

Aus dem  
**Zentrum für Molekulare Neurobiologie**  
**des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf**  
**Alzheimer-Forschungsgruppe**  
(ehem. Arbeitsgruppe Prof. Dr. R.M. Nitsch)  
Direktor: Prof. Dr. O. Pongs  
und der  
**Abteilung für Psychiatrische Forschung der Universität Zürich**  
Direktor: Prof. Dr. R.M. Nitsch

---

**Einfluss direkter Muskarinrezeptoragonisten auf die**  
**Acetylcholinesterase – Expression**  
  
*in-vitro-* und *in-vivo-* Untersuchungen

---

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

**Cüneyt Demiralay**

aus Hamburg

Hamburg, 2003

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 16. April 2004

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r: Prof. Dr. D. Naber

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. A. Gal

Prüfungsausschuss 3. Gutachter/in: Prof. Dr. R.M. Nitsch

in tiefer Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet

zum Gedenken an meinen Onkel

Kemal Demiralay

16.05.1957 - 27.10.2002

„ Man muss erst beginnen, sein Gedächtnis zu verlieren, und sei´s nur stückweise, um sich darüber klar zu werden, dass das Gedächtnis unser ganzes Leben ist.

Ein Leben ohne Gedächtnis wäre kein Leben...

Unser Gedächtnis ist unser Zusammenhalt, unser Grund, unser Handeln,  
unser Gefühl.

Ohne Gedächtnis sind wir nichts...“

Luis Buñuel

(„Mein letzter Seufzer“)

# INHALTSVERZEICHNIS

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>EINLEITUNG</b>  | <b>5</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Das cerebrale cholinerge System</b>   | <b>5</b>  |
| 1.1.1      | Anatomie des cerebralen cholinergen Systems  | 5         |
| 1.1.2      | Molekulare Grundlagen cholinergischer Neurotransmission  | 7         |
| 1.1.3      | Beteiligung des cerebralen cholinergen Systems bei Lernen und Gedächtnis   | 9         |
| <b>1.2</b> | <b>Die cholinerge Hypothese des Morbus Alzheimer</b>   | <b>10</b> |
| 1.2.1      | Neuropathologische Veränderungen beim M. Alzheimer   | 10        |
| 1.2.2      | Pathologische Veränderungen des cholinergen Systems beim M. Alzheimer  | 11        |
| 1.2.3      | Cholinerge Ersatztherapie  | 12        |
| <b>1.3</b> | <b>Regulation der AChE-Expression durch cholinerge Neurotransmission und deren Bedeutung für die cholinerge Ersatztherapie</b>                           | <b>14</b> |
| 1.3.1      | AChE-Expression  | 14        |
| 1.3.2      | Regulation der AChE-Expression durch cholinerge Neurotransmission : Evidenz für eine negative Rückkopplung durch muskarinrezeptorabhängige Genexpression | 16        |
| <b>1.4</b> | <b>Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit</b>  | <b>18</b> |
| <b>2</b>   | <b>ERGEBNISSE</b>  | <b>19</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Induktion der AChE-Expression in HEK293m1-Zellen durch direkte Muskarinrezeptoragonisten</b>  | <b>19</b> |
| 2.1.1      | Verifizierung der Rezeptoraktivität durch den „APP-release assay“ und Nachweis der Induktion egr1-Expression durch „Northern-Blotting“                   | 19        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.1.2      | Nachweis der AChE-Expression durch semiquantitative RT-PCR   | 21        |
| <b>2.2</b> | <b>Analyse der AChE-Expression in primären Neuronen nach muskarinenger Stimulation</b>   | <b>23</b> |
| 2.2.1      | Die „neuronal“ AChE-Isoform wird in primären Neuronen der Ratte basal exprimiert und bleibt von muskarinenger Stimulation unbeeinflusst                        | 23        |
| 2.2.2      | Die Isoform-unabhängige AChE-Detektion in primären Neuronen der Ratte zeigt eine basale AChE-Expression, die nach muskarinenger Stimulation unverändert bleibt | 23        |
| <b>2.3</b> | <b>Analyse der AChE-Expression nach muskarinenger Stimulation <i>in-vivo</i> durch <i>in-situ</i>-Hybridisierung</b>   | <b>27</b> |
| 2.3.1      | Induktion der <i>egr1</i> -Expression in Kortex und Hippokampus der Ratte  | 27        |
| 2.3.2      | Die basale AChE-Expression bleibt von muskarinenger Stimulation unbeeinflusst  | 29        |
| <b>2.4</b> | <b>Bestimmung der AChE-Aktivität im Liquor cerebrospinalis von Alzheimer-Patienten nach Behandlung mit dem Muskarinrezeptoragonisten Talsaclidin</b>           | <b>32</b> |
| <b>3</b>   | <b>DISKUSSION</b>  | <b>36</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Untersuchung der AChE-Expression im zellulären System</b>   | <b>36</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Expression von AChE im ZNS von Säugern unter dem Einfluss von Cholinomimetika</b>   | <b>39</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Einfluss von Cholinomimetika auf die AChE-Aktivität im Liquor cerebrospinalis vor dem Hintergrund der cholinergen Ersatztherapie des M. Alzheimer</b>       | <b>43</b> |
| <b>3.4</b> | <b>Ausblick</b>  | <b>44</b> |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>4</b>   | <b>METHODEN</b>   | <b>46</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Methoden der Zellkultur</b>  | <b>46</b> |
| 4.1.1      | Transfektion von HEK293-Zellen  | 46        |
| 4.1.2      | Anzucht und Kultivierung von HEK293m1-Zellen  | 46        |
| 4.1.3      | Präparation und Kultivierung von primären Neuronen aus Kortex<br>und Hippokampus embryonaler Ratten | 47        |
| 4.1.4      | Durchführung von Zellkulturexperimenten und „APP-Release Assay“                                     | 47        |
| <b>4.2</b> | <b>Isolierung und Analyse von RNA Extrakten</b>   | <b>48</b> |
| 4.2.1      | Isolierung von Gesamt-RNA   | 48        |
| 4.2.2      | Auftrennung von RNA im Formaldehyd-Agarose Gel  | 48        |
| 4.2.3      | „Northern-Transfer“ von RNA auf Nylon Membranfilter   | 49        |
| 4.2.4      | Radioaktive Markierung von DNA-Sonden durch „random priming“  | 49        |
| 4.2.5      | Hybridisierung von “Northern-Blots”   | 49        |
| <b>4.3</b> | <b>PCR und Klonierung von DNA-Fragmenten</b>  | <b>50</b> |
| 4.3.1      | Reverse Transkription   | 50        |
| 4.3.2      | RT-PCR  | 50        |
| 4.3.3      | Semiquantitative PCR  | 51        |
| 4.3.4      | Anzucht und Lagerung von Bakterien zur Klonierung von DNA   | 52        |
| 4.3.5      | Herstellung kompetenter Bakterien   | 52        |
| 4.3.6      | Transformation von Bakterien  | 53        |
| 4.3.7      | Isolierung und Reinigung von Plasmid DNA durch alkalische Lyse                                      | 53        |
| <b>4.4</b> | <b>Tierexperimente</b>  | <b>54</b> |
| 4.4.1      | Tiere   | 54        |
| 4.4.2      | Injektion von Substanzen  | 54        |
| <b>4.5</b> | <b><i>in-situ</i>-Hybridisierung</b>  | <b>54</b> |
| 4.5.1      | Vorbehandlung der Objektträger  | 54        |
| 4.5.2      | Herstellung von Gefrierschnitten  | 54        |
| 4.5.3      | Herstellung von Riboproben durch <i>in-vitro</i> Transkription                                      | 55        |
| 4.5.4      | <i>in-situ</i> - Hybridisierung   | 55        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 4.5.5      | Methoden der Detektion   | 56        |
| <b>4.6</b> | <b>AChE-Aktivitätsbestimmung in Liquores von Alzheimer-Patienten</b> | <b>56</b> |
| 4.6.1      | Patienten und Liquoraufarbeitung                                     | 56        |
| 4.6.2      | AChE-Aktivitätsassay   | 57        |
| 4.6.3      | Statistische Analyse   | 58        |
| <b>5</b>   | <b>MATERIALIEN</b>   | <b>59</b> |
| <b>6</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>   | <b>67</b> |
| <b>7</b>   | <b>LITERATUR</b>   | <b>68</b> |
| <b>8</b>   | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>   | <b>79</b> |
|            | <b>ERKLÄRUNG</b>   |           |
|            | <b>DANKSAGUNG</b>  |           |
|            | <b>LEBENS LAUF</b>   |           |

# 1 EINLEITUNG

Cholinomimetika sind Pharmaka, die an cholinozeptiven muskarinergen oder nikotinergen Rezeptoren die Wirkung des Neurotransmitters Acetylcholin nachahmen (direkte cholinerge Agonisten) oder dessen endogene Verfügbarkeit erhöhen (indirekte cholinerge Agonisten). Vor dem Hintergrund der „Acetylcholin-Mangel-Hypothese“ des Morbus Alzheimer werden sie derzeit zur Substitutionsbehandlung dieser bisher nicht heilbaren und progredient verlaufenden Demenz therapeutisch eingesetzt oder befinden sich noch in der Erprobung.

Die vorliegende Dissertation soll den Einfluss direkter muskariner Agonisten auf die Expression des Acetylcholin-abbauenden Enzyms Acetylcholinesterase (AChE) in verschiedenen biologischen Systemen untersuchen und die Frage der negativen Rückkopplung zwischen cholinergen Stimulus und Signalterminierung erörtern. Auf der Grundlage der Arbeitshypothese einer Muskarinrezeptor-vermittelten Induktion der AChE-Expression soll auch untersucht werden, ob dieses postulierte Regelkreismodell möglicherweise der Grund für die limitierte Wirksamkeit cholinergischer Pharmaka zur Behandlung des M. Alzheimer ist.

Dazu ist es nötig, zuerst die Physiologie des cholinergen Systems darzustellen. Im Anschluss sollen dessen pathologische Veränderungen beim Morbus Alzheimer sowie die cholinerge Ersatztherapie erläutert werden. Abschließend folgt eine Übersicht über die AChE-Expression und eine Darstellung der Vorarbeiten, die für eine Regulation durch cholinerge Neurotransmission sprechen.

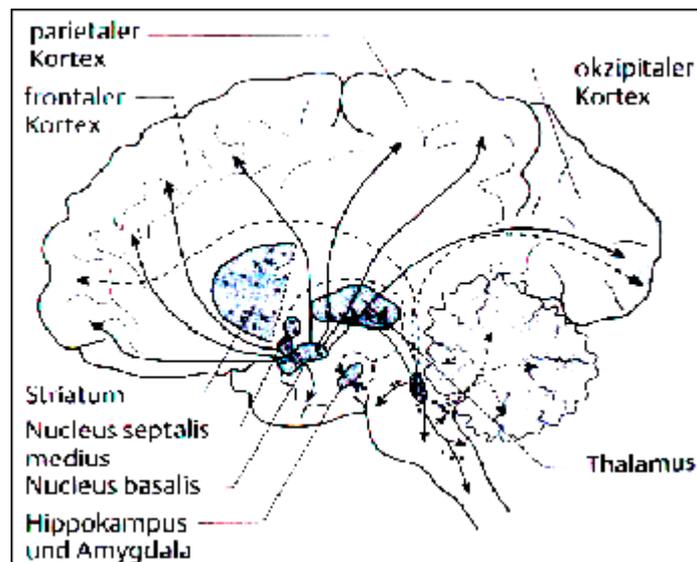
## 1.1 Das cerebrale cholinerge System

### 1.1.1 Anatomie des cerebralen cholinergen Systems

Cholinerg sind alle präganglionären autonomen Neurone und die Motorneurone zur Innervierung der quergestreiften Muskulatur sowie verschiedene Kerngebiete im zentralen Nervensystem (ZNS). Cholinerg sind ferner die postganglionären-parasympathischen Neurone des Darmnervensystem sowie die postganglionären-symphatischen Neurone der Schweißdrüsen (Karczmar, 1993).

Die Hauptquellen cholinergener Innervation im ZNS liegen im basalen Vorderhirn (s. Abb. 1.1). Mehrere cholinerge Kerngebiete bilden dort den Ursprung von Projektionen, die vorwiegend Kortex und Hippokampus innervieren (Hedreen et al., 1984).

Dabei stellt der Nucleus Basalis Meynert (NbM) zusammen mit dem medialen Teil des Septums (MS) und dem diagonalen Band von Broca (DB) die wichtigste Quelle für Acetylcholin (ACh) dar.



**Abb. 1. 1: Projektionsbahnen des cholinergen Systems im ZNS (Möller, 2000):**

Im basalen Vorderhirn finden sich drei größere Kern-Regionen (rostral nach kaudal): 1.) Das mediale Septum (auch Nucleus septalis) projiziert vorwiegend in den Hippokampus. 2.) Das diagonale Band (nicht abgebildet) hat ebenfalls Efferenzen zum Hippokampus sowie zum Gyrus cinguli und Bulbus olfactorius. 3.) Der Nucleus basalis innerviert den gesamten neokortikalen Mantel und die Amygdala.

Die Neurone des MS und des vertikalen Anteils des DB innervieren Hippokampus, Gyrus cinguli, aber auch Thalamus und Bulbus olfaktorius, der zudem Efferenzen des horizontalen Anteils des DB erhält. Der NbM dagegen projiziert in den gesamten Neokortex und innerviert die Amygdala. Darüber hinaus finden sich cholinerge Interneurone im Striatum, im Nucleus Accumbens, sowie cholinerge Neurone im Hirnstamm, die unter anderem in den Thalamus und Hypothalamus projizieren (Mesulam et al., 1983).

Aufgrund der Vielzahl an Zielgebieten cholinergener Innervation, werden dem cholinergen System die Modulation verschiedener Verhaltensweisen zugeschrieben. Neben kognitiven Prozessen (1.1.3) und Motorik, soll es an der Regulation von Aufmerksamkeit und der Schlaf-Wach-Rhythmik beteiligt sein (Perry et al., 1999).

### 1.1.2 Molekulare Grundlagen cholinерger Neurotransmission

ACh wird im Zytoplasma cholinерger Neurone unter der Katalyse der Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) aus Cholin und Acetyl-Co-A synthetisiert (s. Abb. 1.2). Neurone können Cholin nicht oder nur gering selbst bilden, weshalb die Geschwindigkeit dieser Synthese von der Verfügbarkeit des Cholins bestimmt wird, das mittels hochaffinem Transporter aus dem Extrazellulärraum importiert wird. Das im Zytoplasma gebildete ACh wird anschließend durch einen weiteren spezifischen Transporter in neurosekretorische Vesikel transportiert, die in einem aktivitätsabhängigen Prozess mit der präsynaptischen Membran fusionieren und ihren Inhalt in den synaptischen Spalt freisetzen können. Im synaptischen Spalt kann ACh durch Bindung an spezifische Rezeptoren den Reiz des präsynaptischen auf das postsynaptische Neuron übertragen (Kandel, 2000).

Cholinozeptoren lassen sich pharmakologisch nach zwei selektiven Agonisten in Nikotin- und Muskarinrezeptoren einteilen, was sich auch in ihrer Struktur und der Art der Signaltransduktion widerspiegelt.

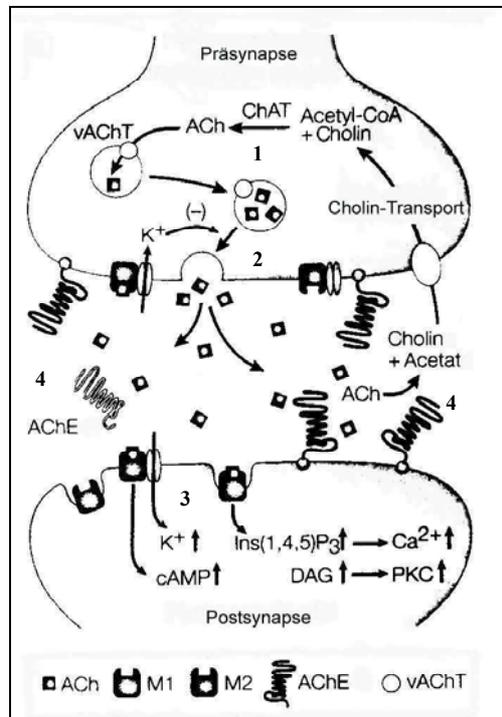
Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die eine pentamere Struktur aus unterschiedlichen Untereinheiten besitzen. Kooperative Bindung zweier ACh-Moleküle an die Ligandenbindungsstelle der beiden  $\alpha$ -Untereinheiten führt zu Öffnung des Na/K-spezifischen Ionenkanals und damit zu Depolarisierung der postsynaptischen Membran (Paterson und Nordberg, 2000).

Im Gegensatz zum ionotropen Rezeptortypus sind die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) metabotrop, d.h. sie beeinflussen zelluläre Prozesse durch Aktivierung von second-messenger-Systemen. Die Molekulare Grundstruktur dieser Rezeptoren besteht aus einem transmembranalen Protein mit sieben durchspannenden Helixstrukturen, verbunden durch extra- und intrazelluläre Schleifen, die extrazellulär ACh binden und intrazellulär an heterotrimere G-Proteine koppeln (Wess et al., 1997).

Pharmakologisch lassen sich 4 Subtypen (M1-M4) unterscheiden. Aufgrund einer unterschiedlich genetischen Sequenz können dagegen 5 verschiedene mAChR (m1-m5) identifiziert werden (Malcolm, 1998; Nadler et al., 1999), die sich nach ihrem Signalmechanismus in 2 Gruppen einteilen lassen: Die m1-, m3- und m5-Subtypen sind über Gq- und G $\beta$ -Proteine an die Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub>, C und D gekoppelt und aktivieren dadurch unter anderem die Proteinkinase C. Die m2- und m4-Subtypen hemmen über inhibitorische Gi-Proteine die Adenylylzyklase, wodurch unter anderem die

Proteinkinase A inaktiviert wird<sup>1</sup>. Der m1-Rezeptor ist der am häufigst vorkommenden mAChR im Säugerhirn. Er ist überwiegend postsynaptisch auf Zellen im Hippokampus und im Neokortex lokalisiert, welche cholinerge Efferenzen erhalten. Der m2-Subtyp befindet sich zumeist präsynaptisch an diesen langen Projektionen aus dem NbM und ist als Autorezeptor an der Regulation der ACh-Freisetzung beteiligt (Brann et al., 1993).

Das in den synaptischen Spalt sezernierte ACh muss schnell inaktiviert werden damit die Synapse durch die anhaltende Rezeptordesensitivierung nicht refraktär wird. Dies wird durch die Acetylcholinesterase (AChE) bewirkt. Die AChE (s. 1.3.1) ist an der Prä- und Postsynapse verankert und wird auch in den synaptischen Spalt sezerniert um die Degradation von ACh zu Cholin und Acetyl zu katalysieren.



**Abb. 1. 2: Cholinerge Neurotransmission (modifiziert nach Soreq und Seidman, 2001):**

Prä- und postsynaptische Prozesse cholinerg Neurotransmission: 1. Biosynthese und Speicherung des ACh 2. Aktivitätsabhängige Freisetzung des Transmitters und Rezeptorbindung 3. Rezeptorvermittelte Signaltransduktion am Beispiel des M1 und M2 Rezeptors 4. Inaktivierung von ACh durch membrangebundene und in den synaptischen Spalt sezernierte AChE.

<sup>1</sup> In der Regel entsprechen die pharmakologischen Subtypen M1-M4 den genetischen m1-m4-Subtypen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird daher nur das „m“-Klassifikations-Schema verwendet.

### **1.1.3 Beteiligung des cerebralen cholinergen Systems bei Lernen und Gedächtnis**

Erste Hinweise der Beteiligung des cerebralen cholinergen Systems bei Lernen und Gedächtnisbildung ergaben sich aus pharmakologischen Experimenten, die cholinerge Neurotransmission bei Tier und Mensch beeinflussen.

Direkte Inhibierung von mAChR durch Applikation der Antagonisten Scopolamin oder Atropin beeinträchtigt das Langzeitgedächtnis von Versuchstieren (Deutsch, 1971) und -personen (Drachman und Leavitt, 1974; Sitaram et al., 1978a), während Aktivierung dieser Rezeptoren durch Agonisten wie Aerocholin oder Cholin zu verbesserten Leistungen führen (Sitaram et al., 1978b). AChE-Inhibitoren wie Physostigmin und Diisopropylfluorophosphat verbessern nicht nur das Erinnerungsvermögen von Versuchstieren (Deutsch, 1971) und -personen (Davis et al., 1978), sondern heben auch die durch Scopolamin verursachten Beeinträchtigungen auf (Drachman, 1977).

Beeinträchtigungen des Gedächtnis zeigen sich auch bei Läsionen des cholinergen Systems: Verletzungen des basalen Vorderhirns durch Ruptur von Aneurysmata oder als Folge neurochirurgischer Eingriffe führen bei Patienten neben Verhaltensauffälligkeiten und Persönlichkeitsveränderungen zu antereo- und retrograden amnestischen Syndromen (Alexander und Freedman, 1984; Damasio et al., 1985; Abe et al., 1998). Zwar zeigte sich in diesen Fällen auch eine Mitbeteiligung benachbarter anatomischer Strukturen, aber auch diskrete Läsionen des basalen Vorderhirns mit u.a. Unterbrechung der Verbindung zwischen dem DB und dem Hippokampus führten zu Amnesie (Abe et al., 1998).

Experimentelle Läsionen des cholinergen Systems im Tiermodell lassen sich durch Applikation von Toxinen induzieren, was zu Verhaltensauffälligkeiten und Beeinträchtigung von Lernen und Gedächtnis bei Versuchstieren führt (Dunnett et al., 1991). Obwohl auch hier Defekte benachbarte Strukturen, wie z. B. des Globus pallidus, beobachtet wurden (Dunnett et al., 1991; Fibiger, 1991), konnten die Ausfallerscheinungen durch Verabreichung von Physostigmin oder durch Implantation ACh-produzierender Zellen aufgehoben werden (Dunnett et al., 1991; Winkler et al., 1995). Mit der Entwicklung des spezifischen anti-cholinergen Neurotoxins 192-IgG-Saporin (Wiley et al., 1991) konnte jedoch gezeigt werden, dass eine selektive Degeneration cholinergere Neuronen im Tiermodell eine Beeinträchtigung kognitiver Funktionen zufolge hat. Es zeigen sich Minderung des Kurzzeitgedächtnisses (Steckler et al., 1995; Shen et al., 1996) und des räumlichen Orientierungsvermögens (Nilsson et al., 1992).

Obgleich die spezifischen Funktionen der cholinergen Projektionen des basalen Vorderhirns noch diskutiert werden (Baxter und Chiba, 1999), so ist auch gerade vor dem Hintergrund der deutlichen Beeinträchtigungen des cholinergen System bei der Alzheimer-Demenz (s. 1.2) eine Beteiligung cholinerg Neurotransmission an kognitiven Prozessen wie Lernen und Gedächtnis allgemein akzeptiert.

## **1.2 Die cholinerge Hypothese des Morbus Alzheimer**

### **1.2.1 Neuropathologische Veränderungen beim M. Alzheimer**

Der M. Alzheimer ist eine „ primär degenerative zerebrale Erkrankung“ (ICD-10) und die häufigste Ursache der Demenz (Ott et al., 1995). Aufgrund der Veränderungen in den Bevölkerungsstrukturen, mit einem zunehmenden Anteil älterer Menschen an der Gesamtpopulation, nimmt die Häufigkeit dieser, u. a. auch alters-assoziierten Erkrankung zu (Evans et al., 1989; Hebert et al., 1995). Klinisch ist die Erkrankung durch progressiven Verlust kognitiver Fähigkeiten charakterisiert, bei denen Gedächtnisstörungen im Vordergrund stehen, es aber im Verlauf zum vollständigen Verfall aller höheren Hirnleistungen kommt (Price et al., 1993).

