

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 Differenzierungsagens 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).

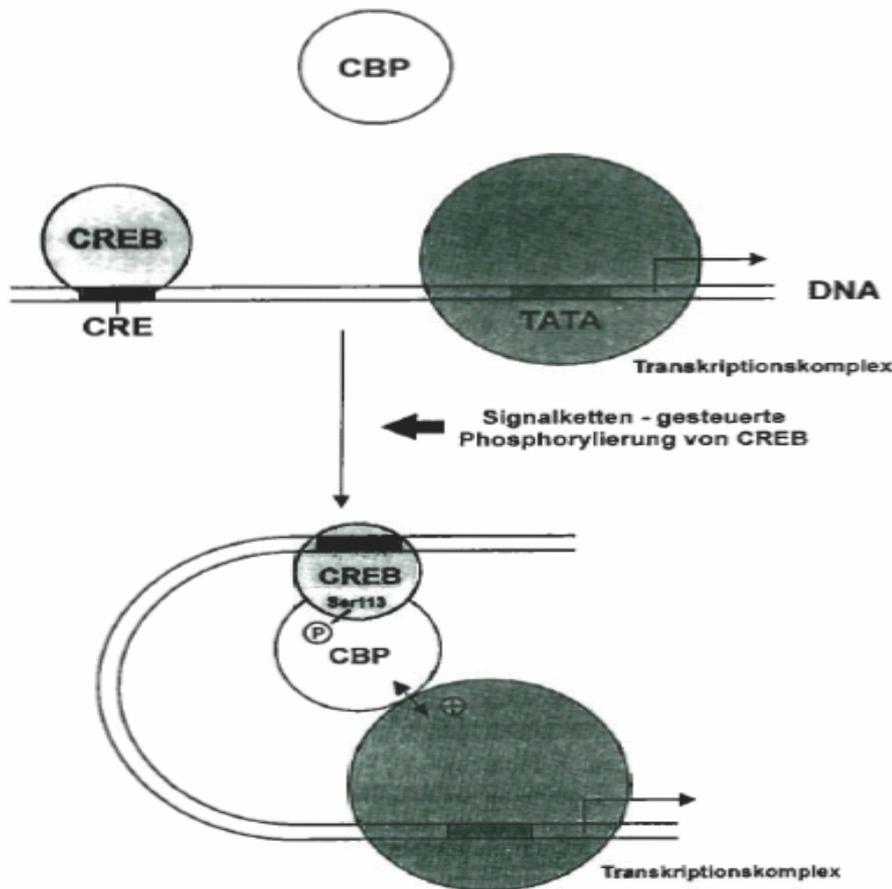


Abbildung 25: Regulation der Aktivität eines Transkriptionsfaktors durch Phosphorylierung (Gerhard Krauss 1997, S. 61).

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 gespaltet, 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 (Ajjori 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**).