-42-Insult schützen (Kim et al. 2001).

Im Tiermodell wurde nachgewiesen, dass die Administration von Curcumin an amyloid-transgenen Mäusen, die altersbezogene Plaques (Hsiao et al. 1996) und altersbezogene Gedächtnisdefizite (Chapman et al. 1999) aufwies, zur Reduktion der Plaques führte (Lim et al. 2001). In einer neuen Studie wurde gezeigt, dass Curcumin ein durch eine A β -Infusion verursachtes Gedächtnisdefizit und A β -Ablagerungen in Ratten verhindert (Frautschy et al. 2001). Eine weitere Studie zeigte, dass Curcumin die entzündliche Reaktion des A β in den Monocyten blockieren kann (Giri et al. 2004).

Wegen all dieser Auswirkungen von Curcumin wurde in dieser Arbeit sein Effekt auf die NEP-Aktivität untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Curcumin in einer Konzentration von 5 μ M die NEP-Aktivität um 190 % erhöhte und damit den Abbau von A β durch NEP stimuliert (**Kap. 3.4**). Eventuell wird Curcumin als mögliche Kandidat für Prophylaxe und/oder Behandlung der AD angesehen.

4.5 Beeinflussung der NEP-Aktivität durch Arabinosylcytosin und andere ausgewählte Substanzen in Kombination mit Arabinosylcytosin

Zur Aufklärung der möglichen Wirkungsmechanismen der untersuchten Substanzen, die an der Induktion der Enzym-Aktivität beteiligt sind, wurde der Effekt von ausgewählten Substanzen auf die NEP-Aktivität nach Blockade der DNA-Synthese mit Arabinosylcytosin (Kufe and Major 1982) untersucht (**Kap. 3.5.1 und Kap. 3.5.2**).

Arabinosylcytosin (1- β -D-Arabinofuranosylcytosin, ARC) ist ein Pyrimidin-Antimetabolit, der für die Behandlung der akuten Leukämie genutzt wird. Der Wirkungsmechanismus von diesem strukturellen Analogon von 2'-Deoxycytidin ist noch nicht völlig aufgeklärt (Kufe and Major, 1982). Es kann wie natürliche Nucleoside in das Innere der Zelle durch erleichterte Diffusion über einen Membrantransporter eintreten (Plagemann et al. 1978; Wiley et al. 1982; Yunge and Jarvis 1983). Arabinosylcytosin wird durch Kinasen in 1- β -D-Arabinofuranosylcytosin-triphosphat phosphoryliert. Arabinosylcytosin kann an die DNA binden und die DNA-Synthese inhibieren (Kufe and Major 1982). Es hemmt das β -DNA-Polymerase-Enzym, welches in der DNA-Reparatur von Bedeutung ist (Fram and Kufe 1985). In nicht-toxischen Konzentrationen kann Arabinosylcytosin die Gen-Expression von c-fos und c-myc

modifizieren (Mitchell et al. 1986) und eine Differenzierung der menschlichen Myeloblastic-Leukämiezelllinie (ML-1) verursachen (Takeda et al. 1982). Arabinosylcytosin wird für die Differenzierung von SK-N-SH-Zellen benutzt (Melzig and Janka 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte es die NEP-Aktivität induzieren bei gleichzeitiger starker Proliferationshemmung (**Kap. 3.5.1**). Nach der Blockade der DNA-Synthese bestätigte eine Erhöhung der NEP-Aktivität durch die untersuchten Testsubstanzen, dass die Induktion der Enzym-Aktivität unabhängig von der Differenzierungsförderung war. Die Untersuchungen der ausgewählten Substanzen, wie Apigenin, Luteolin, und Polyphenole (EC, EGC, EGCG) mit Coffein in Kombination mit Arabinosylcytosin führten zur signifikanten Erhöhung der NEP-Aktivität (**Kap. 3.5.2**). Die Enzym-Aktivität wurde durch die Kombination dieser Testsubstanzen mit Arabinosylcytosin im Gegensatz zu den Einzelsubstanzen (ohne Arabinosylcytosin) geringer beeinflusst. Diese Ergebnisse zeigten, dass ein anderer Wirkungsmechanismus neben der Differenzierungsförderung der Zellen hinter der Zunahme der Enzym-Aktivität stehen muss. Eine Erklärung für diese beobachtete Enzyminduktion könnte auf der Erhöhung der Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in der Zelle basieren. Deshalb wurde in der Arbeit der Einfluss von ausgewählten Testsubstanzen, die die Konzentration von cAMP erhöhen können, auf die NEP-Aktivität untersucht, um herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen beiden Effekten gibt. Im nächsten Abschnitt wird der Effekt dieser Substanzen diskutiert.

4.6 Beeinflussung der NEP-Aktivität und der Zellproliferation durch Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram

Im nächsten Schritt zur Klärung der Wirkungsmechanismen der untersuchten Substanzen wurde der Effekt von drei Substanzen, die den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, auf die NEP-Aktivität untersucht. Aus diesem Grund wurden die Langzeiteffekte von Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram auf die Enzymaktivität und die Zellproliferation untersucht (**Kap. 3.5.3**). Es sollte geprüft werden, ob die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration zur Induktion der NEP-Aktivität führen kann. Dibutyryl-cAMP wirkt als Proteinkinase A Aktivator (Graf et al. 1995), und Forskolin wirkt als Adenylatcyclase Aktivator (Wan Kim et al. 2004). Rolipram wirkt als ein spezifischer Hemmer der Phosphodiesterase 4 Isoform (PD4). Rolipram kann die Aktivität des cAMP/ cAMP-dependent protein kinase/ cAMP regulatory

element binding Protein (cAMP/ PKA/ CREB)-Signalweges im Hippocampus und sein Langzeitpotential (LTP) wiederherstellen (Vitolo et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass durch die Kultivierung der SK-N-SH-Zellen mit Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram die NEP-Aktivität erhöht wurde. Bei Konzentrationen, die eine Aktivitätssteigerung der NEP hervorriefen, war keine Proliferationshemmung zu verzeichnen. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Substanzen die Gen-Expression der NEP über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels steigerten. Der cAMP-Spiegel ist in vivo wichtig für den Schutz, das Wachstum und die Myelinisierung von geschädigten ZNS-Axons und für die Wiederaufnahme ihrer Funktion (Pearse et al. 2004). Die Erhöhung des cAMP-Spiegels wird als ein therapeutischer Ansatz für die Verzögerung der AD betrachtet. Die AD könnte somit durch Behandlung mit Stoffen, wie Dibutyryl-cAMP, Theophyllin und Isoproterenol, die die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöhen, verzögert werden (Wolozin et al. 1993). Im **Kapitel 4.9** wird der Effekt von cAMP diskutiert.

4.7 Beeinflussung der ACE-Aktivität und der Zellproliferation durch ausgewählte Substanzen

Ausgewählte Substanzen, welche die NEP-Aktivität erhöhten (**Kap. 3.1.2; Kap. 3.1.3; Kap. 3.2.1; Kap. 3.3; Kap. 3.4 und Kap. 3.5.3**), wurden hinsichtlich einer Beeinflussung der ACE-Aktivität untersucht, um herauszufinden, ob diese Substanzen spezifisch nur die NEP-Aktivität beeinflussten. Coffein und Theophyllin konnten die ACE-Aktivität nur bei hohen Konzentrationen (500 μ M und 1000 μ M) im Vergleich zu NEP leicht induzieren (**Kap. 3.6.1**). Die Kombination von EC und EGC mit Coffein und/oder Theophyllin konnte die ACE-Aktivität nicht beeinflussen (**Kap. 3.6.2**). Diese Ergebnisse könnten so erklärt werden, dass Coffein, Theophyllin, EC, EGC und ihre Kombinationen spezifisch die NEP-Aktivität induzierten und das NEP-Gen direkt beeinflussten. Ginkgo-biloba-Extrakt konnte sowohl die ACE-Aktivität als auch die NEP-Aktivität induzieren und die Zellproliferation hemmen (**Kap. 3.6.3**). Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram hatten keinen Einfluss auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation (**Kap. 3.6.4**). Diese Substanzen konnten nur die NEP-Expression induzieren. Apigenin, Luteolin, Vinpocetin und Curcumin konnten sowohl die ACE-Aktivität als auch die NEP-Aktivität signifikant induzieren und die Zellproliferation hemmen (**Kap. 3.6.5 und Kap. 3.6.6**).

Angiotensin Converting Enzyme (ACE; EC 3.4.15.1) ist ein Peptidyl-Dipeptidase-Enzym. Trotz verschiedener EC-Klassifizierung von ACE (EC 3.4.15.1) und NEP (EC 3.4.24.11) besitzen die beiden Enzyme große Ähnlichkeit im Aufbau des aktiven Zentrums (siehe Kap. 1.2). ACE katalysiert vorrangig die Abspaltung von Dipeptiden vom C-terminalen Ende des Substrates. Die pharmakologisch bedeutendste Funktion ist die Bildung des potenten Vasokonstriktors Angiotensin II aus dem Dekapeptid Angiotensin I innerhalb des Blutdruckregulierenden Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Eine Studie zeigte, dass der ACE D-Allel-Genotyp vor Entstehung der AD schützen kann (Kehoe et al. 1999). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass in der japanischen Bevölkerung (im Gegensatz zur britischen) eine hohe Korrelation zwischen dem Vorkommen des ACE-Genotyps und der AD besteht (Hu et al. 1999). ApoE und ACE-Genotyp wurden als Risikofaktoren für AD bei Russen und Nord-Amerikanern gefunden (Farrer et al. 2000). ACE kann die Aggregation, die Ablagerung und die Zytotoxizität von A β durch den Abbau von A β 1-40 an Asp7-Ser8 in vitro hemmen (Hu et al. 2001). Eine Studie über das Renin-Angiotensin-System (RAS) im Gehirn von Säugern konnte den Zusammenhang zwischen ACE und AD erklären. Diese Studie zeigte, dass Angiotensin II und Angiotensin IV in den Astrozyten für die Funktionswartung der Blut-Hirn-Schranke nötig ist, welche bei der AD beeinträchtigt ist (Kakinuma et al. 1998; Skoog et al. 1998). Angiotensin II und Angiotensin IV regen die Neuronal-Aktivität des Hippocampus an und regulieren die Durchblutung im Gehirn (Albrecht et al. 1997; Kramar et al. 1997). Die Aktivierung des ACE-Enzyms wird als ein neuer Ansatz zur Behandlung der AD durch Induktion des Abbaus von A β vorgeschlagen. Die ausgewählten Substanzen, welche die ACE-Aktivität erhöhten, könnten möglicherweise den Abbau von A β induzieren.

Die Stimulation sowohl der NEP- als auch der ACE-Aktivität gilt als ein therapeutischer Ansatz um die Ablagerungen von A β zu verhindern und die AD zu behandeln.

4.8 Beeinflussung der Menge von endogen produzierten A β 1-42 durch ausgewählte Substanzen

Das β -Amyloid-Peptid (A β) ist der Hauptbestandteil der Amyloid-Plaques, die ein spezifisches morphologisches Merkmal der AD sind. A β ist ein aus 40 bis 42 Aminosäurenresten bestehendes Spaltprodukt (Caughey et al. 2003). Das freigesetzte β -

Amyloid-Peptid wird aus den Zellen ausgeschleust und lagert sich im Extrazellularraum mit Fibrillen zu β -Faltblattstrukturen zusammen, die durch ständige Apposition schließlich zu den Kernen der Plaques heranwachsen. Der Grad der A β -Akkumulation ist von seiner Produktion und von seinem Abbau abhängig. Ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Abbau von A β ist für die Degeneration der Neuronen und so für die Entwicklung der AD verantwortlich (Glabbe 2000).

Eine Stimulation des Abbaus von A β soll dazu führen, dass die Ablagerung von A β vermindert wird. In der Literatur ist über den Einfluss von NEP auf die A β -Konzentration im Gehirn von Knock-out-Mäusen berichtet: hier kann NEP A β in vivo abbauen (Iwata et al. 2001; Selkoe 2001b; Marr et al. 2003; 2004). Viele Studien zeigten, dass die Hemmung der NEP-Aktivität zur Ablagerung der A β im Gehirn führte (Shiratori et al. 2001; Iwata et al. 2005). Tatsächlich führt die Über-Expression der NEP zu einer signifikanten Abnahme von A β in primären kortikalen Neuronen (Hama et al. 2001).

Eine Beziehung zwischen der AD und dem Angiotensin Converting Enzyme (ACE; EC 3.4.15.1) konnte in Polymorphismen-Studien hergestellt werden. Diese Studien zeigten, dass ein (I)/deletion (D) Polymorphismus innerhalb des Intron 16 des ACE-Gens mit der AD verbunden ist (Kehoe et al. 1999). Speziell wurde nachgewiesen, dass das I-Allel mit einem erhöhten Risiko für AD verbunden ist, während das D-Allel zum Schutz vor AD führt (Elkines et al. 2004; Lehemann et al. 2005). Es wurde herausgefunden, dass das I-Allel mit AD, aber nicht mit anderen Formen der vaskulären Demenz zusammenhängt (Kolsch et al. 2005; Sleegers et al. 2005). Der Genotypus III steht in direktem Zusammenhang mit einem geringeren Volumen des Hippocampus und des Mandelkerns (Corpus amygdaloideum) (Sleegers et al. 2005). Eine Obduktionsanalyse (post mortem-Analyse) der Alzheimerpatienten zeigte, dass die Patienten mit dem Genotypus III eine höhere Wahrscheinlichkeit zur Belastung des A β 1-42 im Gehirn haben als die Patienten mit Genotypus DID (Lendon et al. 2002). Autopsiestudien zeigten, dass die Patienten mit der AD ein erhöhtes ACE-Niveau in der temporalen Cortex und vor allem innerhalb der pyramidal-kortikalen Neurone haben (Savaskan et al. 2001; Barnes et al. 1991) sowie bedeutend erhöhte ACE-Aktivität im mittleren Hippocampus, im Gyrus parahippocampalis, in der Frontalrinde und dem Nucleus caudatus (Arregui et al. 1982). Ein mechanistischer Zusammenhang zwischen dem ACE und der AD wurde aufgestellt, als nachgewiesen wurde, dass ACE die

Aggregation, die Ablagerung und die Zytotoxizität von A β in vitro durch den Abbau von A β 1-40 an Asp7-Ser8 hemmen kann (Hu et al. 2001).