Die Schwere der Erkrankung, die mit kontinuierlichem geistigem Verfall verbunden mit Verlust der Alltagskompetenzen und zunehmender Pflegebedürftigkeit einhergeht, führt zu einem extremen Leiden der Patienten. Hinzu kommen eine Belastung der pflegenden Angehörigen sowie die erheblichen Kosten für die professionelle Pflege im Gesundheitssystem (Yankner, 2000).

Gegenwärtig gibt es noch keine verlässlichen klinischen oder laborbiochemischen Krankheitsmarker, so dass die Diagnose mit letzter Sicherheit nur autoptisch gestellt werden kann (Kurz et al., 2002).

Die charakteristischen histopathologischen Merkmale der Alzheimer-Demenz beinhalten die Bildung von intrazellulären Neurofibrillen, extrazelluläre Ablagerung von Amyloid und die Degeneration und den Verlust von Neuronen mit Abbau von Synapsen (Yankner, 1996).

Die Amyloid-Plaques stellen schwer lösliche Aggregate des sezernierten  $\beta$ -Amyloid-Proteins dar, einem 39-43 Aminosäurereste umfassenden hydrophoben Peptid mit starker Tendenz zu Aggregation, welches durch proteolytische Spaltung aus seinem höhermolekularen transmembranalen Vorgängermolekül, dem APP (Amyloid Precursor

Protein), generiert wird (Selkoe, 1999; Hardy und Selkoe, 2002). APP unterliegt enzymatischen Prozessierungen durch so genannte „Sekretasen“, die über das Verhältnis von amyloidogenen und nichtamyloidogenen Kataboliten bestimmen: nicht-amyloidogen ist der so genannte  $\alpha$ -Sekretase-Weg: Die  $\alpha$ -Sekretase spaltet APP genau im  $\beta$ -A4-Protein-Abschnitt, so dass dieses keine Aggregate mehr bilden kann. Der sekretierte APP-Rest (APPs) besitzt u.a. neurotrophe und neuroprotektive Eigenschaften (Mattson et al., 1993). Im Krankheitsfall soll dagegen der  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Sekretase-Weg überwiegen. Dabei bleibt bei der Prozessierung des APP die  $\beta$ -A4-Protein-Region intakt und wird je nach Schnittstellen in unterschiedlicher Länge herausgeschnitten und als amyloidogenes und potentiell neurotoxisches Peptid sezerniert (Lambert et al., 1998; Hartley et al., 1999).

Hauptbestandteil der neurofibrillären Bündel ist das hyperphosphorylierte microtubuli-assoziierte Tau-Protein, welches sich in Form von Aggregaten in degenerierenden Neuronen befindet und im Gegensatz zu normal löslichen Tau-Protein nicht an Mikrotubuli gebunden ist, was möglicherweise deren Funktion beim axonalen Transport stört (Shahani und Brandt, 2002).

### **1.2.2 Pathologische Veränderungen des cholinergen Systems beim M. Alzheimer**

Die besondere Bedeutung, die der Degeneration cholinergen Systems beim M. Alzheimer beigemessen wird, steht zum einen erwähnenswerten im Einklang mit den experimentellen Befunden, die diesem Neurotransmittersystem mit der Speicherung von Gedächtnisinhalten beigemessen wird (s. 1.1.3). Zum anderen mit der viel früheren und stärkeren Reduktion cholinergischer Innervation als in den anderen betroffenen Transmittersystemen (Sims, 1987) und deren negativer Korrelation mit dem Demenzgrad (s.u.).

Post mortem zeigt sich bei Alzheimer-Patienten ein Verlust von bis zu 75% der Neuronen des basalen Vorderhirns (Whitehouse et al., 1981; Whitehouse et al., 1982). Konsekutiv kommt es zu Reduktion der ChAT-Aktivität von bis zu 90% im Hippokampus und temporalen Kortex und bis zu 75% im parietalen Kortex bei nur kaum erniedrigten oder normalen Werten in Regionen, die nur geringe oder keine cholinerge Innervation erhalten (Davies, 1978; Guela, 1994). Dementsprechend findet sich auch eine verminderte ACh-Synthese sowohl in kortikalen Biopsien (Sims et al., 1981; DeKosky et al., 1992) als auch in PET-Analysen von Alzheimer-Patienten (Foster, 1994). Dabei zeigen die ChAT-

Reduktion und die verminderte ACh-Synthese eine stärkere Korrelation zum Demenzgrad als die Anzahl von Amyloid-Plaques oder Neurofibrillen (Perry et al., 1978; Wilcock et al., 1982; Terry et al., 1991; DeKosky et al., 1992).

Mit der Degeneration der cholinergen Projektionsneurone kommt es auch zu einer Verminderung der präsynaptischen m2-Rezeptoren, während die postsynaptischen m1-Rezeptoren in den Zielgebieten cholinergischer Innervation weitestgehend erhalten sind (Flynn et al., 1995; Rodriguez-Puertas et al., 1997). Dies eröffnet die Möglichkeit einer pharmakologischen Substitution cholinergischer Substanzen.

### 1.2.3 Cholinerge Ersatztherapie

Die grundlegende Schwierigkeit bei der Behandlung der Alzheimer-Krankheit liegt in der ungeklärten Ätiologie und der Heterogenität der postulierten Pathomechanismen. Eine kausale Behandlung existiert demnach bisher nicht. Strategien zur Impfung gegen potentiell neurotoxische amyloidogene APP-Kataboliten befinden sich noch im experimentellen Stadium (Hock et al., 2000; Hock et al., 2003b).

Die cholinerge Ersatztherapie des M. Alzheimer dagegen stützt sich auf die Hypothese, dass eine Minderfunktion des cholinergen Neurotransmittersystems zu kognitiven Defiziten führt.

Durch die Kenntnis der molekularen Grundlagen der cholinergen Neurotransmission, lassen sich nahe liegende Versuche eine verstärkte cholinerge Stimulation zu erreichen, ableiten: (i) Steigerung der endogenen ACh-Produktion (ii) Minderung des endogenen ACh-Abbaus durch Hemmung der Acetylcholinesterase (iii) direkte Stimulation der ACh-Rezeptoren durch Agonisten.

Erste Ansätze wurden mit Substanzen unternommen, die in Experimenten mit Versuchstieren und -personen zu verbesserten Gedächtnisleistungen führen (1.1.3).

Die Gabe von Acetylcholin-Präkursoren wie Cholin, L- $\alpha$ -Glyzeryl-Phosphorylcholin und Lecithin zur Steigerung der körpereigenen Acetylcholinproduktion brachte durchweg negative Ergebnisse (Little et al., 1985; Thal et al., 1986; Tariot et al., 1997) und gilt mittlerweile als obsolet (Growdon, 1997). Mit dem AChE-Inhibitor Physostigmin ließ sich wegen seiner kurzen Plasmahalbwertszeit von 30 min keine anhaltende Besserung kognitiver Funktionen erzielen. Obwohl es Hinweise dafür gibt, dass durch langfristige Gabe über eine kurzfristige Verbesserung hinaus positive Effekte nachweisbar sind (Harrell et al., 1990), wird vor dem Hintergrund nicht tolerierbarer peripherer cholinergischer

Nebenwirkungen eine Anwendung über einen längeren Zeitraum hinaus als für nicht sinnvoll angesehen (Tariot et al., 1997).

Als erster vorwiegend zentral wirksamer, nicht kompetitiver, reversibler AChE-Inhibitor wurde 1995 Tacrin (Cognex®) in Deutschland zugelassen. Zuvor konnte gezeigt werden, dass es in ausreichender Dosierung gegeben, zumindest die Progredienz der Demenz in einen Beobachtungszeitraum von 12 bzw. 30 Wochen (Farlow et al., 1992; Knapp et al., 1994) mindert. Längerfristig finden sich Belege, dass mit Tacrin behandelte Patienten seltener pflegebedürftig werden (Knopman et al., 1996). Allerdings führte der häufig beobachtete Transaminasenanstieg (Watkins et al., 1994) wegen einer möglichen Leberschädigung dazu, dass die Behandlung mit Tacrin verlassen wurde. Donepezil (Aricept®) wurde 1997 als weiterer AChE-Inhibitor in Deutschland eingeführt. Im Gegensatz zu Tacrin zeichnet es sich durch eine höhere Spezifität für das Hirngewebe aus, zudem hemmt es kaum die AChE der glatten und quergestreiften Muskulatur, was sich auf das periphere Nebenwirkungsprofil günstig auswirkt. Mit Rivastigmin (Exolon®), einem weiteren hirnselektiven AChE-Inhibitor und Galantamin (Reminyl®), das zudem noch durch Modulation präsynaptischer nikotinerger AChR die ACh-Ausschüttung steigert, stehen in der klinischen Praxis drei cholinerge Substanzen zur Verfügung, die zu einer transienten Verbesserung der kognitiver Einbußen bzw. kurzfristigen Stabilisierung des Krankheitsverlaufs führen (Rogers et al., 1998; Rosler et al., 1999; Tariot et al., 2000). AChE-Inhibitoren können vor allem bei noch nicht stark fortgeschrittenen Alzheimer-Demenzen eine vorübergehende Besserung des kognitiven Leistungsniveau bewirken, bei mittelschweren Demenzen ist bisher eher eine passagere Stabilisierung zu erwarten (Benzi und Moretti, 1998). Dies hängt möglicherweise mit der fortgeschrittenen Degeneration des cholinergen Systems bei schwereren Demenzen zusammen, da die Wirkung der indirekten Cholinomimetika notwendigerweise von der Funktionsfähigkeit des präsynaptischen Neurons und von der cholinergen Restfunktion abhängig ist.

Gegenüber den AChE-Inhibitoren hat die Behandlung mit cholinergen Rezeptoragonisten theoretisch den Vorteil, dass sie direkt und unabhängig vom Ausmaß der cholinergen Restfunktion wirken können.

Für erste Behandlungsversuche, Muskarinrezeptoren mittels direkter Agonisten zu stimulieren, wurden unselektive Muskarinrezeptoren verwendet, die aber aufgrund begrenzter Wirksamkeit und häufig assoziierter Nebenwirkungen keinen therapeutischen Nutzen brachten (Christie et al., 1981; Mouradian et al., 1988; Tariot et al., 1988). Bei der Entwicklung neuer Muskarinrezeptoren wurde die Strategie verfolgt, eine möglichst hohe

Selektivität für m1-Rezeptoren zu erreichen, da zum einen dieser Rezeptorsubtyp in hoher Dichte in Zielregionen cholinergener Innervation, insbesondere in Kortex und Hippokampus, vorkommt (s. 1.2.2), zum anderen die Aktivierung dieses Subtyps in-vitro die nichtamyloidogene Prozessierung des APP verstärken kann (Nitsch et al., 1992; Farber et al., 1995) und die Hyperphosphorylierung des Tau-Protein verhindert (Sadot et al., 1996), was beides mit der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit assoziiert ist (s. 1.2.2). Es stehen mittlerweile mehrere Substanzen zur Verfügung, die hauptsächlich den m1-Rezeptorsubtyp aktivieren und sich noch in klinischer Erprobung befinden (Korczyński, 2000).

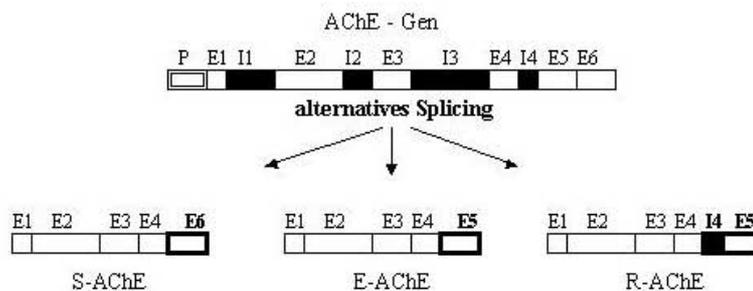
### **1.3 Regulation der AChE-Expression durch cholinerge Neurotransmission und deren Bedeutung für die cholinerge Ersatztherapie**

#### **1.3.1 AChE-Expression**

Die Funktion der AChE an cholinergen Synapsen ist die Terminierung cholinergener Neurotransmission durch Hydrolyse von ACh (Taylor und Radic, 1994). AChE wird in Säugern durch ein Gen kodiert, das beim Menschen auf Chromosom 7 lokalisiert ist (Eiden, 1998). Die Expression des Enzyms unterliegt dabei Regulationsmechanismen auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene.

Das Gen besteht aus 6 kodierenden Abschnitten, so genannten Exons (E1-E6). Nach der Transkription in prä-messenger-RNA (prä-mRNA) werden die nichtkodierenden Abschnitte, so genannte Introns, durch Spleißen von den kodierenden Regionen getrennt. Bei diesem Prozess können durch alternatives Spleißen unterschiedliche reife mRNA's entstehen (Karpel et al., 1994). Dieser Vorgang steigert die Kodierungsmöglichkeiten und erlaubt, dass aus einem einzigen Gen unterschiedliche Proteine mit verschiedenen Funktionen gebildet werden können (Modrek und Lee, 2002). Beim Menschen sind drei unterschiedliche AChE-mRNA's bekannt (s. Abb. 1.3). Gemeinsam ist Ihnen die Exonabfolge E1-E2-E3-E4, die vorwiegend für das katalytische Zentrum des Enzyms kodiert. Das 3'Ende gestaltet sich unterschiedlich und kodiert für das Carboxyende, das für die subzelluläre Lokalisation des Enzyms entscheidend ist: Die Exonabfolge E4-E6 kodiert für die „synaptische“ Isoform (S-AChE), die an der neuromuskulären Endplatte und an Synapsen des ZNS exprimiert wird (daher auch „neuronal“ AChE genannt). Durch kovalente und hydrophobe Bindungen kann sie sich zu Tetrameren zusammenlagern und

wird über ein kollagen-ähnliches Protein oder eine hydrophobe Untereinheit subzellulär verankert. Beinhaltet die Spleißform die Exonabfolge E4-E5, kodiert sie für die „erythrozytäre“ Isoform (E-AChE), die durch einen lipophilen GPI-Anker (glycosyliertes Phosphatidyl-Inositol, das an eine C-terminale Aminosäure gebunden ist) an die Membran von Erythrozyten befestigt wird. Bei einer weiteren Variante, der „readthrough“-Isoform (R-AChE), wird das Intron 4 durch den Spleißvorgang nicht entfernt (ein sog. Pseudointron) sondern „durchgelesen“ und das 3'Ende durch die Abfolge E4-I4-E5 gebildet. Dieser Isoform fehlt die zelluläre Fixierungsmöglichkeit. Es wird postuliert, dass sie als lösliches Enzym in den synaptischen Spalt sezerniert wird (Soreq und Seidman, 2001).



**Abb. 1.3: Exon-Intron-Struktur des AChE-Gens und alternative mRNA (Soreq und Seidman, 2001):**

Das AChE-Gen besteht aus einer Promoter-Region (P), sechs Exons (E1-E6) und vier Introns (I1-I4). Die Transkription beginnt im E1, I1-I3 wird durch Spleißing entfernt. Das katalytische Zentrum der AChE wird hauptsächlich durch die Exonabfolge E2-E3-E4 kodiert. Durch alternatives Spleißing können durch ein variables 3'-Ende drei verschiedene mRNA's gebildet werden, die für unterschiedliche Enzym-Isoformen kodieren: 1. E6 kodiert für die „synaptische Isoform“ (S-AChE), auch „neuronale“ Isoform genannt. 2. E5 kodiert für die „erythrozytäre“ Isoform (E-AChE). 3. I4-E5 kodiert für die „readthrough“-Isoform (R-AChE).

Die AChE-Expression kann durch eine Vielzahl physiologischer Ereignisse und externer Stimuli induziert werden. So findet sich u.a. eine transient erhöhte AChE-Expression während der Zelldifferenzierung, der Entwicklung des ZNS von Vertebraten, Tumorgenese oder infolge von Stress (Small et al., 1996; Soreq und Seidman, 2001). Die Funktion, die AChE dabei erfüllt, ist bislang noch unklar.

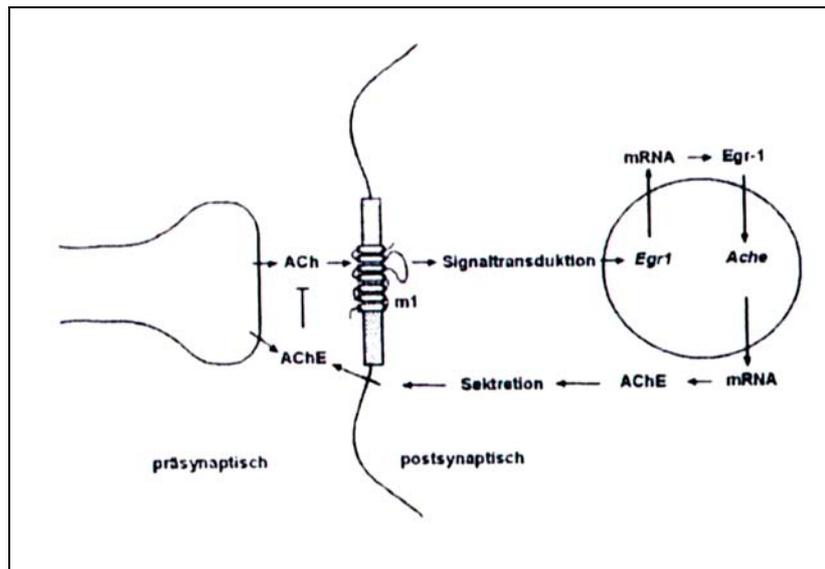
### **1.3.2 Regulation der AChE-Expression durch cholinerge Neurotransmission : Evidenz für eine negative Rückkopplung durch muskarinrezeptorabhängige Genexpression**

Vor dem Hintergrund der cholinergen Ersatztherapie des M. Alzheimer sind für die Regulation der AChE-Expression Faktoren, die cholinerge Neurotransmission beeinflussen, von besonderem Interesse.

So kommt es bei Mäusen, die entweder Stress oder Acetylcholinesterase-Inhibitoren ausgesetzt wurden, bereits nach 30 min zu einer verstärkten AChE-Expression in Kortex und Hippokampus (Kaufer et al., 1998). Dabei wird als gemeinsame Endtrecke dieser beiden Einflüsse ein verstärkte cholinerge Aktivität angesehen, die infolge die Expression des Transkriptionsfaktor *c-fos* aktiviert, welcher im Promoter der AChE an eine DNA-Erkennungssequenz (responsives Element) binden kann und dadurch deren Expression aktivieren soll. Ein weiterer Transkriptionsfaktor mit einer spezifischen DNA-Erkennungssequenz im AChE-Promoter ist *egr1*, das zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren mit Zinkfinger-Domänenstruktur gehört.

In HEK293m1-Zellen (human embryonic kidney cell line 293) lässt sich die Expression von *egr1* durch die Aktivierung des muskarinischen Acetylcholinrezeptors induzieren (von der Kammer et al., 1998). Auch ist durch Rezeptorstimulation oder Überexpression von *egr1* in diesem Zellsystem ein kotransfizierter AChE-Promotor, der an ein Reportergen gekoppelt ist, aktivierbar.

Muskarinrezeptorabhängige Induktion von Transkriptionsfaktoren wie *c-fos* und *egr1*, die eine Erkennungs-Sequenz in der Promoterregion des AChE-Gen besitzen und im Fall von *egr1* den Promotor auch aktivieren können, legt einen Regelkreis im Sinne einer Rückkopplung nahe, bei dem die AChE-Expression durch muskarinerge Stimulation aktiviert wird um cholinerge Transmission zu terminieren (s. Abb. 1.4).



**Abb. 1.4 Kopplung der AChE-Genexpression mit muskariniger Neurotransmission (Nitsch et al., 1998)**

Acetylcholin (ACh) wird aktivitätsabhängig aus präsynaptischen Terminalen freigesetzt und stimuliert über m1ACh-Rezeptoren intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden, die innerhalb von Minuten die Transkription des *egr1*-Gens aktivieren. *egr1*-mRNA wird in *egr1*-Proteine umgeschrieben, die in den Kern transloziert werden und die Transkription von AChE aktivieren. Dieser Regelkreis könnte zu einer gesteigerten Hydrolyse von ACh im synaptischen Spalt führen.

Einen tierexperimentellen Befund für ein derartiges Regelkreismodell zeigt sich in dem IgG-Saporin-Maus-Modell, bei dem selektiv die cerebralen cholinergen Projektionsfasern zerstört sind und somit die cholinerge Aktivität reduziert ist, was infolge dessen zu einer histochemisch nachweisbaren Reduktion der AChE-Aktivität in Kortex und Hippokampus führt (Nitsch et al., 1998).

Eine negativ regulierende Rückkopplung der AChE-Expression durch cholinerge Neurotransmission könnte zudem einen Erklärungsansatz für die verminderte und zeitlich begrenzte Wirksamkeit von Cholinomimetika bei der Therapie des M. Alzheimer erklären (Benzi und Moretti, 1998), da durch verstärkte Expression von AChE die Hydrolyse des ACh im Synaptischen Spalt beschleunigt würde und wiederum ein cholinerges Defizit entstünde (Kaufer et al., 1998; Nitsch et al., 1998; von der Kammer et al., 1998). Erste Hinweise dafür zeigten sich bei einer langfristigen Therapie von Alzheimer-Patienten mit dem AChE-Inhibitor Tacrin, bei der es nach einem Jahr zu einem Anstieg der AChE-Aktivität, gemessen im Liquor cerebrospinalis, kommt (Nordberg, 1999).

## 1.4 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Es gibt erwähnenswerten verschiedenen Befunde, die eine verstärkte Expression des AChE-Gen nach muskarinergem Stimulation nahe legen. Bei den bisher veröffentlichten Daten wird für diese Hypothese allerdings entweder eine indirekte cholinerge Stimulation zugrunde gelegt (Kaufer et al., 1998) oder die Abnahme der AChE-Aktivität nach Reduktion der cholinergen Innervation als eine verminderte Aktivierung der AChE-Expression gedeutet (Nitsch et al., 1998). Untersuchungen, die direkte Stimulation von Muskarinrezeptoren berücksichtigen, beschränken sich auf ein artifizielles Zellsystem, das den m1 Rezeptor überexprimiert und in dem ein kotranskribierter AChE-Promoter, gekoppelt an ein Reportergen, aktivierbar ist (von der Kammer et al., 1998).

Die vorliegende Dissertation soll folgende Fragen bearbeiten:

- führt eine direkte Muskarinrezeptorstimulation in HEK293m1-Zellen über eine Aktivierung des AChE-Promoters hinaus zu einem Anstieg der AChE-mRNA?
- unterliegt die AChE-Expression in einem neuronalen Zellmodell einer direkten muskarinrezeptorabhängigen Stimulation?
- führt die Applikation von direkten, zentral wirksamen Muskarinrezeptoragonisten im Tierversuch zu einem Anstieg der AChE-Expression?
- kommt es nach therapeutisch eingesetzten Dosen von direkten m1-spezifischen Muskarinrezeptoragonisten zu einer Steigerung der AChE-Aktivität im Liquor cerebrospinalis von Alzheimer-Patienten ?

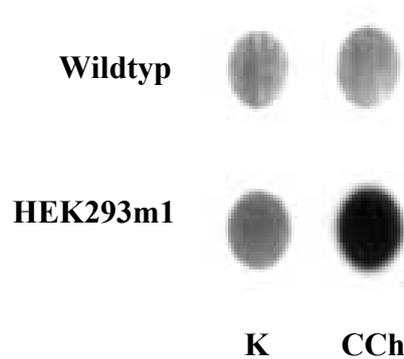
## **2 ERGEBNISSE**

### **2.1 Induktion der AChE-Expression in HEK293m1-Zellen durch direkte Muskarinrezeptoragonisten**

#### **2.1.1 Verifizierung der Rezeptoraktivität durch den „APP-release assay“ und Nachweis der Induktion der egr1-Expression durch „Northern-Blotting“**

Um den Einfluss von direkten Muskarinrezeptoragonisten auf die AChE-Expression zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen, die rekombinant den m1-Acetylcholinrezeptor (m1-AChR) überexprimieren, für 24 Stunden in serumfreien Medium kultiviert, um mögliche Effekte der im Serum enthaltenen Substanzen (Wachstumsfaktoren, Hormone, Antibiotika etc.) zu unterbinden. Die Aktivierung des muskarinischen Rezeptors wurde danach durch Zugabe des Rezeptoragonisten Carbachol (CCh) für eine Stunde erzielt, während eine zweite Zellpopulation als Kontrolle parallel in serumfreien Medium kultiviert, aber keiner Carbacholbehandlung unterzogen wurde. Zur Überprüfung der Rezeptorstimulation wurde ein „APP-release assay“ der konditionierten Medien der verwendeten Zellkulturen durchgeführt. Der Assay basiert auf der Beobachtung, dass das Zelloberflächenmolekül APP (Amyloid Precursor Protein) bereits während seines intrazellulären Transports zur Zytoplasmamembran proteolytisch in eine kleine, membranassoziierte Domäne sowie eine große, sezernierte Ektodomäne (APP<sub>os</sub>) katalysiert wird (Selkoe, 1999). Diese proteolytische Freisetzung der Ektodomäne wird durch Aktivität muskarinischer AChRs reguliert und kann durch spezifische Antikörper im konditionierten Medium der Zellen nachgewiesen werden (Nitsch et al., 1992)

In den für die weitere Untersuchung der AChE-Expression verwendeten Zellkulturen zeigen die Carbachol-behandelten HEK293m1-Zellen gegenüber dem Wildtyp und der Kontrolle einen deutlichen Anstieg der APP<sub>os</sub> – Freisetzung (s. Abb. 2.1).

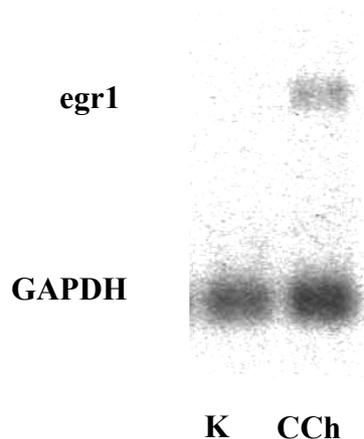


**Abb. 2.1: Untersuchung der APP<sub>oligo</sub>-Freisetzung durch Aktivierung von m1-Acetylcholin-Rezeptoren:**

HEK293-Zellen (Wildtyp) und HEK293m1-Zellen wurden mit dem m1-Rezeptoragonisten Carbachol für 1 h behandelt oder als Kontrollgruppe unbehandelt belassen. Die konditionierten Medien der Zellkulturen wurden mittels einer Dot-Blot-Kammer auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und zum Nachweis der löslichen Ektodomäne des Amyloid Precursor Proteins (APP<sub>oligo</sub>) mit dem monoklonalen Antikörper 22C11 detektiert. Die deutlich erhöhte Signalintensität in den Carbachol-stimulierten Probe der HEK293m1-Zellen dokumentiert die verstärkte Sezernierung der löslichen APP-Ektodomäne (APP<sub>oligo</sub>) als Folge erhöhter  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität durch Muskarinrezeptorstimulation.

Dies bestätigt die erwartete Rezeptoraktivierung und die gewonnene RNA aus diesen Zellen konnte dementsprechend als Grundlage für weitere Untersuchung verwendet werden.

Zunächst wurde geprüft, ob die erfolgreiche m1-AChR-Stimulation auch die Expression des muskarinrezeptorabhängigen Transkriptionsfaktors *egr1* induziert hat (s. Abb. 2.2). Eine *egr1*-spezifische und radioaktiv-markierte cDNA-Sonde erzeugt bei Hybridisierung der RNA-Extrakte im „Northern-Blot“ eine deutliche Signalintensität in der RNA der stimulierten Zellen, während in der Kontrolle *egr1*-mRNA unterhalb der Nachweisgrenze liegt und die Detektion mit einer GAPDH-spezifischen Sonde durch gleichstarke Signale Ladungsgleichheit beider Proben anzeigt (s. Abb. 2.2). Dies bestätigt nochmals die Muskrinrezeptoraktivierung und die Induktion von *egr1*, das prinzipiell den Promoter von AChE aktivieren kann.



**Abb. 2.2: Induktion der egr1-mRNA nach Carbacholbehandlung von HEK293m1-Zellen:**

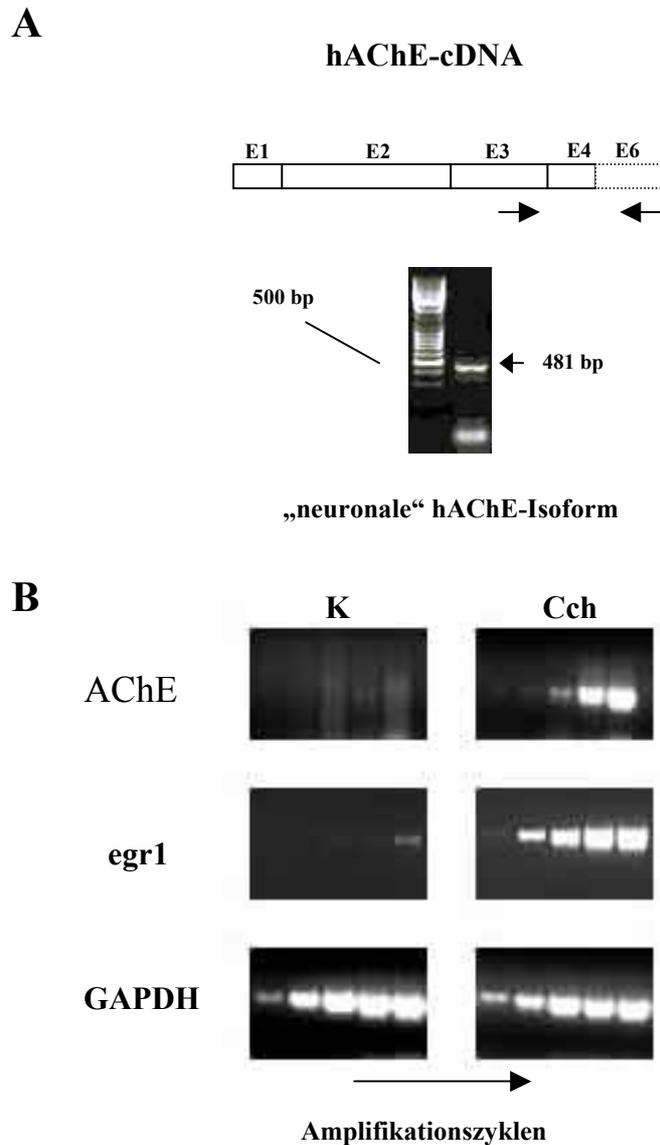
Ein „Northern-Blot“ mit RNA-Extrakten von einstündig Carbachol-behandelten HEK293m1-Zellen und Kontrollen wurde mit einer egr1-spezifischen Sonde hybridisiert. Die radioaktiv-markierte Sonde zeigt eine deutlich erhöhte Signalintensität in den RNA-Extrakten der stimulierten Zellen. Die Membran wurde zudem zur Ladekontrolle mit einer GAPDH-spezifischen Sonde hybridisiert.

### 2.1.2 Nachweis der AChE-Expression durch semiquantitative RT-PCR

Um den Einfluss von direkten Muskarinrezeptoragonisten auf die AChE-Expression in HEK293m1-Zellen zu untersuchen war es erforderlich die RNA aus nachweislich muskarinerg stimulierten und egr1-exprimierenden HEK293m1-Zellen mittels „Reverser Transkription“ (RT) in cDNA umzuschreiben, da AChE-Transkripte instabil sind und sich in der „Northern-Blot-Hybridisierung“ nur schwer und inkonstant nachweisen lassen (Rao und Brimijoin, 1995; von der Kammer et al., 1998). Mit spezifischen Primerkombinationen lässt sich aus der cDNA in einer „Polymerease-Kettenreaktion“ (PCR) selektive Bereiche aus AChE-Transkripten amplifizieren und mittels Gel-Elektrophorese nachweisen.

Die Primerkombination wurde so gewählt, dass sie in einer RT-PCR-Reaktion Transkripte der „neuronalen“ AChE-Isoform (S-AChE) detektieren und einen DNA-Abschnitt mit einer Größe von 481 Basenpaare amplifizieren kann (s. 1.3.1). Zur Testung der ausgewählten Primer und PCR-Bedingungen wurde RNA aus humanen kortikalen Hirngewebe (post mortem) extrahiert und in einer RT-PCR-Reaktion eingesetzt. Nach erfolgreicher Amplifikation (s. Abb. 2.3 A) konnte die cDNA aus stimulierten HEK2931-Zellen und Kontrollen in einer semiquantitativen RT-PCR-Analyse verglichen werden (s. Abb. 2.3 B). Zur Vergleichbarkeit beider Proben wurde als interner endogener Standard die GAPDH-Expression untersucht. Bei Ladungsgleichheit zeigt sich in der Carbachol-

behandelten Probe sowohl eine Amplifikation von *egr1* als auch von AChE in den erwarteten Fragmentgrößen, während in der Kontrolle eine Amplifikation ausbleibt (von der Kammer et al., 2001).



**Abb. 2.3: Induktion der AChE-Expression in HEK293m1-Zellen nach muskarinenger Stimulation:**

In einer RT-PCR-Reaktion mit RNA aus humanem kortikalen Hirngewebe kann mit einer AChE-spezifischen Primerkombination ein DNA-Abschnitt aus Transkripten der „neuronalen“ AChE-Isoform mit einer Größe von 481 bp amplifiziert werden (A). Eine semiquantitative RT-PCR Analyse mit RNA aus einstündig muskarinerg stimulierten HEK293m1-Zellen (n=2) zeigt im Vergleich zur Kontrolle höhere *egr1*- und AChE-cDNA-Level. Die Analyse der GAPDH-Expression dokumentiert gleiche Präparationsbedingungen für stimulierte Zellen und Kontrollgruppe (B). Die PCR-Produkte wurden nach jedem 3. Zyklus gesammelt, elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. AChE und *egr1*-Produkte sind ab Zyklus 30 und GAPDH ab Zyklus 24 aufgetragen. Dargestellt sind jeweils 5 Proben

## **2.2 Analyse der AChE-Expression in primären Neuronen nach muskarinerger Stimulation**

### **2.2.1 Die „neuronale“ AChE-Isoform wird in primären Neuronen der Ratte basal exprimiert und bleibt von muskarinerger Stimulation unbeeinflusst**

Um den Effekt von Muskarinrezeptoragonisten auf die AChE-Expression an einem neuronalen Zellsystem zu untersuchen wurden Primärzellkulturen von kortikalen und hippocampalen Neuronen embryonaler Ratten angelegt und dem gleichen Stimulationsparadigma unterzogen, das bereits bei der Analyse der AChE-Expression in HEK293m1-Zellen angewendet wurde.

Durch RT-PCR konnte zuvor aus dem Kortex adulter Ratten PCR-Bedingungen und Primer zur Detektion von Transkripten der neuronalen AChE-Isoform getestet werden. Als Referenz für nachfolgende Experimente wurde aus dem Kortex der Ratte ein Fragment mit einer Größe von 339 Basenpaaren amplifiziert (s. Abb. 2.4 A).

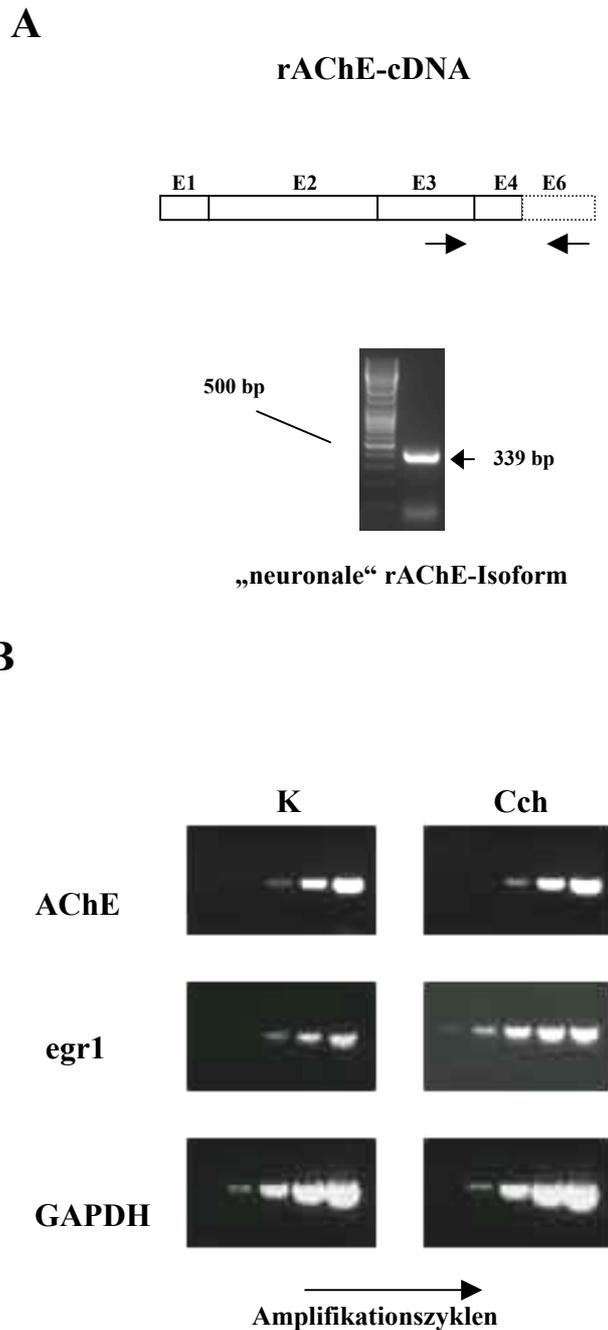
In der semiquantitativen RT-PCR-Analyse (s. Abb. 2.4 B) zeigt sich bereits in der unbehandelten Zellpopulation sowohl eine basale *egr1*- als auch eine basale AChE-Expression. In einem Zeitraum von einer Stunde nach Applikation des Muskarinrezeptoragonisten Carbachol kommt es zu einem Anstieg der *egr1*-Expression. Die basale AChE-Expression bleibt dagegen trotz erfolgter Stimulation unverändert.

### **2.2.2 Die Isoform-unabhängige AChE-Detektion in primären Neuronen der Ratte zeigt eine basale AChE-Expression, die nach muskarinerger Stimulation unverändert bleibt**

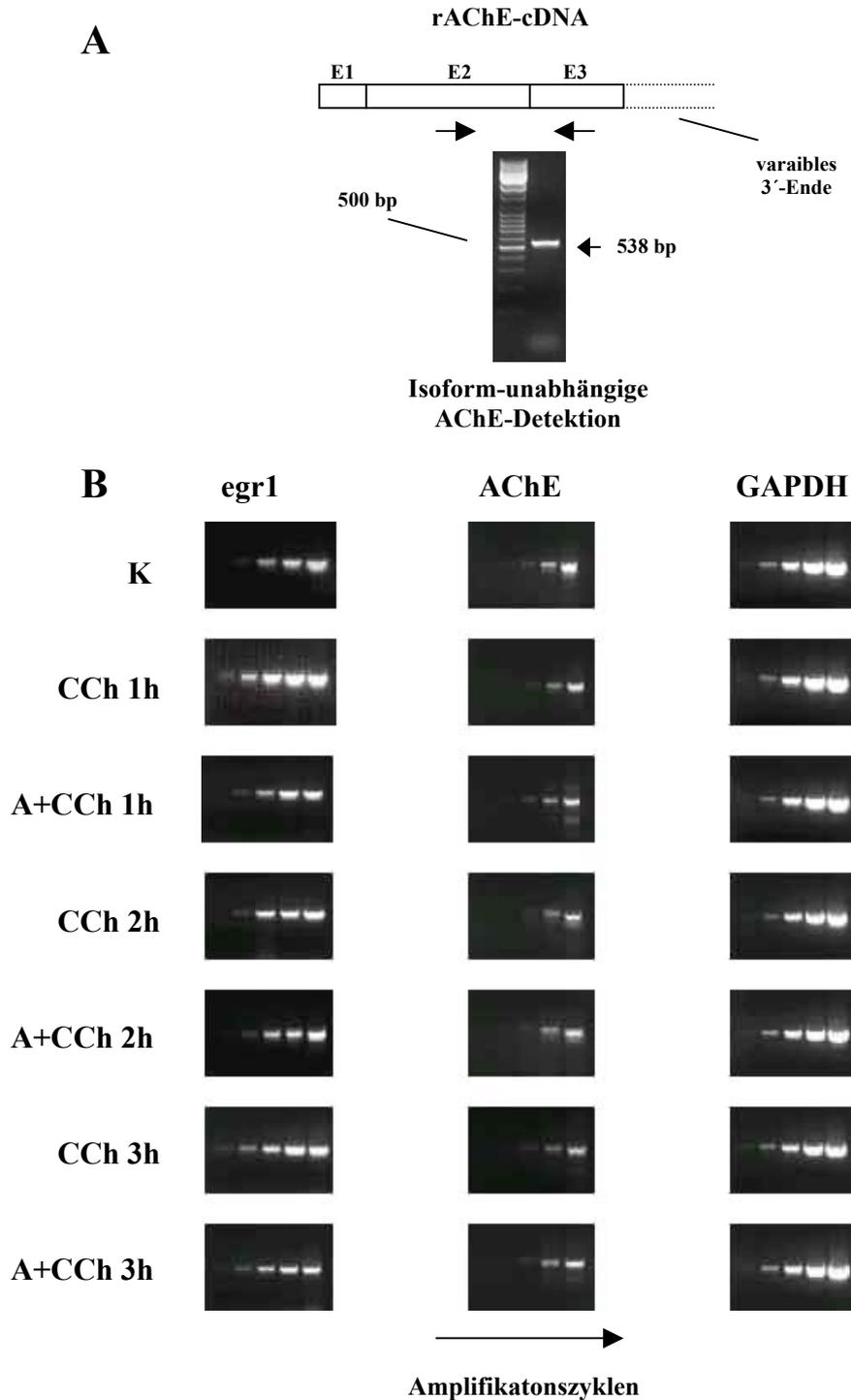
Untersuchungen mittels semiquantitativen RT-PCR-Analysen zur muskarinrezeptorabhängigen AChE-Expression an kortikalen Hirnschnitten der Maus zeigen, dass cholinerge Stimulation die Expression der „neuronalen“ AChE-Isoform (S-AChE) nicht beeinflusst, dafür aber die Expression der „readthrough“-AChE-Isoform (R-AChE) induzieren kann (Kaufer et al., 1998). Da eine Amplifikation dieser Isoform mit sequenzspezifischen Primern aus cDNA des Kortex von Ratten nicht gelang, wurde die Primerkombination so gewählt, dass sie den konstanten Bereich der Transkripte aller drei AChE-Isoformen amplifizieren kann (Exon 2 und Exon 3) um eine mögliche Induktion eines jeden Subtyps erfassen zu können (Abb. 2.5 A).

Primäre Neuronen wurden mit dem Musakrinrezeptoragonisten Carbachol stündlich bis zu einem Zeitraum von drei Stunden behandelt und jede Stunde die GAPDH-, egr1- und AChE-Expression mittels semiquantitativer PCR untersucht.

Die Analyse der GAPDH-Expression ergibt für sämtliche Proben gleiche mRNA-Level und erlaubt damit Vergleichbarkeit aller Proben miteinander. Für egr1 zeigt sich eine zweigipflige Verstärkung der bereits zuvor gezeigten basalen egr1-Expression (Abb. 2.5 B): Behandlung mit dem Muskarinrezeptoragonisten Carbachol führt über die basalen egr1-mRNA-level hinaus zu einem Anstieg der egr1-Expression nach einer und drei Stunden und bleibt durch vorherige Blockade der Muskarinrezeptoren mit dem Antagonisten Atropin auf dem Niveau der Kontrolle. Die Isoform-unabhängige AChE-Detektion zeigt dagegen trotz nachgewiesener Muskarinrezeptorstimulation im Vergleich zur Kontrolle in einem Zeitraum bis zu drei Stunden gleich bleibende basale AChE-mRNA-Level.



**Abb. 2.4: Expressionanalyse der „neuronalen“ AChE in primären Neuronen der Ratte nach muskarinerger Stimulation:** In einer RT-PCR-Reaktion mit RNA aus dem Kortex von Ratten kann mit einer AChE-spezifischen Primerkombination ein DNA-Abschnitt aus Transkripten der „neuronalen“- AChE-Isoform mit einer Größe von 339 bp amplifiziert werden (A). Die semiquantitative RT-PCR Analyse (n=2) mit RNA aus primären Neuronen der Ratte, die 1h mit dem Muskarinrezeptoragonisten Carbachol behandelt wurden, zeigt eine basale egr1- und AChE-Expression (B). Im Vergleich zur Kontrolle weist die Carbachol-behandelte Zellpopulation erhöhte egr1-mRNA-Level auf. AChE und egr1-Produkte sind ab PCR-Zyklus 30 und GAPDH ab PCR-Zyklus 24 aufgetragen.