Auf der Grundlage des A β -Abbaus durch ACE (Hu et al. 2001) werden die möglichen Einflüsse von ACE-Varianten auf das Niveau von A β 1-42 in der Zerebrospinalflüssigkeit (ZSF) beobachtet. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass durch den Effekt der ACE-Varianten das Niveau von A β 1-42 bei Alzheimer-Patienten im Vergleich zur Kontrolle geringer war (Andreasen and Blennow 2002). Eine neue Studie zeigte, dass ACE das Niveau von produziertem A β 1-40 und A β 1-42 in lebenden Zellen senken und diese Wirkung durch ACE-Inhibitoren aufgehoben werden kann (Hemming and Selkoe 2005).

Die „längeren Formen“ von A β -Peptid, A β 1-42 und A β 1-43 haben eine größere Tendenz als A β 1-40 zu aggregieren. Aufgrund dessen wurde in der vorliegenden Arbeit die Menge von endogen produziertem A β 1-42 bestimmt. In der Arbeit wurde untersucht, ob der Induktionseffekt der NEP-Aktivität durch ausgewählte Substanzen zu einer Hemmung der Menge von endogen produziertem A β 1-42 in SK-N-SH-Zellen führen kann (Ayoub and Melzig 2006c). Die menschliche Neuroblastomazelllinie (SK-N-SH) konnte sowohl A β 1-40 als auch A β 1-42 produzieren (Haugabook et al. 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die SK-N-SH-Zellen A β 1-42 bis zu einer Konzentration von 0.48 pg/ μ g Zell-DNA produzieren konnten (1.0 μ g DNA enthält ca. 100000 Zellen).

In ersten Experimenten (**Kap. 3.7.1**) wurde der Effekt von Grüntee-Extrakt, Apigenin, Luteolin, Curcumin, Rolipram und Phosphoramidon auf die Menge des endogen produzierten A β 1-42 untersucht. Die ausgewählten Substanzen wurden zu 1.0 ml Medium (1 % FBS) in 6-Well-Platten gegeben, in welche SK-N-SH-Zellen ausgesät worden waren. Nach 72 h wurde das Medium, welches die Substanzen enthielt, zur Bestimmung des A β 1-42 gesammelt, um den Kurzzeiteffekt der ausgewählten Substanzen zu untersuchen (**Kap. 2.7.2.1**). In der Kontrolle war die Menge des A β 1-42 im Medium nach 72 Stunden Inkubation in der Anwesenheit der ausgewählten untersuchten Substanzen in den ersten Experimenten (Tab. 20) niedriger als die Menge nach 24 Stunden Inkubation in den zweiten Experimenten ohne die ausgewählten untersuchten Substanzen (Tab. 21). Dies könnte damit erklärt werden, dass entweder die Zellen in den ersten Experimenten weniger A β 1-42 als Reaktion zur direkten Hemmung der NEP-Aktivität durch die ausgewählten untersuchten Substanzen produzierten, oder dass die Zellen in den zweiten Experimenten mehr A β 1-42 als Reaktion zur Induktion

der NEP-Aktivität durch die ausgewählten untersuchten Substanzen produziert hatten. Phosphoramidon als Standard wurde aufgrund seiner Wirkung als spezifischer NEP-Hemmer benutzt (Kenny et al. 1981).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass Phosphoramidon zu einer Erhöhung des A β 1-42 im Medium der Zellen um 31 % führte, während Grüntee-Extrakt zu einer Erhöhung um 162 % führte. Für Apigenin, Luteolin, Curcumin und Rolipram wurde kein signifikanter Effekt registriert (**Kap. 3.7.1**). Dies könnte damit erklärt werden, dass der Kurzzeiteffekt des Grüntee-Extrakts die NEP-Aktivität hemmte und das zu einer Zunahme von A β 1-42 im Medium führte. In der Arbeit wurde gezeigt, dass in den Kurzzeitversuchen auch Apigenin und Luteolin die NEP-Aktivität hemmen konnten (**Kap. 3.3**). Trotzdem konnte keine Erhöhung von A β 1-42 im Medium der Zellen durch diese beiden Substanzen festgestellt werden. Dies könnte damit erklärt werden, dass Apigenin und Luteolin in den Langzeitversuchen sowohl die NEP- als auch die ACE-Aktivität, welche den Abbau von A β 1-42 induzierte, erhöhten (**Kap. 3.3 und Kap. 3.6.5**). Rolipram erhöhte nur die NEP-Aktivität in den Langzeitversuchen ohne Wirkung in den Kurzzeitversuchen.

In weiteren Experimenten wurde der Effekt von Grüntee-Extrakt, Apigenin, Luteolin und Curcumin auf die Mengen des A β 1-42 im Medium der Zellen untersucht. Die Testsubstanzen wurden zu 2.0 ml Medium (10 % FBS) in 6-Well-Platten gegeben, in welche SK-N-SH-Zellen ausgesät wurden. Das Medium wurde nach 48 h auf 1.0 ml Medium (1 % FBS) gewechselt und die Zellen wurden für weitere 24 h kultiviert. Danach wurde das Medium, welches keine Testsubstanzen mehr enthielt, zur Bestimmung des A β 1-42 im Medium der Zellen gesammelt (**Kap.2.7.2.2**), um den Langzeiteffekt der ausgewählten Substanzen zu untersuchen. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigten, dass durch Apigenin, Luteolin und Curcumin die Menge des endogen gebildeten A β 1-42 signifikant gehemmt wurde, während sie durch Grüntee-Extrakt um 34 % erhöht wurde (**Kap. 3.7.2**). Dies könnte damit erklärt werden, dass Apigenin, Luteolin und Curcumin in den Langzeitversuchen sowohl die NEP- als auch die ACE-Expression erhöhen konnten, während der Grüntee-Extrakt die NEP-Expression erhöhte ohne die ACE- Expression zu beeinflussen (Melzig and Janka 2003).

Eine andere mögliche Erklärung für die beobachteten Ergebnisse könnte auf der unterschiedlichen Produktion der Menge von A β 1-42 und A β 1-40 basieren. Viele Studien wurden durchgeführt, um die Rolle der NEP im Abbau von A β 1-42 und A β 1-40

im Gehirn zu erklären. Es wurde gezeigt, dass NEP A β 1-42 und A β 1-40 in einer gleichwertigen Menge abbauen konnte (Iwata et al. 2001; Shiratoni et al. 2001). Eine andere neue Studie zeigte, dass die Wild-Typ-NEP und alle weiteren Isoformen (Chimären) beim Abbau des intrazellulären A β 1-40 effektiver sind als beim Abbau des intrazellulären A β 1-42 (Hama et al. 2004).

4.9 Beeinflussung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch ausgewählte Substanzen

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein second messenger, welcher verschiedene Enzyme durch Induktion der Phosphorylierung oder der Dephosphorylierung aktivieren oder inhibieren kann. In der vorliegenden Arbeit werden zwei Theorien für die Erklärung der Wirkungsmechanismen der beobachteten Enzyminduktion vorgestellt. Die erste Theorie basiert auf dem Verhältnis zwischen der Zelldifferenzierung und der Zellproliferation. Der anderen Theorie liegt die Erhöhung des Niveaus von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) zugrunde, was durch die untersuchten ausgewählten Substanzen verursacht wird. In der Arbeit wurde vorausgesetzt, dass die Gen-Expression der NEP durch die Aktivierung der CREB-Phosphorylierung (CREB: cAMP responsive element-binding protein), welche durch die Erhöhung der cAMP-Konzentration verursacht wird, induziert wird. Das CREB-Protein ist ein Transkriptionsaktivator, der eine stimulierende Wirkung auf die Transkription von Genen ausübt, die cis-regulatorische, cAMP-sensitive DNA-Elemente (cAMP responsive elements, CREs) tragen. CREs sind DNA-Abschnitte, die eine von cAMP ausgehende Transkriptionsregulation vermitteln. Bei einer Erhöhung der cAMP-Konzentration werden Proteinkinasen aktiviert, die auf direktem oder indirektem Weg die Phosphorylierung und Regulation von Transkriptionsaktivatoren bewirken können. Für die Transkriptions-Stimulation der betreffenden Genabschnitte ist zum einen die Bindung von CREB an die CREs und zum anderen eine Phosphorylierung von CREB an Ser133 notwendig. Die Phosphorylierung von CREB an der Ser133 wird über einen cAMP-abhängigen Signalübertragungsweg vermittelt. Das CBP (CREB-binding protein) bindet sich spezifisch an CREB und vermittelt die Wechselwirkung von CREB. Diese Bindung ist von dessen Phosphorylierung an Ser113 abhängig. Nur wenn Ser113 des CREB phosphoryliert ist, kommt es zur spezifischen Interaktion zwischen CREB und CBP, und nur damit kann CBP seine

Vermittlerfunktion zwischen basalem Transkriptionsapparat und Transkriptionsaktivator wahrnehmen (Abb. 26) (Gerhard Krauss 1997).

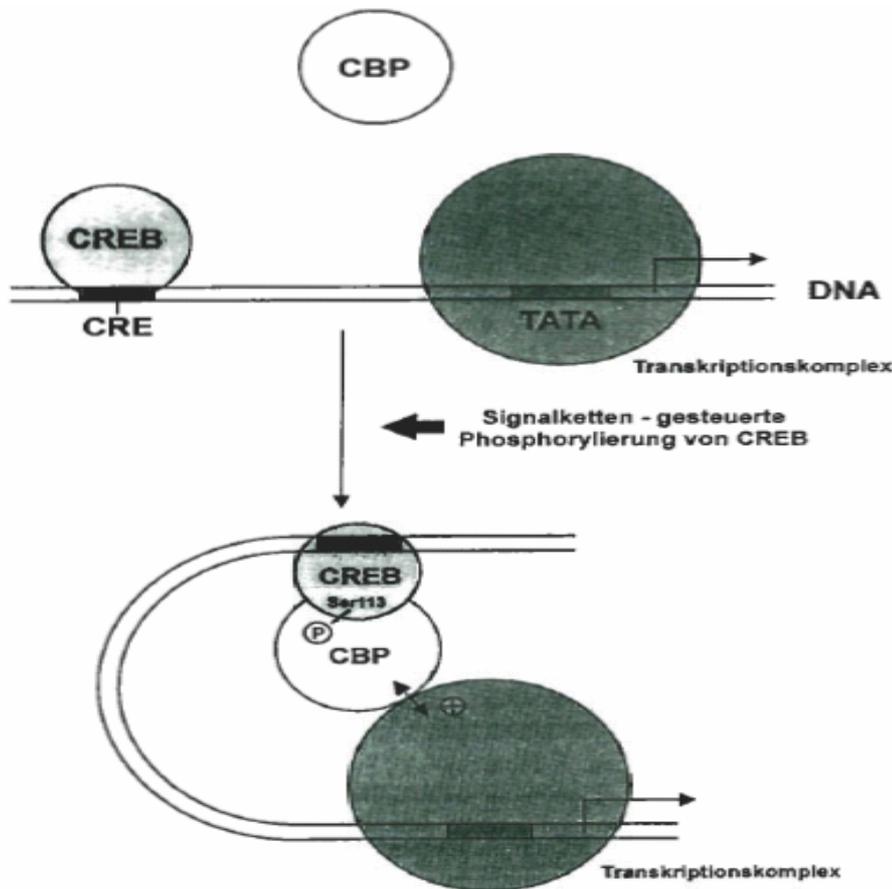


Abbildung 25: Regulation der Aktivität eines Transkriptionsfaktors durch Phosphorylierung (Gerhard Krauss 1997, S. 61).