**Abb. 2.5: Isoform-unabhängige AChE-Detektion in primären Neuronen der Ratte nach 3h muskarinenger Stimulation** : Zur isoform-unabhängigen AChE-Detektion wurde die Primerkombination so gewählt, dass sie an den konstanten Sequenzabschnitten von AChE-Transkripten jeder Isoform bindet und einen DNA-Abschnitt mit einer Größe von 538 bp amplifiziert (A). Primäre Neuronen der Ratte wurden entweder nur mit dem Muskarinrezeptoragonisten CCh oder zuvor mit Muskarinrezeptorantagonisten Atropin zu unterschiedlichen Zeitpunkten behandelt. In einer kinetischen RT-PCR-Analyse (n=2) wurde die Expression von egr1, AChE und GAPDH untersucht (B). Muskarinrezeptorstimulation führt blockierbar durch Atropin zu einem Anstieg der egr1-Expression nach 1h und 3h. Die AChE-Expression bleibt durch Muskarinrezeptorstimulation unbeeinflusst. AChE und egr1-Produkte sind ab PCR-Zyklus 30 und GAPDH ab PCR-Zyklus 24 aufgetragen

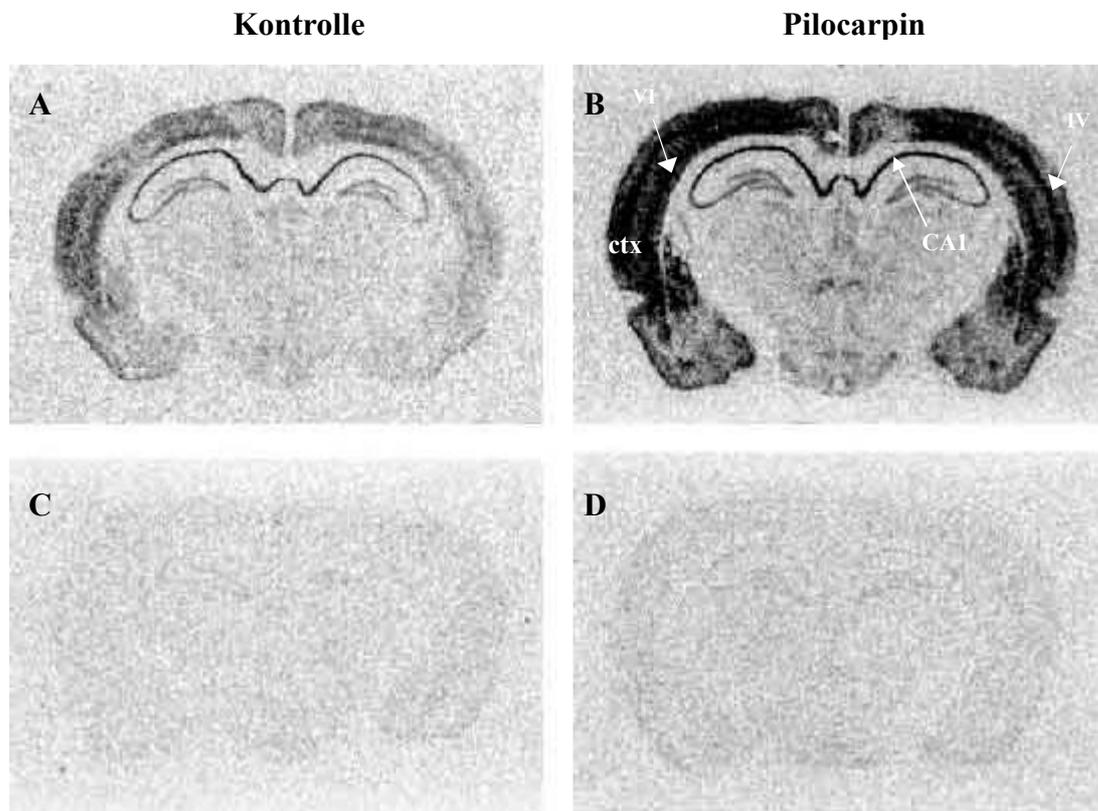
## **2.3 Analyse der AChE-Expression nach muskarinergem Stimulation *in-vivo* durch *in-situ*-Hybridisierung**

### **2.3.1 Induktion der *egr1*-Expression in Kortex und Hippokampus der Ratte**

Um den Einfluss von Muskarinrezeptoragonisten auf die zentralnervöse AChE-Expression am Tiermodell zu untersuchen, wurde Ratten der muskarinerge Rezeptoragonist Pilocarpin oder zur Kontrolle Pufferlösung injiziert und frontale Gehirnschnitten durch *in-situ*-Hybridisierung analysiert. Dazu wurde zunächst die muskarinerge Stimulation durch Untersuchung der *egr1*-Expression überprüft. Zur Detektion der *egr1*-mRNA wurden  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-UTP markierte RNA-Sonden verwendet. Diese wurden zuvor durch *in-vitro*-Translation aus der in vorausgegangenen Experimenten amplifizierten und klonierten *egr1*-cDNA erstellt (s. 2.2.1). Es wurden sowohl „antisense“- (zur detektierenden mRNA komplementäre und damit bindungsfähige mRNA) als auch „sense“-Transkripte (mit der zur detektierenden mRNA sequenzidentische mRNA) zur Kontrolle der unspezifischen Hybridisierung erstellt. Die frontalen Hirnschnitte wurden im Bereich des Hippokampus angefertigt und mit den radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Die verwendete „antisense“-Sonde erkennt dabei ein spezifisches Expressionsmuster (Abb. 2.6), während die „sense“-Sonde lediglich unspezifische Signale hervorruft.

Nach Injektion von Pilocarpin kommt es zur erhöhten Expression der *egr1*-mRNA innerhalb des Kortex und des Hippokampus. Innerhalb des Kortex kommt es dabei aufgrund der starken Induktion in den Schichten IV und VI und der schwächeren Expression in den Schichten III und V und der nur gering nachweisbaren Induktion in den Schichten I und II zu einem charakteristischen laminaren Muster. Im Hippokampus dagegen erfolgt eine starke Induktion in der CA1 Region.

Diese Lokalisation der *egr1*-mRNA im Gehirn (Mack et al., 1990; Schlingensiepen et al., 1991) sowie die Regulation durch cholinerge Neurotransmission (Hughes und Dragunow, 1994) wurde bereits zuvor beschrieben und bestätigt hiermit die erfolgreiche muskarinerge Rezeptoraktivierung.



**Abb. 2.6: Analyse der *egr-1*-Expression nach Stimulation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren *in-vivo* durch *in-situ*-Hybridisierung.**

Nach einwöchiger Gewöhnung der Versuchstiere an den Versuchsleiter wurden den Ratten (je n=4) durch intraperitoneale Injektion entweder der Muskarinrezeptoragonist Pilocarpin oder zur Kontrolle Pufferlösung (PBS) appliziert und das Experiment nach 75 Minuten durch Dekapitation beendet. Durch Hybridisierung *egr-1*-spezifischer antisense- (**A und B**) und sense-RNA-Sonden (**C und D**) auf frontalen Gehirnschnitten wurde die transkriptionelle Expression des Gens in Kontrolltieren sowie in Pilocarpin-behandelten Tieren untersucht. *In-vivo*- Aktivierung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren führt zur erhöhten Expression von *egr-1* im gesamten Kortex sowie in der Pyramidalzellschicht der hippocampalen CA1-Region. Innerhalb des Kortex fällt die besonders stark erhöhte Expression in den Schichten IV und VI auf. Die „sense“-Sonde erzeugt lediglich unspezifische Signale.

### **2.3.2 Die basale AChE-Expression bleibt von muskarinergem Stimulation unbeeinflusst**

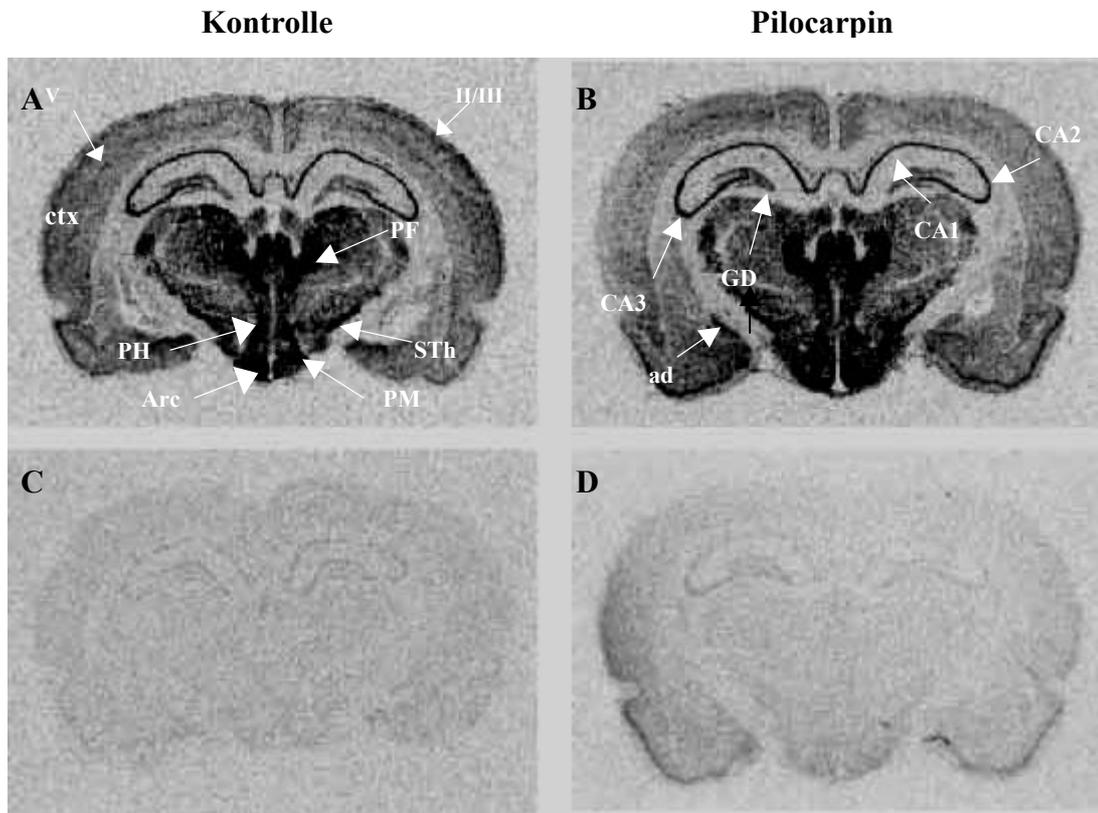
Nach erfolgreicher zentraler muskarinergem Stimulation konnte nun mittels *in-situ*-Hybridisierung die AChE-Expression an Gehirnschnitten der gleichen Serie untersucht werden.

Als Grundlage der RNA-Sonden wurde aus Vorexperimenten die AChE-cDNA verwendet, die aus dem Sequenzbereich amplifiziert wurde, der allen AChE-Subtypen gleich ist (s. 2.2.2) um somit eine Isoform-unabhängige Detektion zu ermöglichen.

Die „antisense“-Sonde erkennt dabei wieder ein spezifisches Expressionsmuster, während die „sense“-Sonde den unspezifischen Hintergrund darstellt (Abb. 2.7).

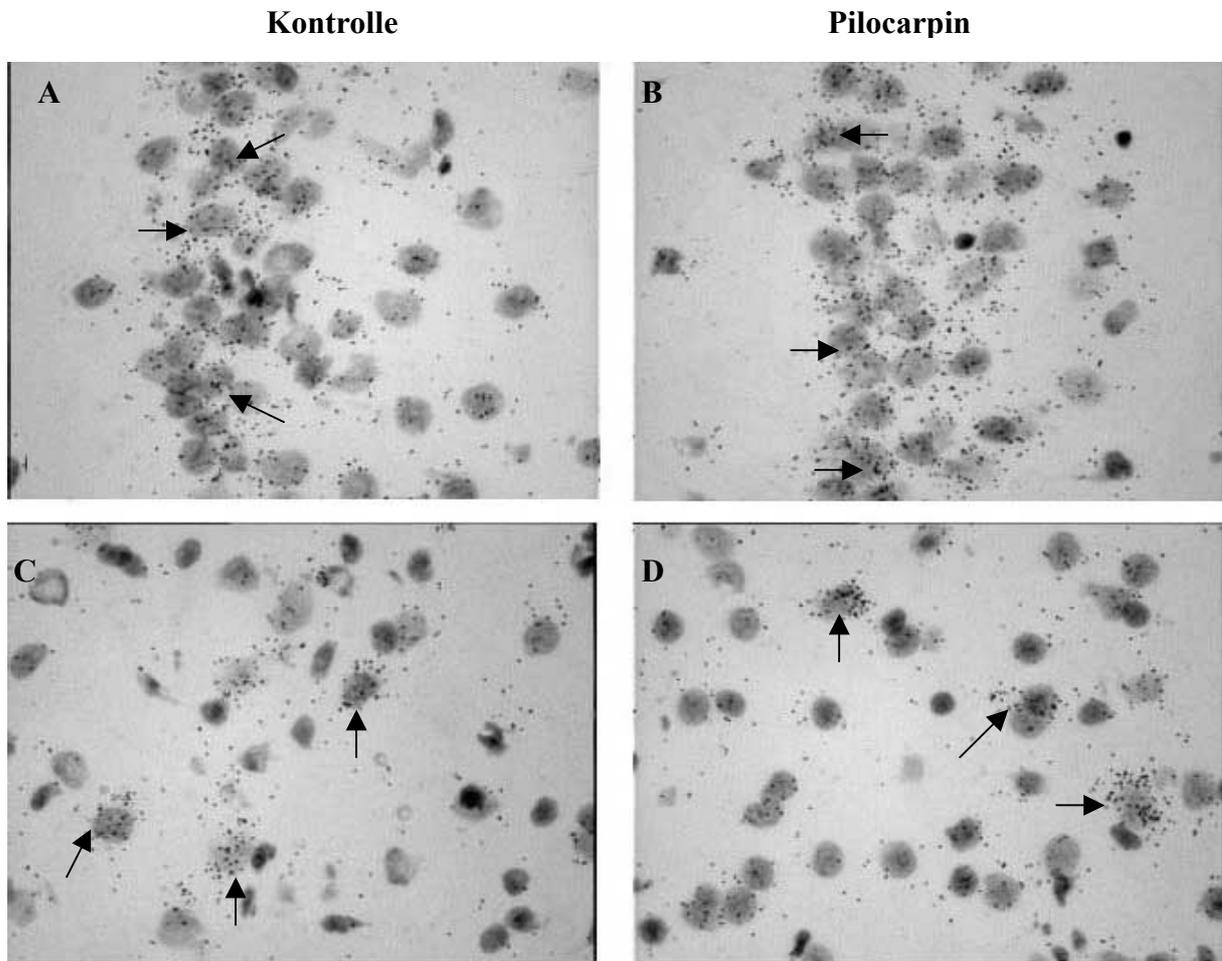
Bereits in der Kontrolle zeigt sich eine starke basale AChE-Expression im Thalamus und Hypothalamus (Ncl. paraventricularis, Nucl. subthalamicus, Area hypothalami posterior, Nucl. arcuatus hypothalami). Eine deutliche AChE-Expression besteht in der Kontrolle zudem in der Amygdala und den verschiedenen Feldern des Hippokampus mit Akzentuierung der CA1-CA3-Regionen. Eine schwächere Expression findet sich im gesamten Kortex mit Akzentuierung in den Schichten II/III und V.

Nach muskarinergem Stimulation bleibt dieses Expressionsmuster für den Zeitraum von 75 min unverändert. Auch in der hochauflösende mikroskopische Analyse der AChE-Expression der hippocampalen CA1-Region und der Schicht V des Kortex (Abb. 2.8) zeigt sich kein Unterschied in der Intensität der AChE-Expression von Pilocarpin-behandelten Tieren und Kontrolle.



**Abb. 2.7: Analyse der AChE-Expression nach Aktivierung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren *in-vivo* durch *in-situ*-Hybridisierung:**

Gehirnschnitte von Versuchstieren, an denen muskarinerge Stimulation gezeigt werden konnte sowie Gehirnschnitte von Kontrolltieren wurden mit rAChE-spezifischer antisense- (**A und B**) und sense-RNA-Sonden (**C und D**) hybridisiert um die Expression des AChE-Gens zu untersuchen. Es zeigt sich bereits in der Kontrolle eine starke basale AChE-Expression im Thalamus und Hypothalamus (Ncl. paraventricularis *PF*, Ncl. subthalamicus *STh* Area hypothalamie posterior *PH*, Ncl. arcuatus hypothalamie *Arc*). Eine deutliche Expression besteht zudem in der Amygdala *ad* und den verschiedenen Feldern des Hippokampus (CA 1-3, Gyrus dentatus *GD*) sowie schwächer im gesamten Kortex mit Akzentuierung in den Schichten II/III und V. Nach 75minütiger Stimulation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren mit Pilococarpin zeigt die AChE-Expression im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderung.



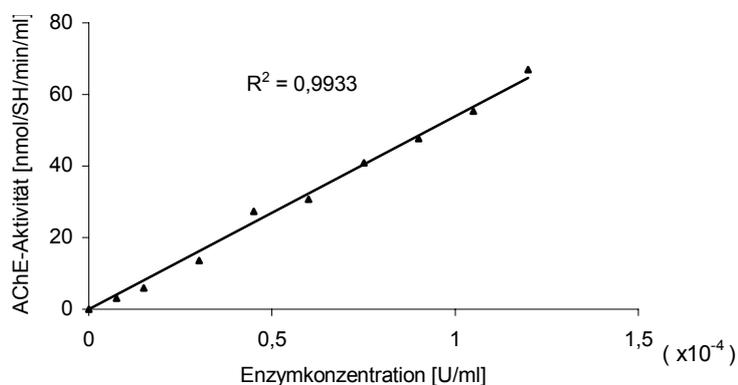
**Abb. 2.8: Mikroskopische Analyse der AChE-Expression in der hippocampalen CA1-Region und der kortikalen Schicht V nach Aktivierung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren:**

Nach Anfertigung von Photoemulsions-Dips der hybridisierten Gewebeschnitte konnte die Expression der AChE-mRNA mit hoher Auflösung unter dem Mikroskop analysiert werden. Hierbei wird anhand der entstandenen „grains“ (Silberbromidkristalle, die sich in der Photoemulsion lokal nach Einwirkung der  $\alpha$ -Strahlung bilden; siehe Pfeile) deutlich, dass es in den Neuronen der hippocampalen CA1-Region (**A und B**) und der kortikalen Schicht V (**C und D**) nach 75mütiger muskarinenger Stimulation zu keinem Anstieg der basalen AChE-Expression kommt. Die Gewebeschnitte wurden zur histologischen Analyse mit einem Kernfarbstoff (Mayers Hämalaun) gefärbt.

## 2.4 Bestimmung der AChE-Aktivität im Liquor cerebrospinalis von Alzheimer-Patienten nach Behandlung mit dem Muskarinrezeptoragonisten Talsaclidin

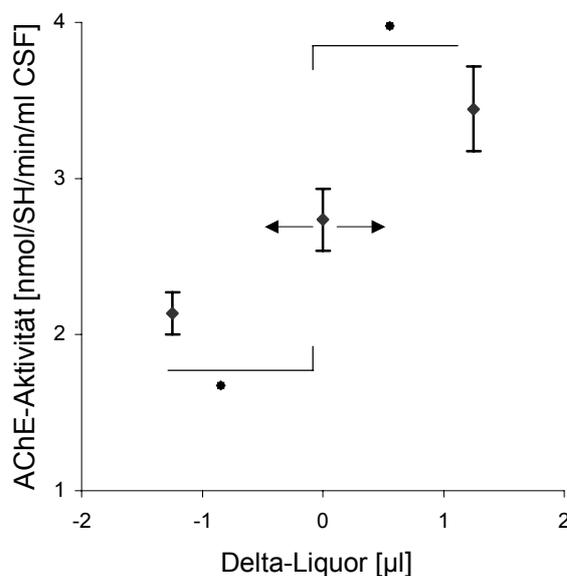
Im Rahmen einer multizentrischen klinischen und laborchemischen Studie zur Überprüfung des Wirkpotentials des muskarinen Agonisten Talsaclidin bei Patienten mit einer Alzheimer-Demenz (Hock et al., 2000; Hock et al., 2003a) konnte der Einfluss der muskarinergen Ersatztherapie auf die AChE-Aktivität *in-vivo* untersucht werden. In der doppel-blind und placebokontrollierten randomisierten Studie wurden Alzheimer-Patienten in unterschiedlichen Dosierungen über einen Zeitraum von 4 Wochen behandelt und die Veränderungen der AChE-Aktivität im Liquor cerebrospinalis bestimmt.

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Cholinesterasen konnte ein Verfahren verwendet werden, dass Cholinesteraseaktivität mittels spektrophotometrischer Detektion nach Katalyse des Substratanalogons Acetylthiocholin bestimmt (Ellman, 1961). Dieses Verfahren gilt als linear und sensitiv und wurde für die Bestimmung der Aktivität von Cholinesterasen in Rattengeweben standardisiert (Wilson et al., 1996; Padilla, 1999). Die Bestimmung der Aktivität der humanen AChE in Enzymlösungen mit bekannter Konzentration (s. Abb. 2.9) zeigt ebenfalls einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Aktivität ( $R^2=0,9933$ ). Zudem ist der Assay sensitiv; Änderungen von etwa 1  $\mu$ l Liquor können unter den von uns eingestellten Konditionen noch detektiert werden (s. Abb. 2.10).



**Abb. 2.9: Die Rate der Thiocholin-Produktion als Funktion der Enzymkonzentration:**

Die AChE-Aktivität korreliert positiv mit der Enzymkonzentration. AChE-Aktivität ist definiert als nmol Thiocholin /min/ml Liquor



**Abb. 2.10: Änderung der AChE-Aktivität in Abhängigkeit des eingesetzten Liquors:**

Änderungen des in der spektrophotometrischen Detektion eingesetzten Liquors von 1,25 µl können noch signifikant unterschieden werden. Ausgangswert ist 8,75µl (Delta-Liquor= 0). \* (p< 0,05). Dargestellt sind Durchschnittswerte und Standardabweichungen. AChE-Aktivität ist definiert als nmol Thiocholin /min/ml Liquor.

Zur Aktivitätsanalyse konnten Liquores von 35 Alzheimer-Patienten gewonnen werden (s. Tab.2.1). Wichtige Einschlusskriterien in die Studie waren die diagnostische Einordnung in „wahrscheinliche Alzheimer-Erkrankung“ nach den NINCDS-ADRDA-Kriterien (McKhann et al., 1984) und das Vorliegen eines leichten bis mittelgradigen dementiellen Syndroms (14-26 Punkte im „Mini Memental State“, Folstein et al., 1975). Ausgeschlossen wurden vaskuläre und alle sekundären Demenzen.

**Tab. 2.1: Ausgangsmerkmale der Patienten (n=35)**

| Merkmale: |         |
|-----------|---------|
| M/W       | 13/22   |
| Alter:    | 49-92 J |
| D-Alter   | 70,4 J  |
| MMS       | 14-27 P |
| D-MMS     | 21,6 P  |

Die AChE-Aktivität im Liquor cerebrospinalis wurde vor Beginn und nach vierwöchiger Behandlung bestimmt und Differenz errechnet (s. Tab 2.2 und Abb. 2.11).

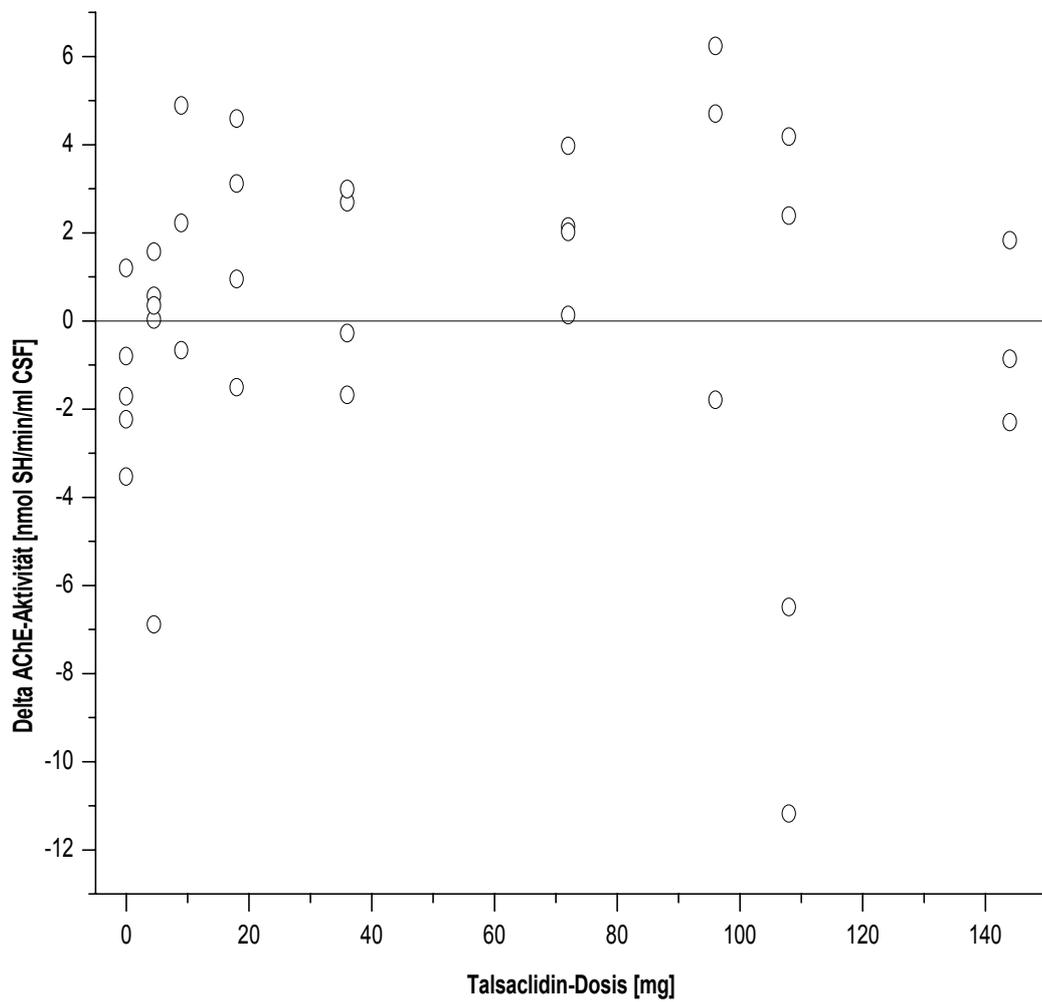
Sowohl der Mittelwert der AChE-Aktivität, als auch die Spannweite entsprechen etwa bisherigen Untersuchungen (Elble et al., 1987; Shen, 1998; Carroll et al., 1999) und publizierten Referenzwerten (Kluge et al., 2001).