Die Erhöhung des cAMP-Spiegels besitzt ein therapeutisches Potential für die Verzögerung der AD. Diese Krankheit kann durch Behandlung mit Stoffen, wie Dibutyryl-cAMP, Theophyllin und Isoproterenol, die das intrazelluläre cAMP erhöhen, verzögert werden (Wolozin et al. 1993). Das cAMP-Signal wird als Gedächtnisregulator bezeichnet. Viele Studien zeigten, dass die Erhöhung des Niveaus von cAMP die synaptische Plastizität und die Leistungsfähigkeit des Gedächtnisses erhöht (Wang et al. 2004; Barad et al. 1998). Ferner sind der Schweregrad und die Dauer der AD mit der Hemmung des Niveaus von cAMP und CREB verbunden (O'Neill et al. 1994; Yamamoto-Sasaki et al. 1999; Yamamoto et al. 2000). Die Neurotoxizität, welche durch A β induziert wird, kann durch Erhöhung des Niveaus von intrazellulärem cAMP verringert werden (Parvathenani et al. 2000). Die Erhöhung der Konzentration von intrazellulärem cAMP hemmt die Stimulation, welche zur Produktion von TNF-alpha führt, durch Hemmung der nuklearen Translokation und der DNA-Bindungsaktivität von NF-kappaB (Chong et al. 2002). Weiterhin wirkt die Erhöhung von cAMP auch

entzündungshemmend und unterdrückt die Aktivierung der Immunzellen (Souness et al. 2000; Kammer 1988). Viele Studien zeigten, dass solche Stoffe, die die cAMP-Bildung stimulieren, neuroprotektiv für viele Neuronal-Typen durch verschiedene Mechanismen sind. Diese Stoffe können den Effekt von neurotrophischen Molekülen potenzieren (Meyer-Franke et al. 1995), die Phosphorylierung von Neuronal-Ca²⁺-Kanälen durch Proteinkinase A (PKA) induzieren und den Ca²⁺-Influx verhindern (Nijjar et al. 2000). Zusätzlich können diese Stoffe den antiapoptotischen MAPK-ERK-Signalweg aktivieren (Troade et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass CREB im Hippocampus in der Formation des Langzeitgedächtnisses impliziert ist (Silva et al. 1995). CREB wird als ein Überlebensfaktor für Zellen und als ein molekularer Signalwandler für verschiedene Faktoren für den Tod der Zellen, welcher mit neurologischer Krankheit verbunden ist, bezeichnet (Dawson and Ginty 2002). Es wurde berichtet, dass das cAMP-Analogon (Dibutyryl-cAMP) den Amyloid 105-Aminosäure Carboxyl-Terminal-Fragment (CT105)-induzierten Signalweg durch exzessive CREB-Phosphorylierung unterdrücken kann, was zur Hemmung der CREB-DNA-Bindungs-Aktivität und zur Hemmung der Expression von Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) führt (Chong et al. 2003). Die NEP-Expression wird von Transkriptionsfaktoren in gewebespezifischer Weise bei Menschen und Ratten reguliert. Die NEP-mRNA-5'-Region wird von Exon 1 bis 3 wechselweise gespalten, was in vier verschiedenen mRNA-Transkripten resultiert (D'Adamio et al. 1989; Li et al. 1995). Dexamethason inhibiert die NEP durch die Hemmung der Transkription von NEP-mRNA auf B-Lymphozyten (Cupic et al. 2005). Vor kurzem wurde nachgewiesen, dass die NEP-Expression und NEP-Aktivität, welche durch Transkription der Amyloid-β-Vorläuferprotein-Intrazellulär-Domänen (AICDs) kontrolliert werden (Pardossi-Piquard et al. 2005), durch einen γ-Sekretase Presenilin-abhängigen Mechanismus erzeugt werden (Passer et al. 2000).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Induktion der NEP-Aktivität durch die untersuchten Substanzen mit einer Erhöhung der cAMP-Konzentration verbunden war (**Kap. 3.5.2 und Kap. 3.5.3**). Apigenin, Luteolin, Grüntee-Extrakt, Curcumin und Rolipram konnten das Niveau von cAMP in den SK-N-SH-Zellen erhöhen. Dies korreliert mit Angaben aus der Literatur, in der nachgewiesen wurde, dass sowohl Apigenin, Luteolin und Rolipram (Ko et al. 2004; Vitolo et al. 2002) als auch Hauptinhaltsstoffe des Grüntee-Extrakts wie Methylxanthine und Polyphenole das Niveau von cAMP erhöhen (Ajiori et al. 1990; Dulloo et al. 2000). Rolipram kann die

Hemmung in der maximalen CRE-Bindung im basalen Vorderhirn im Alter aufheben (Asanuma et al. 1996). Ferner erhöht Rolipram die Expression und die Phosphorylierung von CREB (Monti et al. 2006). Außerdem kann Rolipram die CREB-DNA-Bindungsaktivität erhöhen und die Neurotoxizität hemmen (Zou and Crews 2006). Eine aktuelle Studie zeigte, dass die Hemmer der Phosphodiesterase IV (PDE4) die CREB-abhängige-Gen-Expression erhöhen und die Langzeitgedächtnisstörung von CBP +/- mutierten Mäusen konzentrationsabhängig verbessern (Bourtchouladze et al. 2003).

Aus all diesen Gründen wurde der Effekt von Grüntee-Extrakt, Apigenin, Luteolin, Curcumin und Rolipram im Rahmen dieser Arbeit auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass der Induktionseffekt dieser Substanzen auf die NEP-Aktivität unabhängig von der Zellproliferationshemmung war.

Um nachzuweisen, dass der Induktionseffekt dieser Substanzen auf die NEP-Aktivität mit einer Erhöhung von intrazellulärem cAMP in SK-N-SH-Zellen einherging, wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration nach der Langzeitinkubation der Zellen mit diesen ausgewählten Substanzen bestimmt (**Kap. 3.8**). Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass die Enzyminduktion durch diese Substanzen von einer Erhöhung des Niveaus von intrazellulärem cAMP begleitet war. Dies könnte ein Beleg dafür sein, dass ein direkter Induktionseffekt auf die Gen-Expression der NEP durch die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration für die beobachtete Enzyminduktion von den untersuchten Substanzen verantwortlich wäre, und dass dieser Effekt NEP-spezifisch ist, da eine Erhöhung der cAMP-Konzentration durch Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram keine Induktion der ACE-Aktivität auslöste (**Kap. 3.6.4**).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Neutrale Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11) ist ein interessantes Target in der Forschung der Alzheimer-Demenz (AD). Überexpression und/oder eine physiologisch gesteigerte Aktivität der NEP haben für den Abbau von β -Amyloid ($A\beta$) und für die Verhinderung der Ablagerung von $A\beta$, welches für die Entstehung und Progression der AD verantwortlich ist, eine funktionelle Bedeutung. Seit kurzem gilt die Stimulation von NEP und anderen Enzymen, die $A\beta$ abbauen, als therapeutischer Ansatz für die AD. Auch Angiotensin-Converting Enzyme (ACE, EC 3.4.15.1) kann $A\beta$ abbauen und die Ablagerung von $A\beta$ hemmen. Zahlreiche Studien mit Grünem Tee, Ginkgo-biloba und Flavonoiden belegen einen neuroprotektiven Effekt dieser Naturprodukte. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie Grüntee-Extrakt und seine Inhaltsstoffe, Ginkgo-biloba-Extrakt und seine Inhaltsstoffe, ausgewählte Flavonoide und andere ausgewählte Substanzen die NEP- und ACE-Aktivität in SK-N-SH-Zellen beeinflussen und welche Mechanismen dafür verantwortlich sein könnten. Zusätzlich wurde der Induktionseffekt der NEP- und ACE-Aktivität durch die ausgewählten Substanzen hinsichtlich der Menge von $A\beta_{1-42}$, die von SK-N-SH-Zellen produziert und im Medium sekretiert wird, beobachtet.

- Erstmals wurde ein konzentrationsabhängiger Induktionseffekt bezüglich der Aktivität von NEP durch Grüntee-Extrakt, Coffein, Theophyllin, Theobromin, Theanin, Deoxyepigallocatechin gallate, Ginkgo-biloba-Extrakt, Apigenin, Luteolin, Vinpocetin, und Curcumin im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet.
- Dieser Induktionseffekt wurde von einer Proliferationshemmung der SK-N-SH-Zellen begleitet. Dieser könnte so interpretiert werden, dass die Zunahme der zellulären Enzym-Aktivität mit einer erhöhten Zelldifferenzierung verbunden ist.
- Zusätzlich konnte die Kombination zwischen Arabinosylcytosin und ausgewählten Substanzen, wie Apigenin, Luteolin, Vinpocetin und EC, EGC, EGCG in Kombination mit Coffein als Einzelstoffe zeigen, dass der Induktionseffekt der NEP-Aktivität durch die untersuchten Substanzen unabhängig von der Zellproliferationshemmung war. Rolipram, Forskolin und Dibutyryl-cAMP konnten die NEP-Aktivität induzieren ohne die Zellproliferation zu beeinflussen.

- Die Untersuchungen der cAMP-Bildung durch die ausgewählten Substanzen lieferten Ansatzpunkte für die Beziehung zwischen der Erhöhung der NEP-Aktivität und der Erhöhung von cAMP in SK-N-SH-Zellen.
- Die Induktion der NEP-Aktivität könnte auf einer Stimulation der Zelldifferenzierung basieren.
- Um die Spezifität der untersuchten Substanzen auf die NEP-Aktivität aufzuzeigen, wurde ihr Effekt auch auf die ACE-Aktivität untersucht. Grüntee-Extrakt, Ginkgo-biloba-Extrakt, Coffein und Theophyllin konnten die ACE-Aktivität im Vergleich zu NEP nur leicht induzieren. Rolipram, Forskolin und Dibutyryl-cAMP hatten keinen Effekt auf die ACE-Aktivität, während Apigenin, Luteolin und Vinpocetin sowohl die ACE- als auch die NEP-Aktivitäten signifikant induzieren konnten.
- Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Erhöhung der NEP und ACE-Aktivitäten durch Apigenin, Luteolin und Curcumin zur Hemmung der produzierten und ins Medium sezernierten Menge an A β 1-42 führen. Der Kurzeiteffekt des Grüntee-Extrakts führte zur direkten Hemmung der NEP-Aktivität und zu einer Zunahme von endogenem A β 1-42 um 162 %. Der Grüntee-Extrakt ist ein direkt NEP-Inhibitor. Die gesteigerte NEP-Aktivität durch den Langzeiteffekt des Grüntee-Extrakts führte zu einer Zunahme von endogenem A β (1-42) um 34 %. Diese Ergebnisse könnten damit erklärt werden, dass Apigenin, Luteolin und Curcumin in den Langzeitversuchen sowohl die NEP- als auch die ACE-Aktivität erhöhen, während der Grüntee-Extrakt die NEP-Aktivität erhöhte ohne die ACE-Aktivität zu beeinflussen.
- Die Induktion sowohl der NEP- als auch der ACE-Aktivität könnte einen vielversprechenden neuartigen Ansatz zur Behandlung und/oder Prävention der AD durch die Zunahme des Abbaus von A β darstellen.

6 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Die NEP beeinflusst eine Vielzahl von physiologischen/ pathophysiologischen Prozessen, indem sie endogene Mediatoren mit Peptidstruktur hydrolysiert. Aus diesen vielfältigen Funktionen des Enzyms können bestimmte pathologische Vorgänge durch eine pharmakologische Modulation der NEP (Aktivierung oder Hemmung) beeinflusst werden (z. B. Blutdruck, Adipositas, Alzheimer-Demenz (AD)).

In den letzten 10-15 Jahren wurde die Möglichkeit einer Hochregulierung der NEP besonders in Zusammenhang mit der AD häufiger diskutiert (Iwata et al. 2005), aber realistische Behandlungsansätze fehlen immer noch. Die gentechnischen Ansätze zur Erhöhung der NEP-Aktivität bei Mäusen unter Nutzung von Lentiviren als Genfähren (Marr et al. 2003) sind sicher kein praktikabler Weg als Therapieform der näheren Zukunft. Die Induktion der NEP-Aktivität an Zellmodellen durch Somatostatin, Quercetin, Resveratrol und Grüntee-Extrakt sind viel versprechende Ansatzpunkte für spätere Arzneimittelentwicklungen (Saito et al. 2005; Melzig et al. 2002; 2003). Die Erhöhung der NEP-Aktivität könnte auch für die Behandlung des Adipositas förderlich sein. Bei übergewichtigen Mäusen wird eine Reduktion des Körpergewichtes durch die regelmäßige Gabe von Epigallocatechinen, welche in großem Maß in Grüntee-Extrakt vorkommen, beobachtet (Klaus et al. 2005). Gleichzeitig muss aber das Risiko einer unerwünschten Beeinflussung anderer Funktionen, wie der Regulierung des Blutdrucks und der Natriurese, beachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen NEP und der AD beschrieben. Ziel dieser Arbeit war es nicht nur, die Einflüsse von ausgewählten Arzneipflanzenextrakten auf die NEP-Aktivität in SK-N-SH-Zellen in vitro hinsichtlich einer Induktion des Abbaus von β -Amyloid-Peptid ($A\beta$) zu untersuchen, sondern auch Ansätze zu den möglichen Wirkungsmechanismen der vermuteten neuroprotektiven Wirkung der ausgewählten Drogen und Naturstoffe bei neurodegenerativen Erkrankungen aufzuzeigen. Zusätzlich sollten in der Arbeit die Einflüsse von ausgewählten Naturstoffen, welche die Aktivität der NEP erhöhten, auf das Enzym ACE untersucht werden, um die Spezifität dieser Naturstoffe bezüglich ihrer Wirkungen auf die NEP zu prüfen.

Trotz der großen Ähnlichkeit beider Enzyme zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass manche Testsubstanzen nur die NEP-Aktivität erhöhten ohne die ACE-Aktivität zu

beeinflussen. Dies könnte damit erklärt werden, dass die beiden Enzyme mit unterschiedlichen Mechanismen induzierbar sind. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Struktur der Enzyme auf DNA-Ebene bzw. die unterschiedlichen Mechanismen der Transkriptionssteuerung sein. Die Erhöhung der cAMP-Bildungsrate könnte eine gesteigerte CREB-Phosphorylierung (cAMP responsive element-binding protein, als Transkriptionsfaktor) verursachen. Bis jetzt gibt es keine Studien, die auf einen Zusammenhang zwischen NEP-Gen-Expression und CREB-Phosphorylierung hinweisen. Für manche der untersuchten Substanzen in der Arbeit (Rolipram, Forskolin, Dibutyryl-cAMP, Apigenin, Luteolin und Catechine) wurde nachgewiesen, dass sie die Expression und die Phosphorylierung von CREB erhöhen können. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die These aufgestellt, dass die Aktivierung von CREB-Phosphorylierung die Gen-Expression der NEP induzieren könnte. Künftig sollte durch weitere Untersuchungen die Beziehung zwischen CREB und Gen-Expression der NEP sowie der Zusammenhang zwischen der Erhöhung des cAMP-Niveaus und der Induktion der NEP- und ACE-Aktivität (die hier vorgestellten Ansätze) abgeklärt werden.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- A β beta-Amyloid
- ACE Angiotensin-Converting-Enzyme (EC 3.4.15.1)
- AChE Acetylcholinesterase
- AChT Acetylcholintransferase
- AD Alzheimer-Demenz
- AGEs Advanced Glycation Endproducts
- AMC 7-Amino-4-methylcumarin
- AMP Adenosin-5`-monophosphat
- Apo-E4 Apolipoprotein-E4
- APP Amyloid Precursor Protein
- cAMP 3`-5`-Zyklisches Adenosinmonophosphat
- CBP CREB-binding protein
- Coff Coffein
- CREB cAMP responsive element-binding protein
- CREs cAMP responsive elements
- DMSO Dimethylsulfoxid
- DNA Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure (DNS)
- EC Epicatechin
- EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
- EGb 761® Ginkgo-biloba-Extrakt
- EGC Epigallocatechin
- EGCG Epigallocatechingallat
- EIA Enzym-Immunoassay
- ELISA enzyme-linked-immunosorbent assay
- EMF Elektromagnetische Felder
- FBS Fetales Kälberserum
- GSH Glutathion
- HEPES 2-[4-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-Ethansulfonsäure
- Hip-L-His-L-Leu Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin
- HSV 1 Herpes-Simplex-Virus Typ 1
- IC₅₀ halbmaximale inhibitorische Konzentration
- LAP Leucin-Aminopeptidase (EC 3.4.11.2)

- LDL Low Density Lipoprotein
- L-His-Leu L-Histidyl-L-Leucin
- LRP Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein
- MEM Minimal Essential Medium
- NEP Neutrale Endopeptidase (EC 3.4.24.11)
- NMDA [N-Methyl-D-Aspartat]-Rezeptor-Antagonist
- NSAR Nicht-steroidale Antirheumatika
- PBS Phosphate Buffer solution
- SAAP-AMC N-Succinyl-Ala-Ala-Phe-7-Amido-4-Methylcumarin
- SD standard deviation, Standardabweichung
- ThB Theobromin
- ThP Theophyllin
- TMB Tetra Methyl Benzidin
- ZSF Zerebrospinalflüssigkeit

Als Dezimaltrennzeichen wird ein Punkt verwendet.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2003; 23: 363-398.
- Ahlemeyer B and Kriegelstein J. Pharmacological studies supporting the therapeutic use of Ginkgo biloba extract for Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry* 2003; 36: 8-14.
- Ajiro K, Shibata K, Nishikawa Y. Subtype-specific cyclic AMP-dependent histone H1 phosphorylation at the differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 6494-6500.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000; 21: 383-421.
- Akiyama H, Kondo H, Ikeda K, Kato M, McGeer PL. Immunohistochemical localization of neprilysin in the human cerebral cortex: inverse association with vulnerability to amyloid beta-protein deposition. *Brain Res* 2001; 902: 277-281.
- Albrecht, D, Broser M, Kruger H. Excitatory action of angiotensins II and IV on hippocampal neuronal activity in urethane anesthetized rats. *Reg Pep* 1997; 70: 105-109.
- Ammon HP and Wahl MA. Pharmacology of Curcuma longa. *Planta Med* 1991; 57: 1-7.
- Andreasen N and Blennow K. Beta-Amyloid (Abeta) protein in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease. *Peptides* 2002; 23: 1205-1214.
- Andrieu S, Gillette S, Amouyal K, Nourhashemi F, Reynish E, Ousset PJ, Albarede JL, Vellas B, Grandjean H; EPIDOS study. Association of Alzheimer's disease onset with Ginkgo biloba and other symptomatic cognitive treatments in a population of women aged 75 years and older from the EPIDOS study. *J Gerontol Med Sci* 2003; 58A: 372-377.
- Angelisova P, Drbal K, Horejsi V, Cerny J. Association of CD10/neutral endopeptidase 24.11 with membrane microdomains rich in glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and Lyn kinase. *Blood* 1999; 93: 1437-9.
- Arregui A, Perry EK, Rossor M, Tomlinson BE. Angiotensin converting enzyme in Alzheimer's disease increased activity in caudate nucleus and cortical areas. *J Neurochem* 1982; 38: 1490-1492.

- Asanuma M, Nishibayashi S, Iwata E, Kondo Y, Nakanishi T, Vargas MG, Ogawan MG. Alterations of cAMP response element-binding activity in the aged rat brain in response to administration of rolipram, a cAMP-specific phosphodiesterase inhibitor. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; 41: 210-215.
- Axelrod J and Reisenthal J. The fate of caffeine in man and a method for its estimation in biological material. *J Pharmacol* 1953; 107: 519-523.
- Ayoub S, Melzig MF. Induction of neutral endopeptidase (NEP) activity of SK-N-SH cells by natural compounds from green tea. *J P P* 2006a; 58: 495-501.
- Ayoub S, Melzig MF. Induction effects of apigenin, luteolin and vinpocetin on neutral endopeptidase (NEP) and angiotensin-converting enzyme activity (ACE) of SK-N-SH cells. *N P C* 2006b (in Press).
- Ayoub S, Melzig MF. Influence of selected natural products on NEP activity and beta-Amyloid production in SK-N-SH cells. *Pharm Biol* 2006c (submitted).
- Barad M, Bourtchouladze R, Winder DG, Golan H, Kandel E. Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15020–15025.
- Barker PE, Shipp MA, D'Adamio L, Masteller EL, Reinherz EL. The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3 (q21-q27). *J Immunol* 1989; 142: 283-287.
- Barnes NM, Cheng CH, Costall B, Naylor RJ, Williams TJ, Wischik CM. Angiotensin converting enzyme density is increased in temporal cortex from patients with Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 1991; 200: 289-292.
- Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. London and San Diego: Academic Press 1998.
- Baum L and Ng A. Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models. *J Alzheimers Dis* 2004; 6: 367-377.
- Beaumont A, Fournie-Zaluski M-C, Roque BP. Neutral endopeptidase-24.11: structure, and design and clinical use of inhibitors. Hrsg.: Hooper, N.M.: Zinc metalloproteases in health and disease. Taylor and Francis, London (1996), S. 105-129.
- Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 1995; 75: 725-748.
- Belandia B, Latasa MJ, Villa A, Pascual A. Thyroid hormone negatively regulates the transcriptional activity of the β -amyloid precursor protein gene. *J Biol Chem* 1998; 273: 30366–30371.

- Belibi FA, Wallace DP, Yamaguchi T, Christensen M, Reif G, Grantham JJ. The effect of caffeine on renal epithelial cells from patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2723-2729.
- Belluardo N, Mudo G, Blum M, Itoh N, Agnati L, Fuxe K. Nicotine induced FGF-2mRNA in rat brain is preserved during aging. *Neurobiol. Aging* 2004; 25: 1333-1342.
- Berezcki D and Fekete I. A systematic review of vinpocetine therapy in acute ischaemic stroke. *Euro J Clin Pharmacol* 1999; 55: 349-352.
- Bharti AC, Donato N, Singh S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and IkappaBalpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* 2003; 101: 1053-1062.
- Bick K, Amaducci L, Pepeu G. *The Early Story of Alzheimer's disease*. New York (1987): Raven: 1-3.
- Bickel H. Demenzsyndrom und Alzheimer Krankheit: Eine Schätzung des Krankenbestandes und der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland. *Gesundheitswesen* 2000; 62: 211-218.
- Bormann H and Melzig MF. Inhibition of metalloproteinase by flavonoids and related compounds. *Pharmazie* 2000; 55: 129-132.
- Bourtchouladze R, Lidge R, Catapano R, Stanley J, Gossweiler S, Romashko D, Scott R, Tully T. A mouse model of Rubinstein-Taybi syndrome: Defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of histone deacetylase 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10518-10522.
- Breitner JC, Folstein MF. Familial Alzheimer Dementia: A prevalent disorder with specific clinical features. *Psychol Med* 1984; 14: 63-80.
- Brice CF and Smith AP. Effects of caffeine on mood and performance: a study of realistic consumption. *Psychopharmacology* 2002; 164: 188-192.
- Brunk CF, Jones KC, James TW. Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal Biochem* 1979; 92: 497-500.
- Burian E. An ergot alkaloid preparation (hydergine) in the treatment of presenile brain atrophy (Alzheimer's disease): case report. *J Am Geriatr Soc* 1974; 22: 126-128.
- Caughey B, Lansbury PT. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: Separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 2003; 26: 267-298.
- Cerutti PA. Oxidant stress and carcinogenesis. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 1-5.

- Cesarone CF, Bolognesi C, Santi L. Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. *Anal Biochem* 1979; 100: 188-197.
- Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Spinnewyn B, Drieu K, Fiskum G. Neuroprotective effects of bilobalide, a component of the Ginkgobiloba extract (Egc 761®), in gebril global brain ischemia. *Brain Res* 2001; 922: 282-292.
- Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG, Hsiao KK. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 1999; 2: 271–276.
- Chen H, Noble F, Coric P, Fournie-Zaluski M-C, Roques BP. Aminophosphonic inhibitors as transition state analogous of enkephalin-degrading enzymes: a class of central analgesics. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12028-12033.
- Chen Y, Zheng R, Jia Z, Ju Y. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 1990; 9: 19-21.
- Cherny RA, Atwood CS, Xilinas ME, Gray DN, Jones WD, Mclean CA, Barnham KJ, Volitakis I, Fraser FW, Kim Y, Huang X, Goldstein LE, Moir RD, Lim JT, Beyreuther K, Zheng H, Tanzi RE, Masters CL, Bush AI. Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* 2001; 30: 665-676.
- Chipkin RE, Latranyi MB, Iorio LC, Barnett A, Berger JG. Pharmacological effects of SCH 30497-a novel analgesic substance. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1985; 278: 23-44.
- Chiu PJ, Tetzloff G, Ahn HS, Sybertz EJ. Comparative effects of vinpocetine and 8-Br-cyclic GMP on the contraction and ⁴⁵Ca-fluxes in the rabbit aorta. *Am J Hypertension* 1988; 11: 262-268.
- Chong YH and Suh YH. Aggregation of amyloid precursor proteins by aluminium in vitro. *Brain Res* 1995; 670: 137-141.
- Chong YH, Shin SA, Lee HJ, Kang JH, Suh YH. Molecular mechanisms underlying cyclic AMP inhibition of macrophage dependent TNF-alpha production and neurotoxicity in response to amyloidogenic C-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Neuroimmunol* 2002; 133: 160-174.
- Chong YH, Shin YA, Suh YH. Cyclic AMP inhibition of tumor necrosis factor alpha production induced by amyloidogenic C-terminal peptide of Alzheimer's amyloid precursor protein in macrophages: involvement of multiple intracellular pathways and cyclic AMP response element binding protein. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 690-698.

- Clarimon J, Bertranpetit J, Calafell F, Boada M, Tarraga L, Comas D. Association study between Alzheimer's disease and genes involved in A β biosynthesis, aggregation and degradation: suggestive results with BACE1. *J Neurol* 2003; 250: 956-961.
- Clegg A, Bryant J, Nicholson T, McIntyre L, De Broe S, Gerard K, Waugh N. Clinical and cost-effectiveness of donepezil, rivastigmine, and galantamine for Alzheimer's disease: a rapid and systematic review. *Health Technol Assess* 2001; 5: 1-137.
- Colciaghi F, Borroni B, Zimmermann M, Bellone C, Longhi A, Padovani A, Cattabeni F, Christen Y, Di Luca M. Amyloid precursor protein metabolism is regulated toward alpha-secretase pathway by Ginkgo biloba extracts. *Neurobiol Dis* 2004; 16: 454-460.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Perica k-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261: 921-923.
- Cordy JM, Hussain I, Dingwall C, Hooper NM, Turner AJ. Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 11735-11740.
- Cupic B, Breljak D, Gabrilovac J. Receptor-mediated down-regulation of neutral endopeptidase (NEP; EC 3.4.24.11; CD10) on immature B-lymphocytes by dexamethasone. *Int J Mol Med* 2005; 15: 1023-1031.
- D'Adamio L, Shipp MA, Masteller EL, Reinherz EL. Organisation of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5' untranslated regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7103-7107.
- D'Uscio LV, Quaschnig T, Burnett JC Jr, Luscher TF. Vasopeptidase Inhibition Prevents Endothelial Dysfunction of Resistance Arteries in Salt-Sensitive Hypertension in Comparison With Single ACE Inhibition. *Hypertension* 2001; 37: 28-33.
- Dall'Igna OP, Porciuncula LO, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. Neuroprotection by caffeine and adenosine A_{2A} receptor blockade of β -amyloid neurotoxicity. *Br J Pharmacol* 2003; 23: 5361-5369.
- Daly JW, Bruns RF, Snyder SH. Adenosine receptors in the central nervous system: relationship to the central actions of methylxanthines. *Life Sci* 1981; 28: 2083-2097.
- Davies P and Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 1976; 2: 1403.
- Dawson TM and Ginty DD. CREB family transcription factors inhibit neuronal suicide. *Nat Med* 2002; 8: 450-451.