Die statistische Analyse mittels „Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test“ zeigt, dass vierwöchige Behandlung mit dem Muskarinrezeptoragonisten Talsaclidin keinen signifikanten Anstieg oder eine signifikante Abnahme der AChE-Aktivität des Liquor cerebrospinalis zufolge hat.

**Tab. 2.2: Deskriptive Analyse der AChE-Aktivität im Liquor von Alzheimer Patienten vor und nach muskarinerger Behandlung**

| AChE-Aktivität (n=35) | Minimum | Maximum | Mittelwert | S.D. |
|-----------------------|---------|---------|------------|------|
| prä                   | 3,65    | 31,23   | 17,07      | 1,04 |
| post                  | 7,54    | 30,83   | 16,76      | 0,90 |
| delta                 | -6,24   | 11,18   | -0,31      | 0,61 |

prä: vor Behandlung. post: nach 4wöchiger Behandlung. delta: Differenz der AChE-Aktivität [AChE-Aktivität post - Aktivität prä]. AChE-Aktivität ist definiert als nmol Thiocholin /min/ml. S.D.: Standardabweichung



**Abb. 2.11: Differenz der AChE-Aktivität des Liquor cerebrospinalis von Alzheimer-Patienten nach Talsaclidingabe:**

Alzheimer Patienten (n=35) wurden für 4 Wochen mit unterschiedlichen Dosen Talsaclidin behandelt: 4,5 mg (n=5), 9 mg (n=3), 18 mg (n=4), 36 mg (n=4), 72 mg (n=4), 96mg (n=3), 108 mg (n=4), 144 mg (n=3) und Placebo-Behandlung (n=5). Vor und nach Behandlung wurde die AChE-Aktivität bestimmt. Delta-AChE-Aktivität ist definiert als [AChE-Aktivität post – AChE-Aktivität prä] in nmol Thiocholin /min/ml Liquor.

## 3 DISKUSSION

### 3.1 Untersuchung der AChE-Expression im zellulären System

Zur Untersuchung von Genexpression sind einfache Systeme mit geringen inter-individuellen Variationen dienlich. HEK293 Zellen bieten den Vorteil, dass sie sich einfach kultivieren lassen und leicht identische Subpopulationen geschaffen werden können. Zur Untersuchung von muskarinrezeptorabhängiger Genexpression lässt sich diese Zelllinie leicht mit dem m1AChR transfizieren und exprimiert diesen dann stabil (von der Kammer et al., 1998). Die Aktivierung muskarinischer Rezeptoren kann durch Zugabe des Agonisten in das Zellkulturmedium erreicht werden. Darüber hinaus kann durch die Überexpression des m1-Rezeptors eine deutlich stärkere zelluläre Antwort erzielt werden, welche die Identifizierung muskarinrezeptorabhängiger Gene erleichtert.

Die Wahl der HEK293-Zelllinie als Grundlage für die Analyse neuronal exprimierter Gene ist allerdings nicht unumstritten: Da Nierenzellen endogen keine muskarinischen Rezeptoren exprimieren und ontogenetisch ein vollkommen verschiedenes Differenzierungsschema als Neuronen durchlaufen, kann angezweifelt werden, dass sie als Modellsystem zur Untersuchung cholinerg Neurotransmission geeignet sind. Bereits zuvor konnten aber Untersuchungen zur Signaltransduktion zeigen, dass die Kopplung der einzelnen mAChR-Subtypen an intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden in transfizierten HEK293-Zellen und neuronalen Zellen identisch ist (Peralta et al., 1988; Felder, 1995). Auch wurden cholinerg beeinflusste zellphysiologische Prozesse wie die Modulation der APP-Prozessierung (Nitsch et al., 1992; Farber et al., 1995) oder die Phosphorylierung des Tau-Proteins (Sadot et al., 1996; Genis et al., 1999) sowohl im ZNS als auch in mAChR-transfizierten Zelllinien nachgewiesen. Zudem konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von *egr1*, dessen Expression in m1-überexprimierenden HEK293-Zellen unter der Kontrolle des m1-Rezeptors steht (von der Kammer et al., 1998), auch in einer neuronalen Zellkultur muskarinrezeptorabhängig reguliert wird (s.u.). Neben *egr1*, werden auch die Gene *gig-2* und *cyr61*, nicht nur in HEK293m1-Zellen und neuronalen Zellkulturen muskarinrezeptorabhängig aktiviert, sondern auch *in-vivo* im ZNS muskarinerg reguliert (Albrecht et al., 2000; von der Kammer et al., 2001), so dass die Wahl dieses Zellkultursystems zumindest für Voruntersuchungen berechtigt erschien.

In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der unter muskarinergem Stimulus induzierbare Transkriptionsfaktor *egr1* in HEK293m1-Zellen einen kotransfizierten AChE-Promoter aktivieren kann (Nitsch et al., 1998; von der Kammer et al., 1998). Daraufhin wurde als erster Teilschritt untersucht, ob eine direkte Muskarinrezeptorstimulation in HEK293m1-Zellen über eine Aktivierung des AChE-Promoters hinaus zu einer Transkription von AChE-mRNA führt. Der Transkriptionsfaktor *egr1* wird in HEK293m1-Zellen nach muskarinergem Stimulus bereits nach 10 min induziert (von der Kammer et al., 1998), weshalb die Untersuchung der AChE-Expression nach 1h als sinnvoll erschien. Zuvor konnte die Aktivierung des m1-AChR durch Carbachol mittels APP-release-Assay und dem Nachweis der Aktivierung der *egr1*-Transkription durch „Northern-blot“ bestätigt werden. Die Induktion der neuronalen AChE-Expression (S-AChE) konnte reproduzierbar (n=2) durch Detektion mittels sequenzspezifischer Primer in einer semiquantitativer RT-PCR nachgewiesen werden (von der Kammer et al., 2001). Dabei wurde die Güte der RNA-Präparation und die Varianz der RT-Reaktion zwischen stimulierten Proben und Kontrolle durch einen internen endogenen Standard (GAPDH) abgeglichen. Eine Kontamination genomischer DNA konnte durch die Positionierung der Primer in unterschiedlichen Exons kontrolliert werden. Zudem wurde die präparierte RNA einer DNase-Behandlung unterzogen und bei der RT-Reaktion eine Leerprobe (ohne Reverse Transkriptase) angefertigt, die bei der PCR als Negativ-Kontrolle eingesetzt wurde.

Zur Überprüfung der Hypothese in einem neuronalen Zellmodell konnten primäre neuronale Zellkulturen, die endogen muskarinische Acetylcholinrezeptoren exprimieren (Brusa et al., 1995) verwendet werden. Die Analyse der neuronalen AChE-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR nach Behandlung mit dem Muskarinrezeptoragonisten Carbachol ergab sowohl für *egr1* als auch für AChE eine basale Expression. Da die RNA aus den primären Neuronen ebenso einer DNase-Behandlung unterzogen wurde und die sequenzspezifischen Primer auf verschiedenen Exonen positioniert worden sind, ist der Nachweis von *egr1*- und AChE-cDNA in der Kontrolle nicht als Verunreinigung mit genomischer DNA zu interpretieren. Eine basale Expression von AChE spiegelt vielmehr die Expression der AChE in Neuronen embryonaler Rattenhirne wieder. Abgesehen von der Terminierung cholinergischer Neurotransmission, wird eine starke AChE-Expression in dem sich entwickelnden Rattenhirn, auch in nicht cholinerg innervierten Arealen, mit einer postulierten Funktion dieses Enzyms im Rahmen der neuronalen Differenzierung, Synaptogenese und Zelladhäsion gesehen (Small et al., 1996; Soreq und Seidman, 2001).

In diesem Zusammenhang ist auch eine Expression von Acetylcholinesterase in primären Neuronen in Kultur beschrieben worden (Deshpande et al., 1995; Sharma und Bigbee, 1998). Auch *egr1* wird im Rahmen der Neurogenese exprimiert (Sukhatme et al., 1988; Rao und Brimijoin, 1995), was die basale Expression beider Gene in den von uns verwendeten primären Neuronen erklären könnte.

Im Gegensatz zu *egr1* konnte durch Behandlung der primären Neurone mit dem Muskarinrezeptoragonisten Carbachol kein Anstieg der AChE-Expression in einem Zeitraum von 1h erzielt werden, so dass ein späterer Zeitpunkt nach der Rezeptoraktivierung untersucht wurde um auch eine verzögerte Aktivierung der Expression zu erfassen, zumal die Konzentration an *egr1*-Protein in HEK293m1-Zellen erst 2h nach Muskarinrezeptorstimulation ihr Maximum erreicht (von der Kammer et al., 1998). Da an kortikalen Hirnschnitten der Maus gezeigt wurde, dass indirekte cholinerge Stimulation die Expression neuronale AChE-Isoform nicht beeinflusst, dafür aber die Expression der „readthrough“-AChE-Isoform (R-AChE) induzieren kann (Kaufer et al., 1998; Soreq und Seidman, 2001), wurden zudem die Primer so ausgewählt, dass sie eine Subtyp-unabhängige Detektion von AChE-cDNA ermöglichen. Die Exposition mit dem Muskarinrezeptoragonisten Carbachol im Zeitverlauf zeigt eine biphasische Verstärkung der *egr1*-Expression, wie sie bereits für HEK293m1-Zellen nach Muskarinrezeptorstimulation beschrieben wurde (von der Kammer et al., 1998). Die Verstärkung der *egr1*-Expression lässt sich durch den Muskarinrezeptoragonisten Atropin blockieren, was für eine spezifische Aktivierung der *egr1*-Expression über Muskarinrezeptoren spricht. Trotz der Stimulation der Muskarinrezeptoren und Aktivierung der *egr1*-Expression ließ sich im Gegensatz zu HEK293m1-Zellen keine Aktivierung der AChE-Expression in primären Neuronen detektieren, was folgende Gründe haben kann: Der AChE-Promotor in HEK293m1-Zellen zeigt kaum eine endogene Aktivität (Getman et al., 1995) und durch die Überexpression von m1-AChR lässt sich durch deren Stimulation eine starke rezeptorabhängige Signaltransduktion erreichen, während in sich differenzierenden Neuronen der AChE-Promotor bereits aktiv ist (Soreq und Seidman, 2001) und eine Aktivierung der Muskarinrezeptoren möglicherweise nicht ausreicht um die Promotoraktivität zu steigern. Zudem wurde für die Muskarinrezeptorstimulation mit Carbachol ein unselektiver Agonist verwendet, der neben dem m1AChR gleichermaßen die anderen auf Neuronen befindliche Subtypen stimuliert und dadurch im Hinblick auf die AChE-Expression auch inhibitorische Signalkaskaden aktivieren könnte. Darüber hinaus muss der AChE-Promoter in Mensch und Ratte nicht

den gleichen Regulationsmechanismen unterliegen. Während für den AChE-Promotor in HEK293m1-Zellen durch Kotransfektionsexperimente eine Aktivierung durch Muskarinrezeptorstimulation und *egr1*-Expression gezeigt werden konnte (von der Kammer et al., 1998), gibt es für den AChE-Promoter der Maus Hinweise, dass *egr1* repressive Effekte auf diesen hat (Li et al., 1993; Mutero et al., 1995).

### **3.2 AChE-Expression im ZNS von Säugern unter dem Einfluss von Cholinomimetika**

Ogleich der Vorteile von Zellkulturen, ist es unumgänglich Untersuchungen zum Einfluss von Muskarinrezeptoragonisten auf die AChE-Expression auf Hirngewebe zu übertragen, da es der zu untersuchenden physiologischen Situation am stärksten entspricht.

Da aus Voruntersuchen bekannt war, dass es in kortikohippokampalen Hirnschnitten der Maus *in-vitro* bereits nach 30 min zu einer starken Induktion der AChE-Expression kommt, wenn sie mit indirekt cholinomimetisch wirkenden AChE-Inhibitoren behandelt werden (Kaufer et al., 1998), wurde eine Untersuchung der AChE-Expression im ZNS von Ratten 75 min nach Behandlung mit mAChR-Agonisten vorgenommen, zumal somit eine Kontrolle einer erfolgten Muskarinrezeptorstimulation durch Untersuchung der *egr1*-Expression möglich war. Die Detektion der *egr1*- und AChE-mRNA erfolgte mit kontrollierten sequenzspezifischen „antisense“-Sonden, die ein charakteristisches Hybridisierungsmuster erzeugten, während die „sense“-Sonden erwartungsgemäß nur die unspezifische Bindung darstellten.

Durch eine Pilocarpininjektion konnte im ZNS von Ratten eine Induktion der *egr1*-Expression gezeigt werden. Die Lokalisation der *egr1*-mRNA im Gehirn (Mack et al., 1990; Schlingensiepen et al., 1991) sowie die Regulation durch cholinerge Neurotransmission (Hughes und Dragunow, 1994) wurde bereits zuvor beschrieben und bestätigte somit eine erfolgreiche muskarinerge Rezeptoraktivierung. Darüber hinaus konnten Strukturen identifiziert werden, die prinzipiell nach muskarinerger Aktivierung die *egr1*-mRNA exprimieren können und vor dem Hintergrund der Hypothese einer muskarinrezeptorabhängigen und *egr1*-vermittelten AChE-Expression von besonderem Interesse waren.

Erhöhte Expression der *egr1*-mRNA im Vergleich zur Kontrolle wurde in Neuronen des Kortex und in der Pyramidalzellschicht der hippokampalen CA1-Region beobachtet. Dieses Muster weist eine starke Ähnlichkeit mit den bereits 1994 von Hughes und

Dragunow publizierten Expressionsmustern der Transkriptionsfaktoren *egr1*, *egr2*, *c-fos* und *jun-B* auf (Hughes und Dragunow, 1994) und lässt sich aus dem Aufbau des cholinergen Systems erklären. Kortex und Hippokampus erhalten cholinerge Afferenzen aus dem basalen Vorderhirn (Mesulam et al., 1983) und exprimieren in den Zielregionen verschiedene muskarinische Acetylcholinrezeptor-Subtypen (Buckley et al., 1988; Levey et al., 1991; Levey et al., 1995). Der m1AChR wird stark in Kortex und Hippokampus exprimiert, wodurch eine Induktion der Genexpression von *egr1*, dass unter der Kontrolle des m1AChR's steht, in diesen Strukturen nicht verwunderlich ist.

Im Gegensatz zu *egr1* zeigt sich für die AChE im Rattenhirn eine deutliche Expression bereits in der Kontrolle, die sich zudem auch in der regionalen Verteilung zu *egr1* unterscheidet: Besonders stark ist die Expression in Kerngebieten des Thalamus und Hypothalamus sowie der Amygdala. Außerdem zeigt sich eine ausgeprägte Expression im Hippokampus und eine schwächere im Kortex. Diese regionale Verteilung und das unterschiedliche Ausmaß der AChE-Expression wurden bereits durch „Northern-Blotting“ und RT-PCR ermittelt (Hammond et al., 1994). Die basale AChE-Expression verändert sich durch Muskarinrezeptorstimulation in einem Zeitraum von 75 min nicht. Es zeigt sich auch keine Induktion der AChE-Expression in Regionen, die keine oder nur eine schwache basale AChE-Expression zeigen, aber postsynaptisch Muskarinrezeptoren exprimieren (Kortexschichten I, IV und VI oder der Gyrus Dentatus des Hippokampus). Das Gleiche gilt allerdings auch für *egr1*. Obwohl in diesem Tierexperiment offensichtlich Muskarinrezeptoren aktiviert wurden, kommt es zu einer unterschiedlich starken Expression von *egr1* in den verschiedenen Kortexschichten. Es zeigt sich eine Expression in den Schichten IV und VI und der CA1-Region des Hippokampus, nicht aber in der CA2- und CA3-Region und auch nicht im Gyrus dentatus oder den anderen Kortexschichten, obwohl diese Strukturen wie bereits erwähnt, muskarinische Rezeptoren exprimieren. Diese Ergebnisse bestätigen zwar, dass die *egr1*-Expression auch *in-vivo* durch cholinerge Aktivität regulierbar ist, darüber hinaus zeigt aber auch insbesondere die „fehlende“ Induktion der *egr1*-Expression in den besagten Strukturen, dass cholinerg innervierte Neuronen im ZNS keineswegs identische intrazelluläre Reaktion zeigen.

Unabhängig von der Frage ob mAChR-Agonisten eine AChE-Expression induzieren können, sind mehrere Mechanismen denkbar, die trotz Rezeptoranwesenheit über die histologisch variierende Expression eines rezeptorabhängigen Gens mitentscheiden können: Erstens ist das Expressionsniveau der einzelnen Rezeptoren sicherlich entscheidend für die intrazelluläre Antwort eines Neurons. Zweitens können intrazelluläre

Signalmoleküle wie z.B. PKA oder PKC verschiedene extrazelluläre Reize, die z.B. durch andere Rezeptoren vermittelt werden, integrieren und dementsprechend nur in Kombination mit anderen aktivierenden oder inhibitorischen Signalen die Expression eines Gens initiieren. Drittens könnten Differenzierungsprozesse einzelner Neuronen die individuelle Genexpression durch Stummschaltung ("silencing") variieren. Dabei wird die Abrufbarkeit der genetischen Information durch Assoziation der chromosomalen DNA mit Proteinen und durch Anordnung in höher geordneten Strukturen reguliert (Kass et al., 1997).

Neben diesen allgemeinen Überlegungen sind auch spezielle konzeptionelle und methodologische Einschränkungen unserer Untersuchung zu verschiedenen Aspekten zu bedenken:

Bisher wurde lediglich in einer Studie gezeigt, dass es durch Behandlung von Mäusen mit AChE-Inhibitoren *in-vitro* und *in-vivo* im Gehirn zu einer Induktion der „readthrough“-AChE-Isoform (R-AChE) auf transkriptionaler Ebene kommt, während die Transkriptionsrate insbesondere der „neuronalen“ AChE-Isoform (S-AChE) unverändert bleibt (Kaufer et al., 1998).

Bei unseren Untersuchungen wurden zur Erfassung der AChE-mRNA RNA-Sonden verwendet, die an den konstanten Sequenz-Bereich aller drei AChE-Isoformen binden und so eine Isoform-unabhängige Detektion erlaubten. Da sich bereits in der Kontrolle eine deutliche basale AChE-Expression zeigt, ist es möglich, dass durch die Isoform-unabhängige Detektion die ISH nicht sensitiv genug war um einen selektiven Anstieg der R-AChE zu detektieren, zumal ein durch AChE-Inhibitoren bedingter Anstieg dieser Isoform in den kortikalen Schichten II und V des Maushirn gezeigt wurde, also genau in den kortikalen Schichten, in denen sich bei unseren Untersuchungen höhere basale Level von AChE-mRNA zeigten als im übrigen Kortex. Aufgrund der starken basalen AChE-Expression wäre es zweckmäßig gewesen ein IgG-Saporin-Maus-Modell für die Untersuchung zu verwenden, da bei diesem selektiv die cerebralen cholinergen Projektionsfasern zerstört sind und somit die cholinerge Aktivität und die basale AChE-Aktivität nachweislich in Kortex und Hippokampus reduziert ist (Wiley et al., 1991; Nitsch et al., 1998).

Eine weitere methodologische Einschränkung ist das von uns verwendete Stimulationsparadigma, nachdem eine Muskarinrezeptorstimulation durch Pilocarpin erreicht werden sollte. Ohne Zweifel vermag Pilocarpin als muskarinerges Agonist mAChR's zu aktivieren, was sich auch in unseren Untersuchungen zeigt, aber ebenso wie

für Carbachol in unseren Zellkulturexperimenten, gilt auch für Pilocarpin, das es ein nicht selektiver Agonist ist und alle muskarinischen Rezeptoren gleichermaßen aktivieren kann (Jakubik et al., 1997) Obwohl der m1-Rezeptor der häufigste postsynaptische mAChR in cholinozeptiven Zielgebieten des basalen Vorderhirns in Säugern ist und sich eine Induktion der *egr1*-Expression zeigte, sind inhibitorische Effekte auf die AChE-Expression durch Stimulation anderer muskarinischer Rezeptortypen nicht auszuschließen. Um mögliche Artefakte durch Stimulation sämtlicher Subtypen muskariner Rezeptoren vorzubeugen und eine selektive m1-AChR- Stimulation zu erreichen, hätten beispielsweise die selektiven m1AChR-Agonisten AF150 oder Talsaclidin (Wienrich et al., 2001) eingesetzt werden können. Des Weiteren wäre es auch sinnvoll gewesen einen späteren Zeitpunkt nach der Rezeptoraktivierung zu untersuchen. Denn obwohl Kaufer et al. (1998) bereits 30 min nach Gabe von AChE-Inhibitoren einen Anstieg der AChE-Transkription verzeichnen konnten, haben „Differential-Display“-Screens gezeigt, dass nach etwa 60 min Rezeptorstimulation die meiste IEG, wie die Transkriptionsfaktoren *c-fos* und *egr1*, ihr Transkriptionsmaximum haben (von der Kammer et al., 2000) und die Aktivierung von „delayed“ oder „late genes“, insbesondere wenn postuliert, dass sie Transkriptionsfaktorvermittelt aktiviert werden, länger dauern dürfte. Allerdings haben frühere Untersuchungen zum Einfluss des AChE-Inhibitors Chlorpyrifos auf die zentralnervöse AChE-Expression (Chiappa et al., 1995) von Ratten mittels „Northern-Blot-Analysen“ über einen Zeitraum von mehreren Wochen keine Veränderung der AChE-Transkriptionsrate feststellen können. Interessanterweise konnte aber in dieser Studie ein dosisabhängiger Anstieg von AChE-Protein gezeigt werden. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob nicht unabhängig von einer Induktion der AChE-Expression, Mechanismen bestehen, die zu einer Akkumulation von funktionsfähigem AChE-Protein im ZNS führen, sei sie durch Muskarinrezeptoren oder andere Signaltransduktionssysteme bedingt. Denkbar sind eine reduzierte Rate der Degradation oder post-translationale Effekte, die zu einer gesteigerten Produktion führen. In dem Kontext der Diskrepanz zwischen AChE-mRNA-Level und detektierbarem Protein sind auch Befunde zu berücksichtigen, die für eine Abweichung zwischen Enzymaktivität und mRNA-Transkription in den verschiedenen Hirnstrukturen von Ratten sprechen (Hammond et al., 1994). So findet sich beispielsweise im Striatum eine sehr starke Enzymaktivität im Gegensatz zu einer vergleichsweise geringen AChE-Transkriptionsrate während im Mesencephalon und der Pons die Verhältnisse umgekehrt sind.

Diese Befunde zeigen, dass Untersuchungen zum Einfluss von Cholinomimetika auf die AChE-Expression daher auch immer parallel auf Transkriptionsrate, Protein-Gehalt und Enzymaktivität ausgerichtet sein müssen um Hypothesen zu einer negativen Rückkopplung der AChE-Expression zu unterstützen, zumal sowohl die Experimente von Kaufer et al (1998), als auch unsere Zell- und Tierexperimente sich auf die AChE-Transkription beschränken.