- DeFeudis V. Francis. Ginkgo biloba extract (Egb 761): From chemistry to the clinic / Francis V. DeFeudis. – Wiesbaden: Ullstein Medical 1998, S. 11-15.
- DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM. Peripheral anti-A beta antibody alters CAN and plasma A beta clearance and decrease brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8850-55.
- Devault A, Lazure C, Nault C, Le Moual H, Seidah NG, Chreiten M, Kahn P, Powell J, Mallet J, Beaumont A, Roques BP, Crine P, Boileau G. Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) deduces from a complementary DNA. *E M B O J* 1987; 6: 1317-1322.
- Dufresne CJ and Farnworth ER.: A review of latest research findings on health promotion properties of tea. *J Nutr Biochem* 2001; 12: 404-421.
- Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L, Chantre P, Vandermander J. Green tea and thermogenesis: interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 252-258.
- Eckman EA, Watson M, Marlow L, Sambamutri K, Eckman CB. Alzheimer's Amyloid beta Peptide (A β) is increased in Mice Deficient in Endothelin-Converting Enzyme. *J Biol Chem* 2003; 278: 2081-2084.
- Edenhardder R, Von Petersdorff I, Rauscher R. Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo [4,5] quinoline (IQ) and heterocyclic amine mutagenes from cooked food. *Mutation Res* 1993; 287: 261-274.
- Elkins JS, Douglas VC, Johnston SC. Alzheimer disease risk and genetic variation in ACE. *Neurology* 2004; 62: 363-368.
- Elsisi NS, Darling-Reed S, Lee EY, Oriaku ET, Soliman KF. Ibuprofen and apigenin induce apoptosis and cell cycle arrest in activated microglia. *Neurosci Lett* 2005; 375: 91-96.
- Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenberg A, Van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. Dietary Intake of Antioxidants and Risk of Alzheimer's disease. *JAMA* 2002; 287: 3223-3229.
- Exley C and Korchazhkina OV. Plasmin cleaves Abeta42 in vitro and prevents its aggregation into beta-plated sheet structures. *Neuroreport* 2001; 12: 2967-2970.
- Farrer LA, Sherbatich T, Keryanov SA, Korovaitseva GI, Rogaeva EA, Petruk S, Premkumar S, Moliaka Y, Song YQ, Pei Y, Sato C, Selezneva ND, Voskresenskaya S, Golimbet V, Sorbi S, Duara R, Gavrilova S, George-Hyslop PH, Rogaev EI. Association between angiotensin-converting enzyme and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2000; 57: 210-214.

- Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 4162-4167.
- Ferrandiz ML and Alcaraz MJ. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents and Action* 1991; 32: 283-288.
- Ferriola PC, Cody Y, Middleton JrE. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1617-1624.
- Fioravanti M and Flicker L. Efficacy of nicergoline in dementia and other age associated forms of cognitive impairment. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2001; 4: CD003159.
- Flicker L and Grimley Evans J. Piracetam for dementia or cognitive impairment. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; 2: CD001011.
- Fram RJ and Kufe DW. Inhibition of DNA excision repair and the repair of x-ray induced DNA damage by cytosine arabinoside and hydroxyurea. *Pharmacol Ther* 1985; 31: 165-176.
- Frautschy SA, Hu W, Kim P, Miller SA, Chu T, Harris-White ME, Cole GM. Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of Abeta-induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiol Aging* 2001; 22: 993-1005.
- Freir DB and Herron CE. Nicotine enhances the depressive actions of A-beta 1-40 on long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 region in vivo. *J Neurophysiol* 2003; 89: 2917-2922.
- Fujiki H. Two stages of cancer prevention with green Tea. *J Cancer Res. Clin. Oncol.* 1999; 125: 589-597.
- Fukami S, Watanabe K, Iwata N, Haraoka J, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Fraser P, Westaway D, St George-Hyslop P, Saido TC. Abeta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with Abeta pathology. *Neurosci Res* 2002; 43: 39-56.
- Fulcher IS and Kenny AJ. Proteins of the kidney microvillar membrane. The amphipathic forms of endopeptidase purified from pig kidneys. *J Biochem* 1983; 211: 743-753.
- Ganguli M, Burmeister LA, Seaberg EC, Belle S, DeKosky ST. Association between dementia and elevated TSH: a community-based study. *Biol Psychiatry* 1996; 40: 714-725.
- Ganguli M, Chandra V, Kamboh MI, Johnston JM, Dodge HH, Thelma BK, Juyal RC, Pandav R, Belle SH, DeKosky ST. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease: the Indo-US Cross-National Dementia Study. *Arch Neurol* 2000; 57: 824-830.

GeneCards(2004):<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/LocRpt.cgi?|=4311#map>.

Gerhard Krauss. Die Regulation der Transkription. In: Biochemie der Regulation und Signaltransduktion: das moderne Lehrbuch für Chemiker, Biologen und Mediziner. Weinheim 1997 S. 60-61.

Gieza A, Maier P, Poppel E. The effect of ginkgo biloba on healthy elderly subjects. Fortschr Med Orig 2003; 121: 5-10.

Giri RK, Rajagopal V, Kalra VK. Curcumin, the active constituent of turmeric, inhibits amyloid peptide-induced cytochemokine gene expression and CCR5-mediated chemotaxis of THP-1 monocytes by modulating early growth response-1 transcription factor. J Neurochem 2004; 91: 1199-1210.

Glabe C. Does Alzheimer disease tilt the scales of amyloid degradation versus accumulation?. Nat Med 2000; 6: 133-134.

Glenner GG and Wong CW. Alzheimer's disease and Down's Syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. Biochem Biophys Res Commun 1984; 122: 1131-1135.

Gouras GK, Xu H, Gross RS, Greenfield JP, Hai B, Wang R, Greengard P. Testosterone reduces neuronal secretion of Alzheimer's B-amyloid peptides. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 1202-1205.

Graf K, Kunkel K, Zhang M, Grafe M, Schultz K, Schudt C, Biroc S, Fleck E, Kunkel G. Activation of adenylate cyclase and phosphodiesterase inhibition enhance neutral endopeptidase activity in human endothelial cells. Peptides 1995; 16: 1273-1278.

Graham TE and Spriet LL. (Metabolic, catecholamine, and exercise performance responses to various doses of caffeine. J Appl Physiol 1995; 78: 867-874.

Green PS, Gridley KE, Simpkins JW. Estradiol protects against beta-amyloid (25-35)-induced toxicity in SK-N-SH human neuroblastoma cells. Neurosci Lett 1996; 218: 165-168.

Gulyas B, Halldin C, Farde L. PET studies on the uptake and regional distribution of [¹¹C] vinpocetine in human subjects. Acta Neurological Scandinavica 2002; 106: 325-332.

Gulyas B, Halldin M, Karlsson P, Chou YH, Swahn CG, Bonock P, Paracszai M, Farde L. Brain uptake and plasma metabolism of [¹¹C] vinpocetine: a preliminary PET study in a cynomolgus monkey. J Neuroimag 1999; 9: 217-222.

Haass C and Selkoe DJ. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. Cell 1993; 75: 1039-1042.

Hama E, Shiratoni K, Iwata N, Saido TC. Effects of neprilysin chimeric proteins targeted to subcellular compartments on amyloid β peptide clearance in primary neurons. J Biol Chem 2004; 279: 30259-30264.

- Hama E, Shirotani K, Masumoto H, Sekine-Aizawa Y, Aizawa H, Saido TC. Clearance of extracellular and cell-associated amyloid beta peptide through viral expression of neprilysin in primary neurons. *J Biochem (Tokyo)* 2001; 130: 721-726.
- Hans Cottier. *Pathogenese: Ein Handbuch für die ärztliche Fortbildung 2*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1980): 2127-2149.
- Haqqi TM, Anthony DD, Gupta S, Ahmad N, Lee MS, Kumar GK, Mukhtar H. Prevention of collagen induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4524-4529.
- Hara Y, Matsuzaki T, Suzuki T. Green tea controls high blood pressure. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 1987; 61: 803.
- Haugabook SJ, Yager DM, Eckman EA, Golde TE, Younkin SG, Eckman CB. High throughput screens for the identification of compounds that alter the accumulation of Alzheimer's amyloid beta peptide. *J Neurosci Methods* 2001; 108: 171-179.
- Hayashi T, Sawa K, Kawasaki M, Arisawa M, Shimizu M, Morita N. Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J Nat Prod* 1988; 51: 345-348.
- Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. Alzheimer's disease in the U.S. Population: Prevalence Estimates Using the 2000 Census. *Archives of Neurology* 2003; 60: 1119-1122.
- Helisalami S, Hiltunen M, Vepsäläinen S, Livonen S, Mannermaa A, Lehtovirta M, Koivisto AM, Alafuzoff I, Soininen H. Polymorphisms in Neprilysin gene affect the risk of Alzheimer's disease in Finnish patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 1746-1748.
- Hellstrom-Lindahl E, Mausavi M, Ravid R, Nordberg A. Reduced levels of Aβ₄₀ and Aβ₄₂ in brains of smoking controls and Alzheimer's patients. *Neurobiol Dis* 2004; 15: 351-360.
- Hemming ML and Selkoe DJ. Amyloid beta-protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor. *J Biol Chem* 2005; 280: 37644-37650.
- Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in seven countries study. *Arch Intern Med* 1995; 155: 381-386.
- Heyman A, Wilkinson WE, Hurwith BJ, Schmechel D, Sigmon AH, Weinberg T, Helms MJ, Swift M. Alzheimer's disease: genetic aspects and associated clinical disorders. *Ann Neurol* 1983; 14: 507-515.
- Hogervorst E, Bandelow S, Combrinck M, Smith AD. Low free testosterone is an independent risk factor for Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 2004; 39: 1633-1639.

- Hooper N. M.: Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett* 1994; 356: 1-6.
- Hooper NM. The biological roles of zinc and families of zinc metalloproeases. Hrsg.: Hooper NM: Zinc metalloproteases in health and disease. Taylor and Francis, London (1996), S.1-17.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 1996; 274: 99–102.
- Hu J, Igarashi A, Kamata M, Nakagawa H. Angiotensin convertine enzyme degrades Alzheimer Amyloid- β - peptide A β ; Retards A β Aggregation, depositino, Fibril Formation and inhibit cytotoxicity. *J Biol Chem* 2001; 276: 47863-47868.
- Hu J, Miyatake F, Aizu Y, Nakagawa H, Nakamura S, Tamaoka A, Takahashi R, Urakami K, Shoji M. *Neurosci Lett* 1999; 277: 65-67.
- Hudson S and Tabet N. Acetyl-l-carnitine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 2: CD003158.
- Imamoto T, Tanabe M, Shimamoto N, Kawazone K, Hirata M. Cerebral circulatory and cardiac effects of vinpocetine and its metabolite, apovincaminic acid, in anesthetized dogs. *Arzneimettelforschung* 1984; 34: 161-169.
- In t' Veld BA, Ruitenberg A, Hofman A, Launer LJ, van Duijn CM, Stijnen T, Breteler MM, Stricker BH. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2001; 345: 1515-1521.
- Ino K, Suzuki T, Uehara C, Nagasaka T, Okamoto T, Kikkawa F, Mizutani S. The expression and localisation of neutral endopeptidase 24.11/CD10 in human gestational trophoblastic diseases. *Lab Invest* 2000; 80: 1729-1738.
- Itzhaki RF, Lin W-R, Shang D, Wilcock GK, Faragher B, Jamieson GA: Herpes simplex Virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* 1997; 349: 241-244.
- Iwata N, Higuchi K, Saido TC. Metabolism of amyloid-beta peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacolog and Therapeutics* 2005; 108: 129-148.
- Iwata N, Takaki Y, Fukami S, Tsubuki S, Saido TC. Region-specific reduction of A beta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J Neurosi Res* 2002; 70: 493-500.
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC. Metabolic regulation of Abeta by neprilysin. *Science* 2001; 292: 1550-1552.
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, Kawashima-Morishima M, Lee HJ, Hama E, Sekine-Aizawa Y, Saido TC. Identification of the major Abeta 1-42-degrading catabolic

pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 2000; 6: 143-150.

Jaffe AB, Toran-Allerand CD, Green-grad Gudy SE. Estrogen regulates metabolism of Alzheimer amyloid-B-precursor protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 13065-13068.

Jorm AF, Korten AE, Henderson AS. The prevalence of dementia: a quantitative integration of the literature. *Arch Psychiatr Scand* 1987; 76: 465-479.

Juan D, Zhou DH, Li J, Wang JY, Gao C, Chen M. A-2-year follow-up study of cigarette smoking and risk of demantia. *Eur J Neurology* 2004; 11: 277-282.

Kakinuma Y, Hama H, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Murakami K, Fukamizu A. Anti-apoptotic action of angiotensin fragments to neuronal cells from angiotensinogen knockout mice. *Nat Med* 1998; 4: 1078-1080.

Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann Neurol* 1997; 42: 776-782.

Kalmijn S, Mehta KM, Pols HA, Hofman A, Drexhage HA, Breteler MM. Subclinical hyperthyroidism and the risk of dementia. The Rotterdam study. *Clin Endocrinol* 2000; 53: 733-737.

Kammer GM. The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A pathway and regulation of the immune response. *Immunol Today* 1988; 9: 222-229.

Kaneda T, Shimizu K, Urakawa N, Kajyo S. Effects of various selective phosphodiesterase inhibitors on carbachol-induced contraction and cyclic nucleotide contents in guinea pig taenia coli. *J Veter Med Sci* 2004; 66: 1047-1052.

Kanemitsu H, Tomiyama T, Mori H. Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci Lett* 2003; 350:113-116.

Kang SS, Lee JY, Choi YK, Song SS, Kim JS, Jeon SJ, Han YN, Son KH, Han BH. Neuroprotective effects of naturally occurring biflavonoids. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15: 3588-3591.

Kehoe PG, Russ C, Mellroy S, Williams H, Holmans P, Holmes C, Liolitsa D, Vahidassr D, Powell J, McGleenon B, Liddell M, Plomin R, Dynan K, Williams N, Neal J, Cairns NJ, Wilcock G, Passmore P, Lovestone S, Williams J, Owen MJ. Variation in DCPI1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. *Nat Genet* 1999; 21: 71-72.

Kenny AJ and Stephenson SL. Role of enopeptidase-24.11 in the inactivation of atrial natriuretic peptide. *FEBS Lett* 1988; 232: 1-8.

- Kenny AJ, Flucher IS, Ridgwell K, Ingram J. Microvillar membrane neutral endopeptidases. *Acta Biol Med Ger* 1981; 40: 1465-1471.
- Kerr MA and Kenny AJ. The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *J Biochem* 1974; 137: 477-488.
- Kikkawa F, Shibata K, Suzuki T, Kajiyama H, Ino K, Nomura S, Mizutani S. Signal Pathway Involved in Increased Expression of neutral Endopeptidase 24.11 by Gonadotropin releasing Hormone in Choriocarcinoma Cells. *Placenta* 2004; 25: 176-183.
- Kim DS, Park SY, Kim JK. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) that protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from beta-A (1-42) insult. *Neurosci Lett* 2001; 303: 57-61.
- Klaus S, Pultz S, Thone-Reineke C, Wolfram S. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *Int J Obesity* 2005; 29: 615-623.
- Kletsas D, Caselgrandi E, Barbieri D, Stathakos D, Franceschil C, Ottavini E. Neutral endopeptidase-24.11 (NEP) activity in human fibroblasts during development and aging. *Mech Ageing Dev* 1998; 102: 15-23.
- Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Amer J clini Nutri* 2002; 76: 560-568.
- Ko WC, Shih CM, Lai YH, Chen JH, Huang HL. Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isoenzymes from guinea pig and their structure activity relationships. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 2087-2094.
- Kolsch H, Jessen F, Freymann N, Kreis M, Hentschel F, Maier W, Heun R. ACE I/D polymorphism is a risk factor of Alzheimer's disease but not of vascular dementia. *Neurosci Lett* 2005; 377: 37-39.
- Konkoy CS and Davis TP. Ectoenzymes as sites of peptide regulation. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 17: 288-294.
- Kramar EA, Harding JW, Wright JW. Angiotensin II- and IV-induced changes in cerebral blood flow. Roles of AT1, AT2, and AT4 receptor subtypes. *Reg Pep* 1997; 68: 131-138.
- Kruman I, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen W, Cutler RG, Kruman Y, Haughey N, Lee J, Evans M, Mattson MP. Folic Acid Deficiency and Homocysteine Impair DNARepair in Hippocampal Neurons and Sensitize them to Amyloid Toxicity in Experimental Models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2002; 22: 1752-1762.

- Kufe DW and Major PP. Studies on the mechanism of action of cytosine arabinoside. *Med Pediatr Oncol* 1982; 1: 49-67.
- Kuppusamy UR and Das NP. Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 1307-1315.
- Kushwaha Rs, Foster DM, Barrett RHR, Carey KD, Bemard MG. Metabolic regulation of plasma apolipoprotein E by estrogen and progesterone in the baboon. *Metabolism* 1991; 40: 93-100.
- Labarca C and Paigen K. A simple, rapid and sensitive DNA assays procedure. *Analyt Biochem* 1980; 102: 344-352.
- Latasá MJ, Belandia B, Pascual A. Thyroid hormones regulate β -amyloid gene splicing and protein secretion in neuroblastoma cells. *Endocrinology* 1998; 139: 2692–2698.
- Latchman DS: Herpes Simplex virus and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* 1997; 349: 1101.
- Le Bars P, Kats MM, Nancy B, Itil TM, Freedman AM, Schatzberg AF. A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of Ginkgo biloba for dementia. *J Am Med Associ* 1997; 278: 1327-1332.
- Ledesma MD, Da Silva JS, Crassaerts K, Delacourte A, De Strooper B, Dotti CG. Brain plasmin enhances APP- α cleavage and A β degradation and is reduced in Alzheimer's disease brains. *EMBO* 2000; 1: 530-535.
- Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1025-1032.
- Lehmann DJ, Cortina-Borja M, Warden DR, Smith AD, Sleegers K, Prince JA, Van Duijn CM, Kehoe PG. Large Meta-Analysis Establishes the ACE Insertion-Deletion Polymorphism as a Marker of Alzheimer's Disease. *Am J Epidemiol* 2005; 162: 305-317.
- Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X, Frosch MP, Selkoe DJ. Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 2003; 40: 1087-1093.
- Lendon CL, Thaker U, Harris JM, McDonagh AM, Lambert JC, Chartier-Harlin MC, Iwatsubo T, Pickering-Brown SM, Mann DM. The angiotensin 1-converting enzyme insertion (I)/deletion (D) polymorphism does not influence the extent of amyloid or tau pathology in patients with sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2002; 328: 314–318.

- Letarte M, Vera S, Tran R, Addis JB, Onizuka RJ, Quackenbush EJ, Jongeneel CV, McInnes RR. Common acute lymphocytic leukaemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med* 1988; 168: 1247-1253.
- Letenneur L, Launer LJ, Andersen K, Dewey ME, Ott A, Copeland JR, Dartigues JF, Kragh-Sorensen P, Baldereschi M, Brayne C, Lobo A, Martinez-Lage JM, Stijnen T, Hofman A. Education and the risk for Alzheimer's disease: sex makes a difference. EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group. *J Epidemiol* 2000; 151: 1064-1071.
- Li C, Booze RM, Hersh LB. Tissue-specific expression of rat neutral endopeptidase (neprilysin) mRNAs. *J Biol Chem* 1995; 270: 5723-5728.
- Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer's transgenic mouse. *J Neurosci* 2001; 21: 8370-8377.
- Linert W, Bridge MH, Huber M, Bjugstad KB, Grossman S, Arendash GW. In vitro and in vivo studies investigating possible antioxidant actions of nicotine: relevance to Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1454: 143-152.
- Lohmann A, Dingler E, Sommer W, Schaffer K, Wober W, Schmidt W. Bioavailability of vinpocetine and interference of the time of application with food intake. *Arzneimittelforschung* 1992; 42: 914-917.
- Malfroy B, Kuang WJ, Seeburg PH, Mason AJ, Schofield PR. Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *FEBS Lett* 1988; 229: 206-210.
- Malfroy B, Schonfield PR, Kuang WJ, Seeburg PH, Mason AJ, Henzel WJ. Molecular cloning and amino acid sequence of rat enkephalinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 144: 59-66.
- Manach C, Regerat F, Texier O, Agullo G, Demigne C, Remesy C. Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutri Res* 1996; 16: 517-544.
- Mari B, Guerin S, Maulon L, Belhacene N, Farahi Far D, Imbert V, Rossi B, Peyron JF, Auburger P. Endopeptidase 24.11 (CD10/NEP) is required for phorbol ester-induced growth arrest in Jurkat T cells. *FASEB J* 1997; 11: 869-879.
- Mark F. Bera, Barry W. Connors, Michael A. Paradiso. *Neuroscience: Exploring the Brain*. 2nd edition, 2001: 150-153.
- Marr RA, Guan H, Rockenstein E, Kindy M, Gage FH, Verma I, Masliah E, Hersh LB. Neprilysin regulates amyloid Beta peptide levels. *J Mol Neurosci* 2004; 22: 5-11.

- Marr RA, Rockenstein E, Mukherjee A, Kindy MS, Hersh LB, Gage FH, Verma IM, Masliah E. Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. *J Neurosci* 2003; 23: 1992-1996.
- McDonald JK. Exopeptidases, Mammalian Proteases. Academic Press, London 1986.
- McKenna DJ, Jones K, Hughes K. Efficacy, safety, and use of ginkgo biloba in clinical and preclinical applications. *Altern Ther Health Med* 2001; 7: 70-86, 88-90.
- Melzig MF and Escher F. Induction of neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme activity of SK-N-SH cells in vitro by quercetin and resveratrol. *Pharmazie* 2002; 57: 556-558.
- Melzig MF and Janka M. Enhancement of neutral endopeptidase activity in SK-N-SH cells by green tea extract. *Phytomedicine* 2003; 10: 494-498.
- Menon LG, Kuttan R, Kuttan G. Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. *Cancer Lett* 1995; 95: 221-225.
- Mera SL. Aluminium, amyloid, and Alzheimer's disease. *Med Lab Sci* 1991;48:283-295.
- Metz G. Wein und Olivenöl sind ein potentes Duo. *Pharm Ztg* 2000; 145: 2779-2784.
- Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfrieger FW, Barres BA. Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* 1995; 15: 805-819.
- Mishra GD, Malik NS, Paul AA, Wadsworth ME, Bolton-Smith C. Childhood and adult dietary Vitamin E intake and cardiovascular risk factors in mid-life in the 1946 British Cohort. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 1418-1425.
- Miskolczi P, Korma K, Polgar M, Vereczkey L. Pharmacokinetics of vinpocetine and its main metabolite apovincaminic acid before and after the chronic oral administration of vinpocetine to humans. *Europ J Drug Meta Pharmacok* 1990; 15: 1-5.
- Mitchell T, Sariban E, Kufe D. Effects of 1- β -n-arabinofuranosylcytosine on proto-oncogene expression in human U-937 cells. *Mol Pharmacol* 1986; 30: 398-402.
- Miyamoto M, Murphy TH, Schnaar RL, Coyle JT. Antioxidants protect against glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *J Pharmacol Experim Therap* 1989; 250: 1132-1140.
- Mizutani S, Safwat MA, Goto K, Tsujimoto M, Nakazato H, Itakura A, Mizuno M, Kurauchi O, Kikkawa F, Tomoda Y. Initiating and responsible enzyme of arginine vasopressin degradation in human placenta and pregnancy serum. *Regul Pept* 1995; 59: 371-378.

- Mohajeri MH, Kuehnle K, Li H, Poirier R, Tracy J, Nitsch RM. Anti-amyloid activity of neprilysin in plaque-bearing mouse models of Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 2004; 562: 16-21.
- Molsa PK, Marttila RJ, Rinne UK. Epidemiology of Dementia in a Finnish population. *Acta Neurol Scand* 1982; 65: 541-552.
- Monti B, Berteotti C, Contestabile A. Subchronic rolipram delivery activates hippocampal CREB and arc, enhances retention and slows down extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31: 278-286.
- Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Aggarwal N, Wilson RS, Scherr PA. Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. *JAMA* 2002; 287: 3230-3237.
- Mortimer JA. Genetic and environmental risk factors for Alzheimer's disease: key questions and new approaches. In: Mortimer JA, Altman HJ, Altomar BN (eds) *Alzheimer's and Parkinson Diseases*. Plenum Press, New York, 1989, S. 85-100.
- Munch G, Apelt J, Rosemarie-Kientsch, Stahl P, Luth HJ, Schliebs R. Advanced glycation endproducts and pro-inflammatory cytokines in transgenic Tg2576 mice with amyloid plaques pathology. *J Neurochem* 2003; 86: 283-289.
- Munch G, Thome J, Toley P, Schinzel R, Riederer P. Advanced glycation endproducts in aging and Alzheimer's disease. *Brain Res* 1997; 23: 134-143.
- Nakagawa K, Okuda S, Miyazawa T. Dose-dependent incorporation of tea catechins, (-)-epigallocatechin-3-gallate and (-)-epigallocatechin, into human plasma. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; 61: 1981-1985.
- Nijjar MS and Nijjar SS. Domoic acid-induced neurodegeneration resulting in memory loss is mediated by Ca²⁺ overload and inhibition of Ca²⁺ calmodulin-stimulated adenylate cyclase in rat brain. *Int J Mol Med* 2000; 6: 377-389.
- O'Neill C, Wiehager B, Fowler CJ, Ravid R, Winblad B, Cowburn RF. Regionally selective alterations in G protein subunit levels in the Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 1994; 636: 193-201.
- Oda M, Morino H, Maruyama H, Terasawa H, Izumi Y, Torii T, Sasaki K, Nakamura S, Kawakami H. Dinucleotide repeat polymorphisms in the neprilysin gene are not associated with sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2002; 320: 105-107.
- Okello EJ, Savelev SU, Perry EK. In vitro anti-beta secretase and dual anti-cholinesterase activities of *Camellia sinensis* L. (tea) relevant to treatment of dementia. *Phytother Res* 2004; 18: 624-627.