### **3.3 Einfluss von Cholinomimetika auf die AChE-Aktivität im Liquor cerebrospinalis vor dem Hintergrund der cholinergen Ersatztherapie des M. Alzheimer**

Da das Konzept der muskarinergen Regulation der AChE-Expression für die derzeit angewendete cholinerge Ersatztherapie wegen eines möglichen konsekutiven Anstieg der AChE-Expression einen limitierenden Faktor bedeuten könnte (Kaufer et al., 1998; Nitsch et al., 1998; von der Kammer et al., 1998; Soreq und Seidman, 2001), wurde im Rahmen einer multizentrischen klinischen und laborchemischen Studie zur Überprüfung des Wirkpotentials des zentralwirksamen und selektiven m1-Agonisten Talsaclidin bei Patienten mit einer Alzheimer-Demenz (Hock et al., 2000; Hock et al., 2003a) der Einfluss der muskarinergen Ersatztherapie auf die AChE-Aktivität *in-vivo* untersucht. Im Gegensatz zu Studien zum Einfluss von AChE-Inhibitoren auf die AChE-Aktivität (s.u.), gibt es nach unserem Wissen keine klinisch-experimentellen Untersuchungen zum Einfluss von direkten mAChR-Agonisten auf die AChE-Aktivität. Zur Detektion der AChE-Aktivität im Liquor wurde ein spektrophotometrischer Assay nach Ellman et al (1961) verwendet, der sich unter den von uns eingestellten Konditionen als sensitiv erwies und eine lineare Beziehung zwischen Enzymkonzentration und AChE-Aktivität ( $R^2=0,9933$ ) zeigte. Die bestimmten AChE-Aktivitäts-Level zeigen eine große Spannweite (3,65 - 31,32 nmol Thiocholin /min/ml), decken sich aber annähernd mit publizierten Referenzwerten (Kluge et al., 2001) und stimmen mit Ergebnissen aus anderen Untersuchungen überein (Elble et al., 1987; Shen, 1998; Carroll et al., 1999).

Die AChE-Aktivität von Liquores von Alzheimer-Patienten nach vierwöchiger Behandlung zeigte entgegen unserer Hypothese keinen Anstieg gegenüber unbehandelten. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu einigen Studien, die mit klinisch eingesetzten AChE-Inhibitoren wie Tacrin (Nordberg, 1999), Rivastigmin oder Galantamin (Davidsson et al., 2001) einen Anstieg der AChE-Aktivität feststellen konnten. Im Gegensatz zu

unserer Untersuchungen sind diese Untersuchungen allerdings alle Langzeitstudien von 6-12 Monaten Dauer. Möglicherweise ist ein chronischer cholinerges Einfluss nötig um eine Adaptation mit verstärkter AChE-Expression auszulösen. Es bleibt darüber hinaus fraglich, ob der Anstieg der AChE-Aktivität nach Behandlung mit AChE-Inhibitoren Ausdruck einer verstärkten mAChR-Stimulation und nachfolgenden Induktion der AChE-Expression ist. Da AChE-Inhibitoren indirekte cholinerge Agonisten sind, könnte eine erhöhte AChE-Aktivität auch Folge einer vermehrten Stimulation von nikotinergen AChR's sein, wie Untersuchungen zur Expression von *egr1* und AChE in Muskelzellen bzw. der Neuromuskulären Endplatte nach cholinerges bzw. elektrischer Stimulation zeigen (Abu-Shakra et al., 1994; Sketelj et al., 1998). Denkbar ist auch eine Akkumulation von AChE infolge verminderten Degradation durch Inhibierung von Proteinasen, wie es von einigen AChE-Inhibitoren bekannt ist (O'Brien, 1963). Daher sollte geprüft werden ob nicht ein langfristiger Einsatz von zentralwirksamen und selektiven M1-Agonisten zu einem Anstieg der AChE-Aktivität führt. Allerdings zeigen auch nicht alle Langzeitbehandlungen mit AChE-Inhibitoren einen Anstieg der AChE-Aktivität. Untersuchungen zu 12monatiger Behandlungen mit Rivastigmin konnten keine Zunahme der AChE-Aktivität nachweisen (Darreh-Shori et al., 2002). Interessanterweise wurde aber in dieser Studie durch Immunoblot-Analysen ein Anstieg des „readthrough“-AChE-Subtyps (R-AChE) bei gleichbleibendem Level des „neuronalen“-AChE-Subtyps (S-AChE) gezeigt. Dieser selektive Anstieg des „readthrough“-AChE-Subtyps (R-AChE) deckt sich mit dem transkriptionellen Anstieg der entsprechenden mRNA in Mäusehirn nach Behandlung mit Physostigmin (Kaufer et al., 1998), wirft aber wegen der unveränderten AChE-Aktivität die Frage auf, ob diese mögliche Rückkopplung ein limitierender Faktor der cholinergen Therapie ist. Darüber hinaus macht dieses Ergebnis wiederum deutlich, dass es für zukünftige klinisch-experimentelle Untersuchungen zum Einfluss von Cholinomimetika auf die AChE-Expression erforderlich ist, neben einer Detektion der AChE-Aktivität auch Veränderungen auf Protein-Ebene zu erfassen.

### **3.4 Ausblick**

Obwohl bisherige Untersuchungen nahe legen, dass eine mAChR-Aktivierung zu einer Induktion der AChE-Expression führt, entbehren sowohl Zell- und Tierexperimente als auch klinisch-experimentelle Studien den genauen Nachweis.

Auch in der vorliegenden Arbeit kann die Frage nicht abschließend beantwortet werden. Es konnte eine Induktion der AChE-Transkription nach Muskarinrezeptorstimulation nachgewiesen werden. Ob Anstieg der AChE-Transkription nach m1-Stimulation tatsächlich durch *egr1* vermittelt wird, müssen Antisense-Experimente klären, bei denen die Translation der *egr1*-mRNA verhindert wird, indem genspezifische Gegensinn-RNA (unter gleichen experimentellen Bedingungen) appliziert, die *egr1*-mRNA bindet und damit die Proteinsynthese behindert wird (Wu et al., 2002). Für weitere Untersuchungen zur AChE-Expression muss zudem die Tatsache Berücksichtigung finden, dass aktivitätsabhängige Genexpression ein Physiologischer Prozess ist, der sich über eine Transkription auch auf Proteinniveau manifestiert, so dass zusätzlich zum mRNA-Nachweis auch parallel die Detektion von AChE-Protein erfolgen muss. Sowohl für weitere *in-vitro* und *in-vivo* als auch für klinisch-experimentellen Studien sollte das Stimulationsparadigma selektive Muskarinrezeptoragonisten vorsehen um Fehlerquellen durch Aktivierung mehrerer Rezeptor-Subtypen zu minimieren und auch längere Stimulationszeiten bzw. chronische medikamentöse Behandlung berücksichtigen.

Vor dem Hintergrund der Frage, ob eine Behandlung mit Cholinomimetika, seien es AChE-Inhibitoren oder Muskarinrezeptoragonisten, aufgrund einer Hochregulierung der AChE zu Limitierung der Therapie führt, ist es für weitere Untersuchungen erforderlich, neben der AChE-Aktivität im Liquor auch AChE-Protein unter Berücksichtigung der verschiedenen Subtypen zu detektieren. Da es aber noch nicht genau geklärt ist, ob die AChE-Aktivität und AChE-Protein im Liquor auch die zentralnervöse AChE-Produktion in cholinergen und cholinozeptiven Hirnarealen widerspiegelt (Chubb et al., 1976; Rossner et al., 1998), sollte die AChE-Aktivität vorzugsweise direkt in diesen relevanten Hirnstrukturen bestimmt werden. Dies wird durch Darstellung mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Kombination von Magnetresonanz-Tomographie ermöglicht (Namba et al., 1999; Reed und Jagust, 1999; Herholz et al., 2000). Hierzu steht mit [Methyl- <sup>11</sup>C]N-methyl-piperidyl-4-acetat ein spezifischer AChE-Tracer zur Verfügung. Parallel müssen psychometrische Untersuchungen erfolgen, um bestimmen zu können, ob eine Veränderung der zentralnervös detektierten AChE-Aktivität auch tatsächlich mit der cholinomimetischen Behandlung und kognitiven Veränderungen korreliert.

## **4           METHODEN**

### **4.1        Methoden der Zellkultur**

#### **4.1.1      Transfektion von HEK293-Zellen**

Zur Transfektion von HEK293-Zellen wurden verschiedene kommerziell erhältlich Kits oder Reagenzien getestet. Die höchste Transfektionsrate wurde dabei mit FUGENE™6 erzielt, welches daher bevorzugt eingesetzt wurde.

#### **4.1.2      Anzucht und Kultivierung von HEK293m1-Zellen**

HEK293m1-Zellen wurden in Dulbecco's MEM/F12 Medium in Gegenwart von 10 % fötalem Kälberserum (FKS) gezüchtet und bei ausreichender Konfluenz 1:3 bis 1:10 verdünnt. Da die verwendete Zelllinie adhärent wächst, wurde zum Ablösen der Zellen von der Platte Trypsin/EDTA Lösung (2,5 g/l) verwendet. Die Zellkulturschalen wurden bei 37°C in 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert.

Zur Verbesserung der Adhärenz der Zellen wurden Zellkulturschalen zusätzlich mit Poly-D-Lysin beschichtet. Hierbei wurden die Zellkulturschalen mit einer 0,02 %igen Lösung Poly-D-Lysin in Boratpuffer (100 mM, pH 8,5) benetzt und nach 2 Stunden dreimal mit autoklaviertem H<sub>2</sub>O gewaschen.

Säugerzelllinien können durch Lagerung bei –180°C über mehrere Jahre hinweg gelagert werden. Hierzu wurden Zellen einer Schale durch Trypsin/EDTA Behandlung abgelöst, vorsichtig durch Zentrifugation konzentriert, in FKS/DMSO Gemisch (1:9) aufgenommen und in Aliquots von 1 ml in Einfrierröhrchen verteilt. Diese wurden langsam auf –70°C abgekühlt und danach in flüssigem Stickstoff bei –180°C gelagert. Bei Bedarf wurden Aliquots durch sehr rasches Aufwärmen auf 37°C und Verdünnen in einer Zellkulturschale mit 15 ml Medium in Anzucht genommen. Das Medium wurde danach gewechselt, sobald sich die Zellen am Boden der Zellkulturschale angeheftet hatten.

#### **4.1.3 Präparation und Kultivierung von primären Neuronen aus Kortex und Hippokampus embryonaler Ratten**

Primärzellkulturen von kortikalen und hippocampalen Neuronen der Ratte wurden nach dem Protokoll von Segal und Manor (1992) erstellt. Aus E18 Embryonen wurden die Kortex- und Hippokampus-Hemisphären präpariert, von den Hirnhäuten befreit, und in kalter HBSS Lösung aufgenommen. Nach Zugabe von 250 µg/ml Trypsin und 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurde eine DNase Behandlung (1 mg/ml) für 10 min bei 37°C durchgeführt. Die Gewebesuspension wurde danach mechanisch dissoziiert indem sie mehrfach durch Pasteurpipetten unterschiedlichen Durchmessers titriert wurde. Nach Filtration der Zellsuspension durch ein Nylonnetz (Maschenweite 25 µm) wurden die Zellen in Plattierungsmedium (MEM + 0,6 % Glucose + 10 % Pferdeserum) aufgenommen und in einer Dichte von ca.  $10^6$  Zellen pro Sechsllochplatte kultiviert. Nach drei Stunden wurde das Medium gegen Neuronenmedium (MEM + 0,6 % Glucose + Bottenstein's N2 supplements) ausgetauscht. Nach drei Tagen in Kultur wurde das Neuronenmedium mit 0.5 µM cytosin-β-arabinofuranoside-HCL (AracC) versetzt, um die Proliferation von Gliazellen zu unterbinden. Nach 7 Tagen in Kultur konnten die Zellen für Experimente verwendet werden.

#### **4.1.4 Durchführung von Zellkulturexperimenten und „APP-Release Assay“**

Zur Durchführung von Zellkulturexperimenten wurde das Medium 16 Stunden vor, sowie direkt vor dem durchzuführenden Experiment gegen DMEM/F12 ohne Serum getauscht. Die Substanzen der Wahl wurden in einem geringen Volumen DMEM/F12 (ohne Serum) aufgenommen und appliziert. Zur Überprüfung der Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden wurde die Sezernierung der Ektodomäne ( $APP_{as}$ ) des Zelloberflächen-moleküls APP (Amyloid Precursor Protein) analysiert. Hierzu wurden die konditionierten Medien der Zellkulturen nach Beendigung des Untersuchungszeitraumes durch Zentrifugation von Zellen und Zelltrümmern befreit, je 850µl mit 2,2 µl β-Mercaptoethanolösung versetzt und in einer Dot-Blot-Kammer auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Das in die konditionierten Medien sezernierte  $APP_{as}$  Molekül wurde durch Antikörperreaktion mit dem monoklonalen anti-APP-Antikörper 22C11 (1:1800 in TBST), sowie einem Peroxidase gekoppelten anti-Maus Antikörper mit

anschließender Chemilumineszenzreaktion (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) detektiert.

## **4.2 Isolierung und Analyse von RNA Extrakten**

### **4.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA**

Bei der Herstellung und Analyse von RNA Extrakten sind spezielle Vorsichtsmaßnahmen zu treffen, da diese Proben sehr leicht durch ubiquitär vorhandene Ribonucleasen degradiert werden. Sämtliche benutzte Glaswaren wurden vor Gebrauch für 8 Stunden bei 180°C gebacken, Plastikwaren bei 120°C. Lösungen wurden durch Zugabe des chaotropen Reagens Diethylpyrocarbonat (DEPC, 0,1 %ig) und anschließendes Autoklavieren behandelt.

Für die Isolierung von gesamt RNA aus Zellkulturen oder Geweben wurde das TRIZOL-Reagenz nach Herstellerprotokoll verwendet. Hierbei wurde der Zell- oder Gewebeaufschluß in TRIZOL-Reagenz (Gibco) mit einem Homogenisator (Ultraturrax) durchgeführt und die RNA nach Entfernen der Proteine und der genomischen DNA präzipitiert. Alternativ zu diesem Protokoll wurde auch RNA mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) isoliert.

Die RNA wurde jeweils in  $H_2O_{DEPC}$  aufgenommen und bei  $-80^{\circ}C$  gelagert. Die Konzentration der RNA wurde durch photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht einer Ribonucleinsäurekonzentration von 40  $\mu g/ml$ .

### **4.2.2 Auftrennung von RNA im Formaldehyd-Agarose Gel**

RNA wurde in einer horizontalen Elektrophoresekammer unter denaturierenden Bedingungen (1 % Agarose, 15 % Formaldehyd in 1 X MOPS-Puffer) in 1 X MOPS-Puffer aufgetrennt.

Hierzu wurden 5-20  $\mu g$  gesamt-RNA in einem Volumen von 8  $\mu l$   $H_2O$  aufgenommen und mit 2  $\mu l$  10 X MOPS-Puffer, 4  $\mu l$  Formaldehyd und 6  $\mu l$  Formamid versetzt. Jeder Ansatz wurde für 5 Minuten bei  $65^{\circ}C$  erhitzt, danach auf Eis gestellt und mit je 2  $\mu l$  10 X RNA-

Probenpuffer vermennt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 20 Volt für 12 Stunden.

#### **4.2.3 „Northern-Transfer“ von RNA auf Nylon Membranfilter**

Nach der Elektrophorese wurde das RNA-Gel zuerst mehrfach mit H<sub>2</sub>O gewaschen um das enthaltene Formaldehyd zu entfernen. Währendessen wurde nach Anleitung (beschrieben in Sambrook et al., 1989; Abbildung 7.2) ein Kapillartransfer vorbereitet. Das RNA-Gel wurde luftblasenfrei auf der in 10 X SSPE getränkten „Whatman 3MM“- Papier plaziert, nacheinander die Nylonmebran, 6 in 2 X SSPE getränkte- sowie 10 trockene Whatman papiere und ein Stapel Haushaltspapiere auf das Gel gelegt und der Stapel mit einem Gewicht von 500 g beschwert. Der Kapillartransfer erfolgte über Nacht. Zuletzt wurde die transferierte RNA auf der Nylonmembran im UV-Crosslinker (Stratagene) fixiert. Die Qualität der transferierten RNA wurde durch Färbung mit Methylenblaulösung überprüft.

#### **4.2.4 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden durch „random priming“**

Zur Detektion einzelner mRNAs (s. 4.3.5.) wurden sequenzspezifische Sonden erstellt, indem aufgereinigte cDNA-Fragmente mit Hilfe des ReadyPrime<sup>TM</sup>II Kits (Amersham Pharmacia Biotech) unter Verwendung von  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (NEN) repliziert und damit radioaktiv markiert wurden. Die markierten DNA-Fragmente wurden durch ProbeQuant-G50 Größenausschluss-chromatographiesäulen (Amersham Pharmacia Biotech) von den nicht eingebauten Nucleotiden getrennt.

#### **4.2.5 Hybridisierung von „Northern-Blots“**

Als hervorragendes Hybridisierungsreagenz hat sich die ExpressHyb<sup>TM</sup> Lösung der Firma Clontech bewährt. Hierbei wird die Membran nach 30 minütiger Vorinkubation in ExpressHyb<sup>TM</sup> bei 68°C, mit  $2 \times 10^6$  cpm/ml einer  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP markierten DNA-Sonde in ExpressHyb<sup>TM</sup> für eine Stunde bei 68°C hybridisiert. Unspezifisch gebundene Sonde wurde durch Waschschrte mit 2 X SSC, 0,1 % SDS (4 X 10 Min, Raumtemperatur) und 0,1 X SSC (2 X 20 Min, 50°C) entfernt, bevor die Membran in feuchtem Zustand in

Plastikfolie verpackt und exponiert wurde. Zur Exposition wurden BioMaxMR Filme (Kodak) verwendet.

### **4.3 PCR und Klonierung von DNA-Fragmenten**

#### **4.3.1 Reverse Transkription**

Die Reverse Transkription (RT) ist eine Methode bei der RNA mittels Reverser Transkriptase in komplementäre DNA, sogenannte cDNA, umgeschrieben wird. Die cDNA-Synthese erfolgte mit 1 bis 5µg einer Gesamt-RNA Präparation, die zuvor einer DNase-Behandlung unterzogen wurde. Die RNA wurde in 9µl H<sub>2</sub>O-DEPC aufgenommen, zur cDNA-Synthese mit 2 µl 125µM Oligohexamere (random-Primer, Gibco BRL) vorsichtig vermengt und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert, 1 Minute auf Eis abgekühlt und kurz bei 4°C zentrifugiert. Nach Zugabe von 1 µl Rnase-Inhibitor RNaseOUT (Gibco BRL), 4 µl des 5xRT-Reaktionspuffers, 2 µl DTT (100 mM) und 1 µl eines 10 mM dNTP-Mixes wurde der Mix für 10 Minuten Raumtemperatur inkubiert, anschließend für 2 Minuten auf 42°C erhitzt und zentrifugiert. Nach Zugabe von 1µl Reverse Transkriptase (Superscript II, Gibco BRL) wurde die Reverse Transkription durch Inkubation bei 42°C gestartet. Nach 50 Minuten wurde der Transkriptionsansatz auf Eis gekühlt, kurz zentrifugiert, für 15 Minuten bei 70°C inkubiert und danach bei -20°C eingefroren. In einer konventionellen PCR Reaktion wurde 0,1 bis 1 µl dieser cDNA als Vorlage eingesetzt. Um sicherzustellen, dass die in der nachfolgenden, konventionellen PCR erzielten DNA-Fragmente zu einer mRNA komplementär sind und nicht aufgrund einer Kontamination durch genomische DNA entstanden, wurde parallel zur cDNA Synthese ein zweiter Ansatz zusammengestellt, der dieselben Komponenten mit Ausnahme des Enzyms Reverse Transkriptase enthielt. In der nachfolgenden konventionellen PCR wurde ebenfalls ein 0,1 bis 1 µl dieses Kontrollansatzes als Negativ-Kontrolle eingesetzt.

#### **4.3.2 RT-PCR**

Die RT-PCR ist eine *in-vitro*-Methode zur Amplifikation selektiver cDNA-Abschnitte durch die Katalyse der thermostabilen Taq-Polymerase. Hierzu wurde doppelsträngige "template"-DNA durch Erhitzen denaturiert und durch anschließendes Senken der

Temperatur die Hybridisierung („Annealing“) zweier Oligonukleotide („Primer“) ermöglicht. Durch Auswahl der Oligonukleotide wurde hierbei der zu amplifizierende Bereich bestimmt. Mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase konnten ausgehend von den hybridisierten Oligonukleotiden die jeweils komplementären DNA-Stränge synthetisiert werden. Durch mehrfache Wiederholung eines Zyklus aus „template“-Denaturierung, Primer-„Annealing“ und Synthese der Komplementärstränge konnte der zwischen den Oligonukleotiden befindliche Bereich exponentiell amplifiziert werden. Die Bedingungen für die Amplifikationen wurden probatorisch optimiert:

In einem Reaktionsgefäß wurden hierzu 4 – 40 ng cDNA aus Präparationen von Hirngewebe bzw. Zellkulturen als Vorlage eingesetzt und mit 2,5 µl des 10 X Reaktionspuffers, 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,5 µl eines jeden Primers (10 pmol/µl), 2,5 µl eines dNTP-Mixes (1mM), sowie 2,5 Einheiten der thermostabilen Taq-Polymerase (AB) mit H<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 25 µl vermenget.

In einer PCR-Maschine (PTC 200, MJ-Research bzw. Robocycler 96 Gradient Cycler, Stratagen) erwies sich folgendes Temperierungsprogramm für alle Amplifikationen als geeignet:

|           |                          |
|-----------|--------------------------|
| 94° C für | 4min                     |
| 94° C für | 45sec                    |
| 68° C für | 1min                     |
| 72° C für | 2min                     |
| Schritt 2 | (variable Zyklusanzahl*) |

\*s. Ergebnisse

### 4.3.3 Semiquantitative PCR

Die RT-PCR eignet sich auch zur Bestimmung von Genexpressionsstärken. Soll über die RT-PCR RNA-Mengen und damit Genexpressionsstärken ermittelt werden, muss gewährleistet sein, dass die Menge an amplifizierter DNA proportional zur Menge der ursprünglich im Probenmaterial vorhandenen gesuchten RNA ist.

Dies ist prinzipiell der Fall, solange die PCR noch nicht die Plateauphase erreicht. Daher wurden für die zu amplifizierenden cDNA's die Zyklusanzahlen ausgelotet, bei der eine Amplifikation gerade nachweisbar war bzw. die Plateauphase beginnt. In einer Versuchsreihe wurden dann parallele Reaktionen angesetzt um in einer aufsteigenden

Reihe in regelmäßigen Abständen (+ 3 Zyklen) die Reaktion zu unterbrechen. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend zur Detektion mit Ethidiumbromid in dieser aufsteigenden Reihe auf ein Agarosegel aufgetragen. Da jedoch die Amplifikationskinetik einer cDNA durch die Güte der RNA-Präparation (beispielsweise geringere Zellzahl, nicht-konfluenter Monolayer, viele tote Zellen und/oder RNasen-Kontamination) und Varianz der RT-Reaktion schwanken kann, wurde GAPDH, ein sogenanntes Haushaltsgen (Gene, die in allen Zellen und Gewebe zur jeder Zeit exprimiert werden) zur Kontrolle als interner endogener Standard mitamplifiziert. Reaktionsprodukte mit sehr schlechter RNA-Ausbeute und/oder mangelhafter RT-Reaktion und entsprechend schwachen GAPDH-Banden, blieben somit vergleichbar mit Proben guter RNA-Ausbeute.

#### 4.3.4 Anzucht und Lagerung von Bakterien zur Klonierung von DNA

Zur Anzucht von Bakterien wurde eine Kolonie eines ausgestrichenen Bakterienstammes oder eines Transformationsansatzes in 3-4ml LB-Medium in einem Reagenzglas angeimpft. Größere Kulturen von 150 ml LB-Medium wurden mit 500 µl einer Vorkultur angeimpft. Die Kulturen wurden für mindestens 12 Stunden bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, wobei durch Zugabe von Antibiotika auf Anwesenheit des erwarteten Plasmids selektioniert wurde.

|             |                           |           |
|-------------|---------------------------|-----------|
| Ampicillin  | (Stammlösung 100 mg/ml) : | 100 µg/ml |
| Kanamycin   | (Stammlösung 10 mg/ml) :  | 30 µg/ml  |
| Tetracyclin | (Stammlösung 5 mg/ml) :   | 25 µg/ml  |

Dauerkulturen der plasmidtragenden Bakterienstämme wurden durch Vermengung von 1 ml Bakterienkultur mit 300 µl 50 %iger steriler Glycerollösung erstellt, welche sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert wurden.