- Okuda T, Kimura Y, Yoshida T, Hatano T, Okuda H, Arichi S. Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. *Chem Pharm Bull* 1983; 31: 1625-1631.
- Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J Neurosci Res* 2004; 75: 742-750.
- Osada K, Takahashi M, Hoshina S, Nakamura M, Nakamura S, Sugano M. Tea catechins inhibit cholesterol oxidation accompanying oxidation of low density lipoprotein in vitro. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001; 128: 153-164.
- Oyama Y, Chikashia L, Ueha T, Kanamaru K, Noda K. Ginkgo biloba extract protects brain neurons against oxidative stress induced by hydrogenperoxide. *Brain Res* 1996; 712: 349-352.
- Papandreou CN, Usmani B, Geng Y, Bogenrieder T, Freeman R, Wilk S, Finstad CL, Reuter VE, Powell CT, Scheinberg D, Magill C, Scher HI, Albino AP, Nanus DM. Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nat Med* 1998; 4: 50-57.
- Paradossi-Piquard, Petit A, Kawarai T, Sunyach C, Alves da Costa C, Vincent B, Ring S, D'Adamio L, Shen J, Muller U, St George Hyslop P, Checler F. Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 2005; 46: 541-554.
- Parajua-Pozo JL and Casis-Arguea S. Dow's Syndrome and Dementia. *Rev Neurol*. 2000; 31: 126-128.
- Park SY and Kim DS. Discovery of natural products from *Curcuma longa* that protect cells from beta-amyloid insult: a drug discovery effort against Alzheimer's disease. *J Nat Prod* 2002; 65: 1227-1231.
- Parnetti L, Senin U, Mecocci P. Cognitive enhancement Therapy for Alzheimer's disease. The way forward. *Drugs* 1997; 53: 752-768.
- Parvathenani LK, Calandra V, Roberts SB, Posmantur R. cAMP delays beta-amyloid (25-35) induced cell death in rat cortical neurons. *Neuroreport* 2000; 11: 2293-2297.
- Passer B, Pellegrini L, Russo C, Siegel RM, Lenardio MJ, Schettini G, Bachmann M, Tabaton M, D'Adamio L. Generation of an apoptotic intracellular peptide by gamma-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid beta protein precursor. *J Alzheimers Dis* 2000; 2: 289-301.
- Patil CS, Singh VP, Satyanarayan PS, Jain NK, Singh A, Kulkarni SK. Protective effect of flavonoids against aging- and lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in mice. *Pharmacology* 2003; 69: 59-67.

- Pearse DD, Pereira FC, Marcillo AE, Bates ML, Berrocal YA, Filbin MT, Bunge MB. cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *Nat Med* 2004; 10: 610-616.
- Pendurthi UR and Rao LV. Suppression of transcription factor Egr-1 by curcumin. *Thromb Res* 2000; 97: 179-189.
- Pendurthi UR, Williams JT, Rao LV. Inhibition of tissue factor gene activation in cultured endothelial cells by curcumin. Suppression of activation of transcription factors Egr-1, AP-1, and NF-kappa B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 3406-3413.
- Phinney AL, Drisaldi B, Schmidt SD, Lugowski S, Coronado V, Liang Y, Horne P, Yang J, Sekoulidis J, Coomaraswamy J, Chishti MA, Cox DW, Mathews PM, Nixon RA, Carlson GA, St George-Hyslop P, Westaway D. In vivo reduction of amyloid-beta is promoted by amutant copper transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 14193-14198.
- Pietta P, Gardana C, Mauri PL. Identification of Gingko biloba flavonol metabolites after oral administration to humans. *J Chrom* 1997; 693: 249-255.
- Plagemann PG, Martz R, Wohlueter RM. Transport and metabolism of deoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine into cultured Novikoff rat hepatoma cells, relationship to phosphorylation, and regulation of triphosphate synthesis. *Cancer Res* 1978; 38: 978-989.
- Polgar M, Vereczkey I, Nyary I. Pharmacokinetics of vinpocetine and its metabolite, apovincaminic acid, in plasma and cerebrospinal fluid after intravenous infusion. *J Pharm Biomed Analy* 1985; 3: 131-139.
- Price JM, Hellermann A, Hellermann G, Sutton ET. Aging enhances vascular dysfunction induced by the Alzheimer's peptide beta-Amyloid. *Neurol Res* 2004; 26: 305-311.
- Qiu WQ, Borth W, Ye Z, Haass C, Teplow DB, Selkoe DJ. Degradation of Amyloid- β -Protein by a serine protease- α -Macroglobulin Complex. *J Biol Chem* 1996; 271: 8443-8451.
- Quadri P, Fragiaco C, Pezzati R, Zanda E, Forloni G, Tettamanti M, Lucca U. Homocysteine, folate and vitamin B-12 in mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular dementia. *J Clin Nutr* Jul 2004; 80: 114-122.
- Rago R, Mitchen J, Wilding G. DNA Fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoechst 33258 after cell lysis by freezing in distilled water. *Analyt Biochem* 1990; 191: 31-34.
- Rall TW. Central nervous system stimulants. The xanthines. In: A. Goodman-Gilman, L.S. Goodman and A. Gilman. (6th Eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, MacMillan, New York 1980 S. 592-607.

- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Neurodegenerative disorders. In: Rang HP. Pharmacology. 5th edition. Edinburgh: Churchill. Livingstone 2003: 490-502.
- Rawlings ND and Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *J Biochem* 1993; 290: 205-218.
- Rebeck GW. Cholesterol efflux as a critical component of Alzheimer's disease pathogenesis. *J Mol Neurosci* 2004; 23: 219-224.
- Reilly CE. Neprilysin content is reduced in Alzheimer brain areas. *J Neurol* 2001; 248: 159-160.
- Reisberg B, Doody R, Stoffler A, Schmitt F, Ferris S, Mobius HJ. Memantine in moderate to severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2003; 348: 1333-1341.
- Reisberg B. In: Alzheimer's Disease, Hrsg. B. Reisberg, New York (1983): 3.
- Reitz C, Tang MX, Luchsinger J, Mayeux R. Relation of plasma lipids to Alzheimer's disease and vascular dementia. *Arch Neurol* 2004; 6: 705-714.
- Riemersma RA, Rice-Evans CA, Tyrell RM, Clifford MN, Lean ME: Tea flavonoids and cardiovascular health. *QJM* 2001; 94: 277-282.
- Roberts GW, Gentelman SM, Lynch A, Graham DI. Beta A4-Amyloid precursor protein deposition in brain after head trauma. *Lancet* 1991; 338: 1422-1423.
- Roberts GW, Gentelman SM, Lynch A, Landon M, Graham DI. Beta amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 419-425.
- Robl JA, Sun CQ, Stevenson J, Ryono DE, Simpkins LM, Cimarusti MP, Dejneka T, Slusarchyk WA, Chao S, Stratton L, Misra RN, Bednarz MS, Asaad MM, Cheung HS, Abboa-Offei BE, Smith PL, Mathers PD, Fox M, Schaeffer TR, Seymour AA, Trippodo NC. Dual metallopeptidase inhibitors: mercaptoacetyl-based heterocyclic dipeptide mimetics as inhibitors of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase. *J Med Chem* 1997; 40: 1570-1577.
- Roques BP and Beaumont A. natural endopeptidase-24.11 inhibitors : from analgesics to antihypertensives? *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 245-249.
- Roques BP, Fournie-Zaluski MC, Soroca E, Lacomte JM, Malfroy B, Liorens C, Schwartz JC. The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antioiceptive activity in mice. *Nature* 1980; 288: 286-288.
- Rondeau V, Iron A, Letenneur L, Commenges D, Duchene F, Arveiler B, Dartiques JF. Analysis of the effect of aluminum in drinking water and transferrin C2 allele on Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 2006; 13: 1022-1025.

- Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang SM, Suemoto T, Higuchi M, Saido TC. Somatostatin regulates brain amyloid beta peptide Abeta42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med* 2005; 11: 434-439.
- Sampaolo S, Campos-Brrros A, Mazziotti G, Carlomagno S, Sannino V, Amato G, Carella C, Di Ioris G. Increased cerebrospinal fluid levels of 3,3',5'-triiodoL-tryptophan in patients with Alzheimer's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 198-202.
- Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS, Thal LJ. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med* 1997; 336: 1216-1222.
- Saria A, Hauser KF, Traurig HH, Turbek CS, Hersh L, Gerard C. Opioid-related changes in nociceptive threshold and in tissue levels of enkephalins after target disruption of the gene for neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in mice. *Neurosci Lett* 1997; 234: 27-30.
- Savaskan E, Hock C, Olivieri G, Bruttel S, Rosenberg C, Hulette C, Muller-Spahn F. Cortical alterations of angiotensin converting enzyme, angiotensin II and AT1 receptor in Alzheimer's dementia. *Neurobiol. Aging* 2001; 22: 541-546.
- Schellenberger A. (Hrsg) : *Enzymkatalyse*. 1.Auf., Fischer, Jena (1989) S. 219,242-252.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yendock T, Games D, Seubert P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer's disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999; 400: 173-177.
- Scheuermann S, Hamsch B, Hesse L, Stumm J, Schmidt C, Behr D, Bayer TA, Beyreuther K, Multhaup G. Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 2001; 276: 33923-33929.
- Schindowski K, Lentner S, Kressmann S, Eckert A, Müller WE. Age related increase of oxidative stress-induced apoptosis in mice Prevention by Ginkgo biloba extracts (EGb761®). *J Neural Transm* 2001; 108: 969-978.
- Schmitt-Schillig S, Schaffer S, Weber CC, Eckert GP, Muller WE. Flavonoids and the aging brain. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56: 23-36.
- Schulte PA and Burnett CA. EMFs and Alzheimer's disease. *Neurology* 1997; 49: 312-313.

- Scott LJ, Goa KL. Galantamine: A review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs* 2000; 60: 1095-1122.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiol Rev* 2001a; 81: 741-766.
- Selkoe DJ. Amyloid-beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1996; 271: 18295-18298.
- Selkoe DJ. Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* 2001b; 32: 177-180.
- Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. Plasma Homocysteine as a risk factor for Dementia and Alzheimer's disease. *N Eng J Med* 2002; 346: 476-483.
- Shimizu M, Wada S, Hayashi T, Arisawa M, Ikegaya K, Ogaku S, Yano S, Morita N. Green tea lowers the blood sugar level. *Yakugaku Zasshi* 1988; 108: 964-970.
- Shipp MA, Stefano GB, Switzer SN, Griffin JD, Reinherz EL. CD10 (CALLA)/neutral endopeptidase-24.11 modulates inflammatory peptide-induced changes in neutrophil morphology, migration and adhesion proteins and is itself regulated by neutrophil activation. *Blood* 1991a; 78: 1834-1841.
- Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, Switzer SN, Hersh LB, Stein H, Sunday ME, Reinherz EL. CD10/neutral endopeptidase-24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small-cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991b; 88: 10662-10666.
- Shiratori K, Tsubuki S, Iwata N, Takaki Y, Harigaya W, Maruyama K, Kiryu-Seo S, Kiyama H, Iwata H, Tomita T, Iwatsubo T, Saido TC. Neprilysin degrades both amyloid β peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan and phosphoramidon sensitive endopeptidases. *J Biol Chem*. 2001; 276: 21895-21901.
- Sigle JP, Zander J, Ehret A, Honegger J, Jackisch R, Feuerstein TJ. High potassium- induced activation of cholin- acetyltransferase in human neocortex: implications and species differences. *Brain Res Bull* 2003; 60: 255-262.
- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 1998; 21: 127-148.
- Simons A, Ruppert T, Schmidt C, Schlicksupp A, Pipkorn R, Reed J, Masters CL, White AR, Cappai R, Beyreuther K, Bayer TA, Multhaup G. Evidence for a copper binding superfamily of the amyloid precursor protein. *Biochemistry* 2002; 41: 9310-9320.
- Sinha S and Lieberburg I. Cellular mechanisms of beta-Amyloid production and secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 11049-11053.
- Sitges M and Nekrassov V. Vinpocetine selectively inhibits neurotransmitter release triggered by sodium channel activation. *Neurochemi Res* 1999; 24: 1585-1591.

- Skoog I, Wallin A, Fredman P. A population study on blood-brain barrier function in 85-year-olds: relation to Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurology* 1998; 50: 966-971.
- Sleegers K, Den Heijer T, van Dijk EJ, Hofman A, Bertoli-Avella AM, Koudstaal PJ, Breteler MM, Van Duijn CM. ACE gene is associated with Alzheimer's disease and atrophy of hippocampus and amygdala. *Neurobiol Aging* 2005; 26: 1153-1159.
- Snaedal J, Johannesson T, Jonsson JE, Gylfadottir G. The effect of nicotine in dermal plaster on cognitive functions in patients with Alzheimer's disease. *Dementia* 1996; 7: 47-52.
- Sodeyama N, Mizusawa H, Yamada M, Itoh Y, Otomo E, Matsushita M. Lack of association of neprilysin polymorphism with Alzheimer's disease and Alzheimer's disease-type neuropathological changes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 71: 817-818.
- Soleilhac JM, Lafuma C, Porcher JM, Auburtin G, Roques BP. Characterization of soluble form of neutral endopeptidase-24.11 (EC 3.4.24.11) in human serum: enhancement of its activity in serum of underground miners exposed to coal dust particles. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 1011-1017.
- Souness JE, Aldous D, Sargent C. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors. *Immunopharmacology* 2000; 47: 127-162.
- Sparks DL, Friedland R, Petanceska S, Scheurs BG, Shi J, Perry G, Smith MA, Sharma A, Derosa S, Ziolkowski C, Stankovic G. Trace Copper Levels in the Drinking Water, but not Zinc or Aluminum Influence CNS Alzheimer-Like Pathology. *J Nutr Health Aging* 2006; 10: 247-254.
- Starke K. Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U et al. (Hrsg) *Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie* 2001; 8: 111-146.
- Stolc S. Indole derivatives as neuroprotectants. *Life Sci* 1999; 65: 1943-1950.
- Strausak D, Mercer JF, Dieter HH W, Multhaup G. Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Res Bull* 2001; 55: 175-185.
- Suh YH and Checler F. Amyloid precursor Protein, Presenilins, and α -synuclein: Molecular pathogenesis and pharmacological Applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 469-525.
- Sumitomo M, Shen R, Goldberg JS, Dai J, Navarro D, Nanus DM. Neutral endopeptidase promotes phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells by inhibiting neuropeptide-induced protein kinase C delta degradation. *Cancer Res* 2000; 60: 6590-6596.
- Szatmari SZ, Whitehouse PJ. Vinpocetine for cognitive impairment and dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 1: CD003119.