#### 4.3.5 Herstellung kompetenter Bakterien

Um DNA zwecks Klonierung in einen Bakterienstamm einzuführen und zu propagieren, müssen Zellen des Wirtsstammes zunächst kompetent gemacht werden. Hierzu wurde eine 20 ml Vorkultur SOB-Medium (+25 µg/ml Tetracyclin) mit einer einzelnen Kolonie des Bakterienstammes XL1blue angeimpft. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 400 ml SOB-Medium mit 4 ml einer sterilen 2 M Magnesiumlösung versetzt, mit 2 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>595</sub>) von ca. 0,5 auf

einem Schüttler kultiviert. Die gesamte Kultur wurde danach für zehn Minuten auf Eis gekühlt und alle nachfolgenden Schritte wurden ebenfalls bei 4°C mit vorgekühlten Materialien und Reagenzien durchgeführt. Die Kultur wurde durch Zentrifugation bei 3500 rpm und 4°C geerntet und das Pellet in 40 ml TB-Lösung aufgenommen und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 10 ml TB-Lösung aufgenommen erneut für 10 Minuten auf Eis inkubiert und danach mit 700 µl DMSO (Dimethylsulfoxid, Fluka) versetzt. Die Bakteriensuspension wurde in Aliquots von je 250 µl aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80°C.

### **4.3.6 Transformation von Bakterien**

Zur Transformation der erstellten kompetenten Bakterien wurden je 50 µl eines Aliquots mit 3-6 µl eines Ligationsansatzes oder 100 ng eines definierten Plasmids vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von exakt 45 Sekunden bei 42°C, wurden die Transformationsansätze für zwei Minuten auf Eis inkubiert bevor sie mit 250 µl SOB-Medium versetzt und für 45 Minuten bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert wurden. Die Transformationsansätze wurden auf geeignete, antibiotikahaltige Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert und dann die plasmidtragende Klone selektioniert.

### **4.3.7 Isolierung und Reinigung von Plasmid DNA durch alkalische Lyse**

Nach Anzucht einzelner plasmidtragender Klone konnte die Plasmid-DNA isoliert werden. Hierzu wurden grundsätzlich Plasmid-Mini- oder Plasmid-Midi-Kits der Firma Qiagen nach Herstellerbeschreibung verwendet. Mini-Präparationen wurden dabei aus 5 ml Kulturen, Midipräparationen aus 100 ml Kulturen gewonnen. Die DNA wurde zum Schluß jeweils in 20 bzw. 200 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Die Konzentration der DNA-haltigen Lösung wurde durch photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA sowie 30 µg/ml für einzelsträngige DNA.

## **4.4 Tierexperimente**

### **4.4.1 Tiere**

Für die Experimente wurden männliche Sprague Dawley Ratten verwendet.

### **4.4.2 Injektion von Substanzen**

Die Tiere wurden gewogen und anschließend intraperitoneal mit Pilocarpin (25 mg/kg) oder zur Kontrolle mit identischem Volumen PBS gespritzt. Die Tiere wurden in Ihre Käfige zurückgesetzt, nach 75 Minuten durch Dekapitation getötet und die Gehirne präpariert.

## **4.5 *in-situ*-Hybridisierung**

### **4.5.1 Vorbehandlung der Objektträger**

Saubere Objektträger wurden für 10 Sekunden in einer 2%igen Aminopropyltriethoxysilan Lösung (in Aceton) beschichtet und nacheinander zweimal in Aceton und dreimal in H<sub>2</sub>O gewaschen, getrocknet und abschließend staubfrei verpackt und gelagert.

### **4.5.2 Herstellung von Gefrierschnitten**

Bei –80°C gelagerte, adulte Gehirne wurden im Kryostaten (Reichert & Jung) mit Tissue-Tec O.C.T. (Miles) auf dem Objektisch eingebettet. Der Kryostat-Innenraum wurde auf eine Temperatur von –22°C gebracht, während der Objektischhalter auf –18°C temperiert wurde. Die vorbehandelten Objektträger wurden im Kryostat-Innenraum gelagert, bevor Schnitte von 16µm Dicke mit einem C-Messer erstellt wurden, welche durch kurzes Anwärmen des Objektträgers auf diesem aufgezogen werden konnten. Die Schnitte wurden bei –80°C gelagert.

#### 4.5.3 Herstellung von Riboproben durch *in-vitro*- Transkription

Zur Detektion einzelner Transkripte in Gewebeschnitten wurden radioaktiv markierte RNA Sonden erstellt, indem ein Plasmid, das ein cDNA Fragment der Wahl enthielt, auf der einen Seite des cDNA-Fragments linearisiert wurde. Durch Verwendung entweder der T3, T7 oder Sp6 RNA-Polymerase, welche eine direkt vor dem anderen Ende des cDNA-Fragmentes gelegenen Promotor erkennt, konnte *in-vitro* eine spezifische RNA synthetisiert werden. Je 0,2-0,5 µg des linearisierten Plasmids wurden in einem 20 µl Reaktionsansatz mit 1 µl der T7, T3 oder der Sp6 RNA-Polymerase (Boehringer Mannheim), 2 µl des entsprechenden 10 X Reaktionspuffers, 1 µl DTT (200 mM) sowie 1 µl RNase Inhibitor (RNaseOUT™, Gibco) versetzt. Die Ribonucleotide ATP, GTP und CTP wurden in einer Endkonzentration von 500 µM zugegeben, von UTP hingegen nur 7,5 µM. Durch Zugabe von 5 µl radioaktiv markiertem  $\alpha^{35}\text{S}$ -UTP und anschließende Inkubation bei 37°C für eine Stunde (Ausnahme: Sp6-haltige Reaktionsansätze werden bei 40°C inkubiert) wurden die RNA synthetisiert.

Die entstandenen Transkripte wurden von den nicht eingebauten Nucleotiden durch ProbeQuant-G50 Größenausschluss-chromatographiesäulen (Amersham Pharmacia Biotech) getrennt.

#### 4.5.4 *in-situ*-Hybridisierung

Zur Prähybridisierung der erstellten Gefrierschnitte wurden die Objektträger in passenden Halterungen einsortiert und zunächst für 5 Minuten in Paraformaldehydlösung (4 % in PBS) fixiert. Nach drei Waschschritten in PBS (je 5 Minuten) wurden die Gefrierschnitte acetyliert, indem sie in 0,1 M Triethanolamin-Lösung (pH 8,0) welche zuvor mit 0,025 %igem Essigsäureanhydrid versetzt wurden, für 10 Minuten inkubiert wurden. Nach einem Waschschrift in 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) wurden die Gefrierschnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (60 %, 80 %, 90 % und 97 %) dehydratisiert. Die trocknen Objektträger wurden nun in einer feuchten Kammer plaziert, die Schnitte mit 1 ml einer 55°C-warmen Prähybridisierungslösung überschichtet, die Kammer verschlossen und für 3 Stunden bei 55°C inkubiert.

Zur Hybridisierung wurde Prähybridisierungspuffer mit 10 % Dextransulfat versetzt, die *in-vitro* transkribierten Sonden in Hybridisierungspuffer auf 5000 cpm/µl verdünnt und auf 55°C temperiert. Nach Entfernung der Prähybridisierungslösung von den Objektträgern,

wurden diese mit 80 µl der verdünnten Sonde überschichtet und mit einem Deckgläschen zugedeckt. Die Objektträger wurden erneut in der feuchten Kammer plaziert, die Kammer verschlossen und bei 55°C für 18 Stunden inkubiert. Durch Waschschrte in 4 X SSC (4 x 5 Minuten bei Raumtemperatur) wurden zunächst die Deckgläschen von den Objektträgern sowie die ungebundene Sonde entfernt. Durch RNase A-Behandlung (40 µg/ml in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,5 M NaCl; 1 mM EDTA) für 30 Minuten bei 37°C sowie zwei darauffolgende Waschschrte in 2 X SSC bei 50°C wurden unspezifische Bindungen minimiert. Nach einer abschliessenden aufsteigenden Alkoholreihe (s.o.) wurden die Schnitte getrocknet und exponiert.

### **4.5.5 Methoden der Detektion**

Hybridisierungssignale wurden zunächst durch Exposition mit BioMaxMR Filmen (Kodak) detektiert. Für eine genauere histologische Analyse wurde NBT-2-Photoemulsion (Kodak) im Verhältnis 1:1 mit Wasser gemischt, im Wasserbad auf 45°C temperiert, die Objektträger für 5 Sekunden unter Vermeidung von Blasenbildung in die Emulsion eingetaucht, für drei Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und für 2 – 5 Wochen unter Luftabschluss im Kühlschrank exponiert. Die Entwicklung der Photoemulsion erfolgte mit Kodak Entwickler und Fixierer entsprechend den Angaben des Herstellers.

Abschließend wurden die Präparate mit Mayers Hämalaun gefärbt.

## **4.6 AChE-Aktivitätsbestimmung in Liquores von Alzheimer-Patienten**

### **4.6.1 Patienten und Liquoraufarbeitung**

#### Patienten:

Nach Genehmigung durch die zuständige Ethik-Kommission ( s. Hock et al., 2000 und Hock et al., 2003a) und ausführlicher schriftlicher Aufklärung wurden Patienten mit leichter bis mittelgradiger Alzheimer-Demenz zur Überprüfung des Wirkpotentials des selektiven und zentralwirksamen m1-Agonisten Talsaclidin (WAL 2014FU) in eine multizentrische und placebokontrollierte Studie eingeschlossen. Nach Genehmigung durch Herrn Prof. Dr. Nitsch, Herrn Prof. Dr. Hock und der Erlaubnis der Firma Boehringer

Ingelheim KG konnte zur Analyse der AChE-Aktivität Liquores von 35 Alzheimer-Patienten untersucht werden (s. Tab 2.5).

### Einschlusskriterien waren:

- männliche oder weibliche Patienten, Alter bis 85 Jahre
- Einordnung in „wahrscheinliche Alzheimer-Erkrankung“ nach dem NINCDS-ADRDA-Kriterien (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association, (McKhann et al., 1984)
- 14-26 Punkte im MMS (Folstein et al., 1975)
- Vorliegen eines MRT oder CCT, das nicht älter als 6 Monate ist
- der Patient muss in der Lage sein die Untersuchung zu absolvieren, zu hören, zu sprechen, zu lesen, zu schreiben und darf nicht unter wesentlichen Einschränkungen des Sensoriums leiden
- der Patient ist in der Lage Wesen, Tragweite und Bedeutung der Untersuchung richtig zu beurteilen und hat schriftlich sein Einverständnis erklärt
- eine betreuende Begleitperson, meist der nächste Angehörige, muss ebenfalls schriftlich ihr Einverständnis erklärt habe

### Als Ausschlusskriterien galten:

- vaskuläre Demenz
- alle sekundäre Demenzen
- hepatische Erkrankungen und/oder erhöhte Transaminasewerte
- klinisch relevante internistische Erkrankungen

### Liquoraufarbeitung:

Nach Entnahme der Liquores wurden diese umgehend bei – 80°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt. Am Tag der Analyse wurden die Liquores bei 4°C aufgetaut und für 20 min bei 4°C und 20000 rpm zentrifugiert.

#### **4.6.2 AChE-Aktivitätsassay**

Zur Bestimmung der Acetylcholinesteraseaktivität im Liquor cerebrospinalis wurde ein spectrophotometrischer Assay nach einer Methode von Ellman et al. (1961) angewendet.

Dieser Assay basiert auf der enzymatischen Spaltung des Substrats Acetylthiocholin durch Cholinesterasen. Das Chromogen DTNB reagiert bei pH-Werten über 8 quantitativ mit den durch die Spaltung zugänglichen SH-Gruppen. Dabei entsteht 3-Carboxy-4-nitrothiophenolat, das durch Absorption bei 415 nm spektroskopisch quantifiziert wird.

Von den zentrifugierten Liquores wurden je 10µl in Triplikaten auf einer Mikrotiterplatte geladen. Am Tag der Analyse wurde aus 0,1M Natriumphosphatpuffer (pH 8,0) und DTNB im Verhältnis 30:1 eine Lösung erstellt, 270 µl zum Liquor hinzugefügt und unter Mischung auf einem Schüttler zur Bindung endogener SH-Gruppen für 10 Minuten präinkubiert. Nach Zugabe von 10µl Acetylthiocholin wurde unter zuvoriger Mischung in 5minütigen Abständen die Absorption bei 415 nm bestimmt bis die Absorption nicht mehr linear mit der Zeit zunahm. Unter Zuhilfenahme einer Verdünnungsreihe des SH-Gruppenhaltigen Glutathion (1mM, 1-10µl) konnten die Änderungen der Absorptionswerte pro Minute nach Padilla et al. (1999) in Umsatz von SH-Gruppen pro Minute konvertiert werden ( 1mM Glutathion  $\equiv$  1nmol Glutathion/µl  $\equiv$  1nmol SH/µl).

Zur Analyse Beziehung zwischen Enzymkonzentration und Enzymaktivität wurde rekombinante humane AChE (Sigma) eingesetzt.

### **4.6.3 Statistische Analyse**

Die statistische Analyse der AChE-Aktivitäts-Differenzen wurden mittels „Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test“ vorgenommen.

## 5 MATERIALIEN

### Geräte

|                            |  |
|----------------------------|--|
| Binokular :                | Leica, MZ8   |
| Elektrophoreseapparaturen: | Easycast System, versch. Größen<br>Owl Separation Systems                  |
| Geldokumentationsanlage :  | Intas, Digit-Store DUO   |
| Geltrockner :              | H. Hölzel GmbH Drystar   |
| Homogenisator :            | IKA-Labortechnik, Ultra-Turrax T25   |
| Hybridisierungsöfen:       | Bachhofer  |
| Kryostat:                  | Reichert & Jung, Frigocut 2800   |
| Mikroskope :               | Zeiss, Telaval 31<br>Zeiss, Axiophot                                       |
| PCR-Cycler :               | PTC-200 (MJ Research) und Robocycler 96 Gradient<br>Cycler (Stratagene)    |
| Photometer :               | Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000  |
| Schüttler :                | Heidolph, Polymax 2040<br>New Brunswick, GIO Gyrotory Shaker               |
| Stromversorgungsgeräte :   | Rohde & Schwarz, Typ NGK<br>Biorad, 3000 Xi                                |
| Speed-Vac :                | Leybold-Hereaus, Lyovac GT2  |
| Szintillationsmessgerät :  | Beckman Instruments, LS1701  |
| UV-Crosslinker :           | Stratagene, Modell 2400  |
| UV-Leuchttisch :           | Herolab, Modell 2035   |
| Zentrifugen :              | Eppendorf, 5417C<br>Heraeus, Minifuge RF<br>Beckman Instruments, J2-21 M/E |

## Chemikalien

Chemikalien zum Ansetzen von Lösungen wurden von Merck, Sigma, Roth, Fluka, Serva und Gibco BRL bezogen.

### Feinchemikalien :

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| Acetylthiocholine               | Sigma      |
| Agarose : SeqKem LE             | FMC        |
| Ampicillin                      | Serva      |
| Atropin                         | Sigma      |
| Carbamoylcholin                 | Sigma      |
| DEPC                            | Sigma      |
| DTNB                            | Sigma      |
| Ethidiumbromid                  | Sigma      |
| GF109203X (bisindolmaleimide I) | Calbiochem |
| H7                              | Calbiochem |
| Ionomycin                       | Calbiochem |
| Kanamycin-disulfat              | Serva      |
| Pilocarpin                      | Sigma      |
| Polyacrylamid : LongRangerII    | FMC        |
| Tetracyclin-Hydrochlorid        | Merck      |

### Zellkulturchemikalien:

|   |                     |
|---|---------------------|
| Cytosin- $\alpha$ -arabinofuranoside-HCL<br>(AracC) | Sigma               |
| Dulbecco´s MEM/F12 Medium                           | Gibco BRL           |
| Fibronectin   | Gibco BRL           |
| FUGENE <sup>TM</sup> 6                              | Boehringer Mannheim |
| HBSS  | Gibco BRL           |
| Poly-D-Lysin  | Sigma               |

### Seren :

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| Fötales Kälberserum (FKS) | Gibco BRL |
| Pferdeserum               | Biother   |

Trypsin/EDTA Lösung (2,5 g/l)                      Gibco BRL

### Molekularbiologische Kits Anikörper und Enzyme

#### Molekularbiologische-Kits:

|  |                            |
|--|----------------------------|
| dNTPs und NTPs                             | Amersham Pharmacia Biotech |
| ExpressHyb™ Lösung                         | Clontech                   |
| Plasmid-Mini- und Midi-Kits                | Qiagen                     |
| ProbeQuant-G50                             |                            |
| Größenausschluss-<br>chromatographiesäulen | Amersham Pharmacia Biotech |
| ReadyPrime™II                              | Amersham Pharmacia Biotech |
| ZeroBlunt™ TOPO™                           |                            |
| PCR-Cloning Kit                            | Invitrogen                 |
| TRIZOL-Reagenz                             | Gibco BRL                  |

#### Enzyme:

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Acetylcholinesterase (human)   | Sigma   |
| Alkalische Phosphatase         | Boehringer Mannheim   |
| Reverse Transkriptasen:        |   |
| SuperscriptII                  | Gibco BRL   |
| Expand™                        | Boehringer Mannheim   |
| RNaseOUT                       | Gibco BRL   |
| RNeasy-Kit                     | Qiagen  |
| DNA-Polymerase :               |   |
| Taq                            | Advanced Biotechnologies  |
| DNaseI                         | Boehringer Mannheim   |
| DnaseI                         | Qiagen  |
| Restriktionsendonucleasen      | New England Biolabs, GibcoBRL,<br>Promega, MBI-Fermentas, Appligene |
| T4-DNA-Ligase                  | Boehringer Mannheim   |
| T7, T3 oder Sp6-RNA-Polymerase | Boehringer Mannheim   |

Antikörper :

|                                  |                     |
|----------------------------------|---------------------|
| anti APP (22C11)                 | Boehringer Mannheim |
| anti-Maus, Peroxidase-konjugiert | Dianova             |

Sonstiges

|                                   |                     |
|-----------------------------------|---------------------|
| BioMaxMR und MS Filme             | Kodak               |
| NBT-2-Photoemulsion               | Kodak               |
| Mayers Hämalaun                   | Merck               |
| Entwickler D19 und Fixierer       | Kodak               |
| Membranfilter : Type VS 0,0025 µm | Millipore           |
| Nitrocellulosemembranen           | Schleicher & Schüll |
| Nylonmembranen                    | Schleicher & Schüll |
| Tissue-Tec O.C.T.                 | Miles               |
| 3MM Papier                        | Whatman             |

Lösungen

LB-Medium

|      |              |
|------|--------------|
| 10 g | Trypton      |
| 5 g  | Hefe-extrakt |
| 10 g | NaCl, pH 7,5 |

SOB-Medium

|        |              |
|--------|--------------|
| 20 g   | Trypton      |
| 5 g    | Hefe-extrakt |
| 10 mM  | NaCl         |
| 2,5 mM | KCl          |

NZY-Medium

|      |                            |
|------|----------------------------|
| 10 g | Casein Hydrolysat          |
| 5 g  | Hefe-extrakt               |
| 5 g  | NaCl                       |
| 2 g  | MgSO <sub>4</sub> , pH 7,5 |

TB-Lösung

|        |                   |
|--------|-------------------|
| 10 mM  | PIPES             |
| 15 mM  | CaCl <sub>2</sub> |
| 250 mM | KCl               |

2 M Magnesiumlösung

|     |                   |
|-----|-------------------|
| 1 M | MgSO <sub>4</sub> |
| 1 M | MgCl              |

Kanamycin-Stammlösung

|          |           |
|----------|-----------|
| 10 mg/ml | Kanamycin |
|----------|-----------|

## Materialien

---

### Ampicillin-Stammlösung

100 mg/ml Ampicillin

### Tetracyclin-Stammlösung

5 mg/ml Tetracyclin  
in Ethanol

### 10 X TAE

2 M Tris  
2 M Essigsäure  
50 mM EDTA, pH 8,0

### 5 X TBE

0,45 M Borsäure  
0,45 M Tris  
10 mM EDTA, pH 8,0

### 10 X TBST

25 mM Tris/HCl, pH 7.4  
140 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
0,1 % Tween20

### 6 X DNA-Probenpuffer

30 % Glycerol  
0,25 % Bromphenolblau  
0,25 % Xylencyanol FF

### 10 X RNA-Probenpuffer

50 % Glycerol  
1 mM EDTA<sub>DEPC</sub>, pH 8,0  
0,25 % Bromphenolblau  
0,25 % Xylencyanol FF

### Formamid-Probenpuffer

98 % Formamid  
10 mM EDTA, pH 8,0  
0,25 % Bromphenolblau  
0,25 % Xylencyanol FF

### 20 X SSC

3 M NaCl  
0,3 M NaCitrat

### 10 X PBS

1,37 M NaCl  
27 mM KCl  
100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7,4

### 10 X SSPE

3 M NaCl  
0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
25 mM EDTA

### Boratpuffer

100 mM Borsäure, pH 8,5

### 10 X MOPS-Puffer

400 mM Mops, pH 7,0  
10 mM NaOAc  
10 mM EDTA, pH 8,0

### Denaturierungslösung

0,5 M NaOH  
1,5 M NaCl

## Materialien

---

### Neutralisierungslösung

0,5 M Tris/HCl, pH 7,4

1,5 M NaCl

### SM-Puffer

100 mM NaCl

10 mM MgSO<sub>4</sub>

50 mM Tris/HCl, pH 7,5

0,01 % Gelatine

### Church-Puffer

0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2

1 mM EDTA, pH 8,0

7 % SDS

1 % BSA

### Paraformaldehydlösung

4 % Paraformaldehyd

(in PBS)

### Acetylierungslösung

0,1 M Triethanolamin, pH 8,0

0,025 % Essigsäureanhydrid

### RNase A-Puffer

1 mM EDTA

0,5 M NaCl

10 mM Tris/HCl, pH 7,5

40 µg/ml RNaseA

### Prähybridisierungslösung

50 % Formamid

5 X Denhardt's Reagenz

0,66 M NaCl

0,25 M PIPES

0,25 M EDTA, pH 6,8

0,2 % SDS

10 mM DTT

250 µg/µl Heringsspermien DNA

250 µg/µl Hefe tRNA

### Hybridisierungslösung

10 % Dextransulfat

in Prähybridisierungslösung

### 100 X Denhardt's Reagenz

2 % Ficoll

2 % Polyvinylpyrrolidon

2 % BSA

## Nukleinsäuren

### Primer

Primer zur PCR wurden von Metabion bezogen:

#### neuronale hAChE-Isoform:

5'ACGTCTTTGAACACCGTGCTTC                      3'TAGTGGTCGAACTGGTTCTTCC

#### neuronale rAChE-Isoform:

5'TCTTTGCTCAGCGACTTA                      3'GTCACAGGTCTGAGCA

#### konstanter rAChE-Bereich:

5'AAGCCCCTGGCAATGTAGGT                      3'AAGCCTGGGACCCCGTAAAC

#### hegr1:

5'ATGGACAACCTACCCTAAGCTGG                      3'AGCACCTTCTCGTTGTTTCAGAG

#### regr1:

5'GAACAACACTCTGACACATGCTC                      3'GGCTCTGAGATCTTCCATCTGACC

#### hGAPDH:

5'CATGTTCGTCATGGGTGTGAAC                      3'GAGCTTGACAAAGTGGTTCGTTG

#### rGAPDH:

5'GTCTTCACCACCATGGAGAAGGC                      3'GGCTACACTGAGGACCAGGTTGTC

wurden von der Firma metabion GmbH bezogen

### Radioaktiv markierte Nukleotide

$\alpha$ -32P-dCTP (>3000 C/mmol)

$\alpha$ -35S-dATP(1250 C/mmol)

$\alpha$ -35S-UTP (1250 C/mmol)

wurden von der Firma NEN bezogen.