- Szekely CA, Thorne JE, Zandi PP, EK M, Messias E, Breitner JC, Goodman SN. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of alzheimer's disease: asystemic review. *Neuroepidemiology* 2004; 23: 159-169.
- Takeda K, Minowada J, Block A. Kinetics of appearance of differentiation-associated characteristics in ML-1, a line of human myeloblastic leukemia cells, after treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, dimethyl sulfoxide, or 1-beta-n-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* 1982; 42: 5152-5158.
- Tam LT, Engelbrecht S, Talent JM, Gracy RW, Erdos EG. The importance of disulfide bridges in human endopeptidase (enkephalinase) after proteolytic cleavage, *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 133: 1187-1192.
- Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 1996; 34:429-432.
- Tarasiuk VK, Timko NA, Guba GP. The use of deoxypeganin hydrochloride in the combined treatment of patients with diseases of the peripheral nervous system. *Vrach Delo* 1989; 3: 92-93.
- Teuscher E. *Biogene Arzneimittel*. 5. überarb. Und erw. aufl., Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart (1997) S. 391.
- Thienhaus OJ, Wheeler BG, Simon S, Zemlan FP, Hartford JT. A controlled double-blind study of high-dose dihydroergotamine mesylate (Hydergine) in mild dementia. *J Am Geriatr Soc* 1987; 35: 219-223.
- Thong FS, Derave W, Kiens B, Graham TE, Urso B, Wojtaszewski JF, Hansen BF, Richter EA. Caffeine-induced impairment of insulin action but not insulin signaling in human skeletal muscle is reduced by exercise. *Diabetes* 2002; 51: 83-590.
- Trippodo NC, Robl JA, Asaad MM, Fox M, Panchal BC, Schaeffer TRD. Effects of omapatrilat in low, normal, and high renin experimental hypertension. *Am J Hypertens* 1998; 11: 363-372.
- Troade JD, Marien M, Mourlevat S, Debeir T, Ruberg M, Colpaert F, Michel PP. Activation of the mitogen-activated protein kinase (ERK(1/2)) signaling pathway by cyclic AMP potentiates the neuroprotective effect of the neurotransmitter noradrenaline on dopaminergic neurons. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 1043–1052.
- Tucker HM, Kihiko-Ehmann M, and Estus S. Urokinase-type Plasminogen inhibits amyloid beta neurotoxicity and fibrillogenesis via plasminogen. *J Neurosci Res* 2002; 70: 249-255.
- Turner AJ, Isaac RE, Coates D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bio Essays* 2001; 23: 261-269.

- Turner AJ. Exploring the structure and function of zinc metalloendopeptidases: old enzymes and new discoveries. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 723-727.
- Uehara C, Ino K, Suzuki T, Kajiyama H, Kikkawa F, Nagasaka T, Mizutani S. Up regulation of neutral endopeptidase expression and enzymatic activity during the differentiation of human choriocarcinoma cells. *Placenta* 2001; 22: 540-549.
- Vitolo OV, Sant'Angelo A, Costanzo V, Battaglia F, Arancio O, Shelanski M. Amyloid beta-peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: reversibility by drugs that enhance cAMP signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13217-13221.
- Vlahovic P and Stefanovic V.: Kidney ectopeptidases – structure, function and clinical significance. *Path Biol* 46 (1998), S. 779-786.
- Vovin RIA, Fakturovich AIA, Golenkov AV, Lukin VO. Correction of apathetic-abulic manifestations of schizophrenia with cholinotropic drugs. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 1991; 91: 111-115.
- Wallace WC, Akar CA, Lyons WE, Kole HK, Egan JM and Wolozin B. Amyloid precursor protein requires the insulin signalling pathway for neurotrophic activity. *Mol Brain Res* 1997; 52: 213-227.
- Wan Kim S, Wan Kim J, Chul Choi K, Kwon Ma S, Oh Y, Jung JY, Kim J, Lee J. Indomethacin enhances shuttling of aquaporin-2 despite decreased abundance in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2998-3005.
- Wang CN, Chi CW, Lin YL, Chen CF, Shiao YJ. The neuroprotective effects of phytoestrogens on the amyloid beta protein-induced toxicity are mediated by abrogating the activation of caspase cascade in rat cortical neurons. *J Biol Chem* 2001; 276: 5287-5295.
- Wang H, Ferguson GD, Pineda VV, Cundiff PE, Storm DR. Overexpression of type-1 adenylyl cyclase in mouse forebrain enhances recognition memory and LTP. *Nat Neurosci* 2004; 7: 635–642.
- Weisburger JH. Tea and health: The underlying mechanisms. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 220: 271-275.
- Wiley MD, Jones SP, Sawyer WH, Paterson ARP. Cytosine arabinoside influx and nucleoside transport sites in acute leukemia. *J Clin Invest* 1982; 69: 479-489.
- Willcox JK, Ashe SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004; 44: 275-295.
- Wilson RS, u-a.: Proneness to Psychological distress is associated with risk of Alzheimer's disease. *Neurology* 2003; 61: 1479-1485.

- Wolozin B, Lesch P, Lebovics R, Sunderland T. Olfactory neuroblasts from Alzheimer donors: studies on APP processing and cell regulation. *Biol Psychiatry* 1993; 34: 824-838.
- Wolozin B. A fluid connection: cholesterol and Abeta. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 5371-5373.
- Wong-Leung YL and Kenny AJ. Some properties of a microsomal peptidase in rat kidney. *Biochem J* 1968; 110: 5P.
- Xu H, Gouras GK, Greenfield JP, Vincent B, Naslund J, Mazzarelli L, Fried G, Jovanovic JN, Seeger M, Relkin NR, Liao F, Checler F, Buxbaum JD, Chait BT, Thinakaran G, Sisodia SS, Wang R, Greengard P, Gandy S. Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer's B-amyloid peptides. *Natl Med* 1998; 4: 447-451.
- Yamaguchi T, Fukase M, Arao M, Sugimoto T, Chihara K. Endothelin 1 hydrolysis by rat kidney membranes. *FEBS Lett* 1992; 309: 303-306.
- Yamamoto M, Gotz ME, Ozawa H, Luckhaus C, Saito T, Rosler M, Riederer P. Hippocampal level of neural specific adenylyl cyclase type I is decreased in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1535: 60-68.
- Yamamoto T. *Chemistry and Applications of Green Tea*. CRC Press, Boca Raton, 1997.
- Yamamoto-Sasaki M, Ozawa H, Saito T, Rosler M, Riederer P. Impaired phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the hippocampus of dementia of the Alzheimer type. *Brain Res* 1999; 824: 300-303.
- Yamin R, Malgeri EG, Sloane JA, McGraw WT, Abraham CR. Metallopeptidase EC 3.4.24.15 is necessary for Alzheimer Amyloid- β -Peptide Degradation. *J Biol Chem* 1999; 274: 18777-18784.
- Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, Chen PP, Kaye R, Glabe CG, Frautschy SA, Cole GM. Curcumin inhibits formation of Abeta oligomers and fibrils and binds plaques and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem* 2004; as Manuscript M404751200.
- Yao ZX, Han Z, Drieu K, Papadopoulos V. Ginkgo biloba extract (Egb 761) inhibits beta-amyloid production by lowering free cholesterol levels. *J Nutr Biochem* 2004; 15: 749-756.
- Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL. Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci Lett* 2001b; 297: 97-100.

- Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL. Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain. *Brain Res* 2001a; 919: 115-121.
- Yen SH, Liu WK, Hall FL, Yan SD, Stern D, Dickson DW. Alzheimer neurofibrillary lesions: Molecular nature and potential roles of different components. *Neurobiol Aging* 1995; 16: 381-387.
- Yesavage JA, Hollister LE, Burian E. Dihydroergotoxine: 6-mg versus 3-mg dosage in the treatment of senile dementia. Preliminary report. *J Am Geriatr Soc* 1979; 27: 80-82.
- Yoshimasu F, Kokmen E, Hay ID, Beard CM, Offord KP, Kurland LT. The association between Alzheimer's disease and thyroid disease in Rochester, Minnesota. *Neurology* 1991; 41: 1745-1747.
- Younge JD and Jarvis SM. Nucleoside transport in animal cells. *Biosci Rep* 1983; 3: 309-322.
- Zhou LJ, Song W, Zhu XZ, Chen ZL, Yin ML, Cheng XF. Protective effect of bilobalide on amyloid beta-peptide 25-35 induced PC12 cell cytotoxicity. *Acta Pharmacol Sin* 2000; 21: 75-79.
- Zhu L, Wu J, Liao H, Gao J, Zhao XN, Zhang ZX. Antagonistic effects of extract from leaves of Ginkgo biloba on glutamate neurotoxicity. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1997; 18: 344-347.
- Zou J and Crews F. CREB and NF-kappaB Transcription Factors Regulate Sensitivity to Excitotoxic and Oxidative Stress Induced Neuronal Cell Death. *Cell Mol Neurobiol* 2006 [Epub ahead of print].

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

Ayoub S, Melzig MF. Induction of neutral endopeptidase (NEP) activity of SK-N-SH cells by natural compounds from green tea. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2006; 58: 495-501.

Ayoub S, Melzig MF. Induction effects of apigenin, luteolin and vinpocetin on neutral endopeptidase (NEP) and angiotensin-converting enzyme activity (ACE) of SK-N-SH cells. *Natural Product Communications* 2006 (in Press).

Ayoub S, Melzig MF. Influence of selected natural products on NEP activity and beta-Amyloid production in SK-N-SH cells. *Pharmaceutical Biology* 2006 (submitted).

Poster and Abstracts

S. Ayoub, M.F. Melzig: Induction of neutral endopeptidase (NEP) activity of SK-N-SH cells by natural products: International Congress and 53rd Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research (GA), Florence 2005, August 21-25, Poster P 109.

S. Ayoub, M.F. Melzig: Degradation of Amyloid β -peptide (A β) by NEP-induction is increased by selected natural products: International Congress and 54th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research (GA), Helsinki 2006, August 30-September 2, Poster P 109;

Doktorandentagung der DPhG/ Landesgruppe Berlin 2006, Juli 14.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Matthias F. Melzig für die Überlassung des interessanten Themas, für seine intensive wissenschaftliche Beratung und ständige rückhaltlose Förderung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke ihm für die vielen anregenden Gespräche, zu Themen der Dissertation und darüber hinaus zu Wissenschaft und Alltag.

Herrn Professor Dr. H. H. Borchert gilt mein Dank für seine Bereitschaft, als Gutachter zu agieren.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Biologie für die freundliche Zusammenarbeit bei der wissenschaftlichen Arbeit und ihre Hilfsbereitschaft. Besonders hervorheben möchte ich hierbei Frau Dr. B. Rennert für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und die vielen anregenden Gespräche. Weiterhin möchte ich Frau U. Friedrich für die Einarbeitung im Zelllabor danken.

Bei Frau Dr. J. Lazar-Schurreit bedanke ich mich für ihre besondere Unterstützung, für das gute Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft.

Frau PD. Dr. K. Jennet-Siems, Frau M. Meyer, Herrn Professor Dr. H. Pertz und Herrn Dr. M. Kaloga danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung.

Meinen besten Freunden und Freundinnen, Rainer und seiner Frau Jurgita Ziffels, Joe Negimman und seiner Frau Else, Rainer Mautz und seiner Frau Guang Chen, Frau H. Zayat und Frau A. Ammar danke ich für ihre redaktionelle Unterstützung, die einen wesentlichen Beitrag dazu geleistet haben, dass die Arbeit in ihrer heutigen Form vorliegt.

Meinen Eltern danke ich für die wertvolle Unterstützung während gesamter Zeit meiner Ausbildung, von der Schulzeit, über das Studium bis zur Promotion.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Mann für seine wertvolle Unterstützung und Motivation und seine Hilfe.

Ich möchte auch der Friedrich Ebert Stiftung für die finanzielle Unterstützung von 2004-2006 und hier besonders Frau M. Holona, Frau B. Nauroth, Frau N. Schneider, Herrn J. Minzenbach und Herrn A. Schlag herzlich danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ayoub
Vorname: Shereen
Geburtsdaten: 17.04.1978 in Gaza/ Palästina
Nationalität: Palästinensisch
Familienstand: verheiratet, eine Tochter

Akademische Ausbildung und berufliche Qualifikation

2004-2006 Promotion am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Biologie, Prof. Dr. M. F. Melzig

2004-2006 Stipendium der Friedrich-Ebert-Stiftung zur Promotion

07/ 2003 Deutsche Sprachprüfung für Hochschulzulassung

06/ 2003 – 09/ 2002 Erlernen der deutschen Sprache

08/ 2002 Ankunft in Deutschland

07/ 2002 – 09/ 2000

- Tätigkeit in der Apotheke des Krankenhauses El-Shefa, Gaza
- Arbeit in der Apotheke eines ambulanten Krankenhauses in Gazacity (Al Bander)

07/ 2000 – 09/ 1995 Aufnahme des Pharmaziestudiums an Alazhar Universität in Palästina, Gazastreifen, Gaza-City
Abschluss des Studiums mit dem „B.Sc. Degree in Pharmacy“
mit dem Gesamturteil „sehr gut“

07/ 1995 – 09/ 1983 Schule und Abitur in Gaza.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den

Shereen Ayoub