Vektoren

|                    |            |
|--------------------|------------|
| pBSIIKS+           | Stratagene |
| pEGFP-N1, pEGFP-C1 | Clontech   |
| pCR-bluntII-TOPO™  | Invitrogen |

Weitere Nucleinsäuren

|                               |                     |
|-------------------------------|---------------------|
| DNA-Molekulargewichtsstandard | Boehringer Mannheim |
| DNA-Molekulargewichtsstandard | Boehringer Mannheim |
| Heringsspermien-DNA           | Stratagene          |
| Hefe-tRNA                     | Boehringer Mannheim |

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Vor dem Hintergrund der Arbeitshypothese einer Muskarinrezeptor-vermittelten Induktion der AChE-Expression und einer damit möglicherweise verbundenen Limitierung der cholinergen Pharmakotherapie des M. Alzheimer wurde der Einfluss von muskarinergen Agonisten auf die Genexpression der AChE im Zell- und Tiermodell sowie in Alzheimer-Patienten untersucht. In Anlehnung an *in-vitro*-Experimente mit HEK293-m1-Zellen, die durch muskarinerge Stimulation einen kotransfizierten AChE-Promoter unter Vermittlung des muskarinerg induzierbaren Transkriptionsfaktors *egr1* aktivieren, konnte mittels RT-PCR-Analysen in dieser Zelllinie gezeigt werden, dass eine Stimulation des m1-AChR über die Aktivierung des Promotors hinaus zu einer Transkription einer AChE-Isoform führt, die vorwiegend im ZNS von Säugern exprimiert wird. In Zellkulturen von primären Neuronen der Ratte ist sowohl *egr1* als auch diese sog. „neuronale“ AChE-Isoform bereits basal exprimiert. Durch mAChR-Stimulation zeigt sich zwar ein Anstieg der *egr1*-mRNA-Level, die Transkriptionsrate der AChE bleibt aber innerhalb einer Stunde unverändert. Unter Berücksichtigung des alternativen Splicings der AChE-prä-mRNA und eines beschriebenen indirekt cholinerg induzierten und selektiven Anstiegs der Transkription der sog. „readthrough“ AChE-Isoform, wurde die Primerkombination für die RT-PCR so gewählt, dass sie den konstanten Bereich aller bekannten AChE-Isoformen amplifizieren kann um eine mögliche Induktion jedes Subtyps erfassen zu können. Innerhalb einer bis zu dreistündigen mAChR-Stimulation zeigt sich zwar ein für *egr1* typischer biphasischer Anstieg der Transkription, die AChE-mRNA-Level dagegen, bleiben unverändert. Um den Einfluss von mAChR-Agonisten auf die AChE-Expression im ZNS zu untersuchen wurden Ratten muskarinerg-pharmakologisch behandelt und frontale Gehirnschnitten durch *in-situ*-Hybridisierung analysiert. Die mAChR-Stimulation konnte durch eine Induktion der *egr1*-Transkription in Kortex und Hippokampus nachgewiesen werden. Allerdings zeigt sich bereits in der Kontrolle eine starke basale AChE-Expression in zahlreichen cholinerg innervierten kortikalen und subkortikalen Strukturen. Nach muskarinenger Stimulation bleibt dieses Expressionsmuster für den Zeitraum über einer Stunde unverändert. Im Rahmen einer klinischen Studie zur Überprüfung des Wirkpotentials des muskarinergen Agonisten Talsaclidin bei Alzheimer-Patienten konnte auch der Einfluss von mAChR-Agonisten auf die AChE-Aktivität auch *in-vivo* untersucht werden. Mittels spektrophotometrischer Analyse der AChE-Aktivität konnte nach vierwöchiger Behandlung aber keine signifikante Veränderung der AChE-Aktivität nachgewiesen werden.

## 7 LITERATUR

- Abe K, Inokawa M, Kashiwagi A, Yanagihara T (1998) Amnesia after a discrete basal forebrain lesion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65:126-130.
- Abu-Shakra SR, Cole AJ, Adams RN, Drachman DB (1994) Cholinergic stimulation of skeletal muscle cells induces rapid immediate early gene expression: role of intracellular calcium. *Brain Res Mol Brain Res* 26:55-60.
- Albrecht C, von Der Kammer H, Mayhaus M, Klaudiny J, Schweizer M, Nitsch RM (2000) Muscarinic acetylcholine receptors induce the expression of the immediate early growth regulatory gene CYR61. *J Biol Chem* 275:28929-28936.
- Alexander MP, Freedman M (1984) Amnesia after anterior communicating artery aneurysm rupture. *Neurology* 34:752-757.
- Baxter MG, Chiba AA (1999) Cognitive functions of the basal forebrain. *Curr Opin Neurobiol* 9:178-183.
- Benzi G, Moretti A (1998) Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease? *Eur J Pharmacol* 346:1-13.
- Brann MR, Ellis J, Jorgensen H, Hill-Eubanks D, Jones SV (1993) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes: localization and structure/function. *Prog Brain Res* 98:121-127.
- Brusa R, Gamalero SR, Genazzani E, Eva C (1995) In primary neuronal cultures muscarinic m1 and m3 receptor mRNA levels are regulated by agonists, partial agonists and antagonists. *Eur J Pharmacol* 289:9-16.
- Buckley NJ, Bonner TI, Brann MR (1988) Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. *J Neurosci* 8:4646-4652.
- Carroll RT, Lust MR, Emmerling MR (1999) Beta-amyloid levels predict cholinesterase activity in human cerebrospinal fluid. *Neuroreport* 10:127-130.
- Chiappa S, Padilla S, Koenigsberger C, Moser V, Brimijoin S (1995) Slow accumulation of acetylcholinesterase in rat brain during enzyme inhibition by repeated dosing with chlorpyrifos. *Biochem Pharmacol* 49:955-963.
- Christie JE, Shering A, Ferguson J, Glen AI (1981) Physostigmine and arecoline: effects of intravenous infusions in Alzheimer presenile dementia. *Br J Psychiatry* 138:46-50.
- Chubb IW, Goodman S, Smith AD (1976) Is acetylcholinesterase secreted from central neurons into the cerebral fluid? *Neuroscience* 1:57-62.

- Damasio AR, Graff-Radford NR, Eslinger PJ, Damasio H, Kassell N (1985) Amnesia following basal forebrain lesions. *Arch Neurol* 42:263-271.
- Darreh-Shori T, Almkvist O, Guan ZZ, Garlind A, Strandberg B, Svensson AL, Soreq H, Hellstrom-Lindahl E, Nordberg A (2002) Sustained cholinesterase inhibition in AD patients receiving rivastigmine for 12 months. *Neurology* 59:563-572.
- Davidsson P, Blennow K, Andreasen N, Eriksson B, Minthon L, Hesse C (2001) Differential increase in cerebrospinal fluid-acetylcholinesterase after treatment with acetylcholinesterase inhibitors in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 300:157-160.
- Davies P (1978) Studies on the neurochemistry of central cholinergic system in Alzheimer's disease. In: *Alzheimer's disease: Senile Dementia and Related Disorders* (Katzman RT, Bick KL, ed), pp 453-459. New York: Raven Press.
- Davis KL, Mohs RC, Tinklenberg JR, Pfefferbaum A, Hollister LE, Kopell BS (1978) Physostigmine: improvement of long-term memory processes in normal humans. *Science* 201:272-274.
- DeKosky ST, Harbaugh RE, Schmitt FA, Bakay RA, Chui HC, Knopman DS, Reeder TM, Shetter AG, Senter HJ, Markesbery WR (1992) Cortical biopsy in Alzheimer's disease: diagnostic accuracy and neurochemical, neuropathological, and cognitive correlations. Intraventricular Bethanecol Study Group. *Ann Neurol* 32:625-632.
- Deshpande SS, Smith CD, Filbert MG (1995) Assessment of primary neuronal culture as a model for soman-induced neurotoxicity and effectiveness of memantine as a neuroprotective drug. *Arch Toxicol* 69:384-390.
- Deutsch JA (1971) The cholinergic synapse and the site of memory. *Science* 174:788-794.
- Drachman DA (1977) Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a specific role? *Neurology* 27:783-790.
- Drachman DA, Leavitt J (1974) Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch Neurol* 30:113-121.
- Dunnett SB, Everitt BJ, Robbins TW (1991) The basal forebrain-cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions. *Trends Neurosci* 14:494-501.
- Eiden LE (1998) The cholinergic gene locus. *J Neurochem* 70:2227-2240.
- Elble R, Giacobini E, Scarsella GF (1987) Cholinesterases in cerebrospinal fluid. A longitudinal study in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 44:403-407.

- Ellman GC, Andres KD, Featherstone V, RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7:88-95.
- Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Hebert LE, Hennekens CH, Taylor JO (1989) Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *Jama* 262:2551-2556.
- Farber SA, Nitsch RM, Schulz JG, Wurtman RJ (1995) Regulated secretion of beta-amyloid precursor protein in rat brain. *J Neurosci* 15:7442-7451.
- Farlow M, Gracon SI, Hershey LA, Lewis KW, Sadowsky CH, Dolan-Ureno J (1992) A controlled trial of tacrine in Alzheimer's disease. The Tacrine Study Group. *Jama* 268:2523-2529.
- Felder CC (1995) Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *Faseb J* 9:619-625.
- Fibiger HC (1991) Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. *Trends Neurosci* 14:220-223.
- Flynn DD, Ferrari-DiLeo G, Mash DC, Levey AI (1995) Differential regulation of molecular subtypes of muscarinic receptors in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 64:1888-1891.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12:189-198.
- Foster N (1994) PET imaging. In: *Alzheimer's disease* (Terry RK, Bick R, KL, ed), pp 87-103. New York: Raven Press.
- Genis I, Fisher A, Michaelson DM (1999) Site-specific dephosphorylation of tau of apolipoprotein E-deficient and control mice by M1 muscarinic agonist treatment. *J Neurochem* 72:206-213.
- Getman DK, Mutero A, Inoue K, Taylor P (1995) Transcription factor repression and activation of the human acetylcholinesterase gene. *J Biol Chem* 270:23511-23519.
- Growdon JH (1997) Muscarinic agonists in Alzheimer's disease. *Life Sci* 60:993-998.
- Guela CM, MM (1994) Cholinergic systems and related neuropathological predilection in Alzheimer's disease. In: *Alzheimer's disease* (Terry RK, Bick R, KL, ed), pp 263-291. New York: Raven Press.
- Hammond P, Rao R, Koenigsberger C, Brimijoin S (1994) Regional variation in expression of acetylcholinesterase mRNA in adult rat brain analyzed by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10933-10937.

- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Harrell LE, Callaway R, Morere D, Falgout J (1990) The effect of long-term physostigmine administration in Alzheimer's disease. *Neurology* 40:1350-1354.
- Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, Teplow DB, Selkoe DJ (1999) Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci* 19:8876-8884.
- Hebert LE, Scherr PA, Beckett LA, Albert MS, Pilgrim DM, Chown MJ, Funkenstein HH, Evans DA (1995) Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population. *Jama* 273:1354-1359.
- Hedreen JC, Struble RG, Whitehouse PJ, Price DL (1984) Topography of the magnocellular basal forebrain system in human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 43:1-21.
- Herholz K, Bauer B, Wienhard K, Kracht L, Mielke R, Lenz MO, Strotmann T, Heiss WD (2000) In-vivo measurements of regional acetylcholine esterase activity in degenerative dementia: comparison with blood flow and glucose metabolism. *J Neural Transm* 107:1457-1468.
- Hock C, Maddalena A, Heuser I, Naber D, Oertel W, von der Kammer H, Wienrich M, Raschig A, Deng M, Growdon JH, Nitsch RM (2000) Treatment with the selective muscarinic agonist talsaclidine decreases cerebrospinal fluid levels of total amyloid beta-peptide in patients with Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 920:285-291.
- Hock C, Maddalena A, Raschig A, Muller-Spahn F, Eschweiler G, Hager K, Heuser I, Hampel H, Muller-Thomsen T, Oertel W, Wienrich M, Signorell A, Gonzalez-Agosti C, Nitsch RM (2003a) Treatment with the selective muscarinic m1 agonist talsaclidine decreases cerebrospinal fluid levels of A beta 42 in patients with Alzheimer's disease. *Amyloid* 10:1-6.
- Hock C, Konietzko U, Streffer JR, Tracy J, Signorell A, Muller-Tillmanns B, Lemke U, Henke K, Moritz E, Garcia E, Wollmer MA, Umbricht D, de Quervain DJ, Hofmann M, Maddalena A, Papassotiropoulos A, Nitsch RM (2003b) Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* 38:547-554.

- Hughes P, Dragunow M (1994) Activation of pirenzepine-sensitive muscarinic receptors induces a specific pattern of immediate-early gene expression in rat brain neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 24:166-178.
- Jakubik J, Bacakova L, El-Fakahany EE, Tucek S (1997) Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 52:172-179.
- Kandel ERS, J.H. Jessel, T.M. (2000) *Principles Of Neural Science*, 4th edition Edition: McGraw-Hill.
- Karczmar AG (1993) Brief presentation of the story and present status of studies of the vertebrate cholinergic system. *Neuropsychopharmacology* 9:181-199.
- Karpel R, Ben Aziz-Aloya R, Sternfeld M, Ehrlich G, Ginzberg D, Tarroni P, Clementi F, Zakut H, Soreq H (1994) Expression of three alternative acetylcholinesterase messenger RNAs in human tumor cell lines of different tissue origins. *Exp Cell Res* 210:268-277.
- Kass SU, Landsberger N, Wolffe AP (1997) DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* 7:157-165.
- Kaufer D, Friedman A, Seidman S, Soreq H (1998) Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature* 393:373-377.
- Kluge WH, Kluge HH, Hochstetter A, Vollandt R, Seidel F, Venbrocks R (2001) Acetylcholinesterase in lumbar and ventricular cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 305:55-63.
- Knapp MJ, Knopman DS, Solomon PR, Pendlebury WW, Davis CS, Gracon SI (1994) A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. The Tacrine Study Group. *Jama* 271:985-991.
- Knopman D, Schneider L, Davis K, Talwalker S, Smith F, Hoover T, Gracon S (1996) Long-term tacrine (Cognex) treatment: effects on nursing home placement and mortality, Tacrine Study Group. *Neurology* 47:166-177.
- Korczyn AD (2000) Muscarinic M(1) agonists in the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs* 9:2259-2267.
- Kurz A, Riemenschneider M, Drzezga A, Lautenschlager N (2002) The role of biological markers in the early and differential diagnosis of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*:127-133.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein

- WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6448-6453.
- Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR (1991) Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 11:3218-3226.
- Levey AI, Edmunds SM, Koliatsos V, Wiley RG, Heilman CJ (1995) Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J Neurosci* 15:4077-4092.
- Li Y, Camp S, Rachinsky TL, Bongiorno C, Taylor P (1993) Promoter elements and transcriptional control of the mouse acetylcholinesterase gene. *J Biol Chem* 268:3563-3572.
- Little A, Levy R, Chuaqui-Kidd P, Hand D (1985) A double-blind, placebo controlled trial of high-dose lecithin in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 48:736-742.
- Mack K, Day M, Milbrandt J, Gottlieb DI (1990) Localization of the NGFI-A protein in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 8:177-180.
- Malcolm PaB, NJM (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacological Reviews* 50:279-290.
- Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE (1993) Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10:243-254.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34:939-944.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Levey AI, Wainer BH (1983) Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 214:170-197.
- Modrek B, Lee C (2002) A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet* 30:13-19.
- Möller H (2000) Therapie psychiatrischer Erkrankungen. Stuttgart: Thieme.
- Mouradian MM, Mohr E, Williams JA, Chase TN (1988) No response to high-dose muscarinic agonist therapy in Alzheimer's disease. *Neurology* 38:606-608.

- Mutero A, Camp S, Taylor P (1995) Promoter elements of the mouse acetylcholinesterase gene. Transcriptional regulation during muscle differentiation. *J Biol Chem* 270:1866-1872.
- Nadler LS, Rosoff ML, Hamilton SE, Kalaydjian AE, McKinnon LA, Nathanson NM (1999) Molecular analysis of the regulation of muscarinic receptor expression and function. *Life Sci* 64:375-379.
- Namba H, Iyo M, Fukushi K, Shinotoh H, Nagatsuka S, Suhara T, Sudo Y, Suzuki K, Irie T (1999) Human cerebral acetylcholinesterase activity measured with positron emission tomography: procedure, normal values and effect of age. *Eur J Nucl Med* 26:135-143.
- Nilsson OG, Leanza G, Rosenblad C, Lappi DA, Wiley RG, Bjorklund A (1992) Spatial learning impairments in rats with selective immunolesion of the forebrain cholinergic system. *Neuroreport* 3:1005-1008.
- Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, Growdon JH (1992) Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 258:304-307.
- Nitsch RM, Rossner S, Albrecht C, Mayhaus M, Enderich J, Schliebs R, Wegner M, Arendt T, von der Kammer H (1998) Muscarinic acetylcholine receptors activate the acetylcholinesterase gene promoter. *J Physiol Paris* 92:257-264.
- Nordberg A, Almkvist E, Meuerling L (1999) Activity of acetylcholinesterase in CSF in Alzheimers' patients after treatment with tacrin. *Alzheimers Rep*:374-352.
- O'Brien R (1963) Organophosphates and carbamates. In: *Metabolic Inhibitors* (Hochster RQJ, ed), pp 205-241. New York: Academic Press.
- Ott A, Breteler MM, van Harskamp F, Claus JJ, van der Cammen TJ, Grobbee DE, Hofman A (1995) Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *Bmj* 310:970-973.
- Padilla SL, TL and Hunter,D (1999) Biochemical Measurement of Cholinesterase Activity. In: *Neurodegeneration Methods and Protocols* (Harry JaT, HA, ed), pp 237-245: Humana Press.
- Paterson D, Nordberg A (2000) Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol* 61:75-111.
- Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Ramachandran J, Capon DJ (1988) Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature* 334:434-437.

- Perry E, Walker M, Grace J, Perry R (1999) Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci* 22:273-280.
- Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Bergmann K, Gibson PH, Perry RH (1978) Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br Med J* 2:1457-1459.
- Price BH, Gurvit H, Weintraub S, Geula C, Leimkuhler E, Mesulam M (1993) Neuropsychological patterns and language deficits in 20 consecutive cases of autopsy-confirmed Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 50:931-937.
- Rao R, Brimijoin S (1995) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for acetylcholinesterase mRNA in rat brain. *Neurochem Res* 20:129-135.
- Reed BR, Jagust WJ (1999) Opening a window on cerebral cholinergic function: PET imaging of acetylcholinesterase. *Neurology* 52:680-682.
- Rodriguez-Puertas R, Pascual J, Vilaro T, Pazos A (1997) Autoradiographic distribution of M1, M2, M3, and M4 muscarinic receptor subtypes in Alzheimer's disease. *Synapse* 26:341-350.
- Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, Mohs R, Friedhoff LT (1998) A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology* 50:136-145.
- Rosler M, Anand R, Cicin-Sain A, Gauthier S, Agid Y, Dal-Bianco P, Stahelin HB, Hartman R, Gharabawi M (1999) Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial. *Bmj* 318:633-638.
- Rossner S, Bakinde N, Zeitschel U, Schliebs R, Bigl V (1998) Cerebrospinal fluid cholinesterases--markers for loss of cholinergic basal forebrain neurons? *Int J Dev Neurosci* 16:669-673.
- Sadot E, Gurwitz D, Barg J, Behar L, Ginzburg I, Fisher A (1996) Activation of m1 muscarinic acetylcholine receptor regulates tau phosphorylation in transfected PC12 cells. *J Neurochem* 66:877-880.
- Schlingensiepen KH, Luno K, Brysch W (1991) High basal expression of the zif/268 immediate early gene in cortical layers IV and VI, in CA1 and in the corpus striatum--an in situ hybridization study. *Neurosci Lett* 122:67-70.
- Segal M, Manor D (1992) Confocal microscopic imaging of  $[Ca^{2+}]_i$  in cultured rat hippocampal neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Physiol* 448:655-676.

- Selkoe DJ (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399:A23-31.
- Shahani N, Brandt R (2002) Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cell Mol Life Sci* 59:1668-1680.
- Sharma KV, Bigbee JW (1998) Acetylcholinesterase antibody treatment results in neurite detachment and reduced outgrowth from cultured neurons: further evidence for a cell adhesive role for neuronal acetylcholinesterase. *J Neurosci Res* 53:454-464.
- Shen J, Barnes CA, Wenk GL, McNaughton BL (1996) Differential effects of selective immunotoxic lesions of medial septal cholinergic cells on spatial working and reference memory. *Behav Neurosci* 110:1181-1186.
- Shen ZX (1998) CSF cholinesterase activity in demented and non-demented subjects. *Neuroreport* 9:483-488.
- Sims NR, Bowen DM, Davison AN (1981) [<sup>14</sup>C]acetylcholine synthesis and [<sup>14</sup>C]carbon dioxide production from [U-<sup>14</sup>C]glucose by tissue prisms from human neocortex. *Biochem J* 196:867-876.
- Sims NRB, DM (1987) Recent studies of other and of cholinergic neurochemical changes in early-onset Alzheimer's disease. In: *Cellular and molecular Basis of cholinergic function*. (Dowdall MH, JN, ed), pp 843-857. New York: VCH.
- Sitaram N, Weingartner H, Gillin JC (1978a) Human serial learning: enhancement with arecholine and choline impairment with scopolamine. *Science* 201:274-276.
- Sitaram N, Moore AM, Gillin JC (1978b) The effect of physostigmine on normal human sleep and dreaming. *Arch Gen Psychiatry* 35:1239-1243.
- Sketelj J, Crne-Finderle N, Strukelj B, Trontelj JV, Pette D (1998) Acetylcholinesterase mRNA level and synaptic activity in rat muscles depend on nerve-induced pattern of muscle activation. *J Neurosci* 18:1944-1952.
- Small DH, Michaelson S, Sberna G (1996) Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 28:453-483.
- Soreq H, Seidman S (2001) Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2:294-302.
- Steckler T, Keith AB, Wiley RG, Sahgal A (1995) Cholinergic lesions by 192 IgG-saporin and short-term recognition memory: role of the septohippocampal projection. *Neuroscience* 66:101-114.

- Sukhatme VP, Cao XM, Chang LC, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Ferreira PC, Cohen DR, Edwards SA, Shows TB, Curran T, et al. (1988) A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 53:37-43.
- Tariot PN, Schneider L, Porsteinsson AP (1997) Treating Alzheimer's disease. Pharmacologic options now and in the near future. *Postgrad Med* 101:73-76, 81, 84 passim.
- Tariot PN, Solomon PR, Morris JC, Kershaw P, Lilienfeld S, Ding C (2000) A 5-month, randomized, placebo-controlled trial of galantamine in AD. The Galantamine USA-10 Study Group. *Neurology* 54:2269-2276.
- Tariot PN, Cohen RM, Welkowitz JA, Sunderland T, Newhouse PA, Murphy DL, Weingartner H (1988) Multiple-dose arecoline infusions in Alzheimer's disease. *Arch Gen Psychiatry* 45:901-905.
- Taylor P, Radic Z (1994) The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34:281-320.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572-580.
- Thal LJ, Masur DM, Sharpless NS, Fuld PA, Davies P (1986) Acute and chronic effects of oral physostigmine and lecithin in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 10:627-636.
- von der Kammer H, Mayhaus M, Albrecht C, Enderich J, Wegner M, Nitsch RM (1998) Muscarinic acetylcholine receptors activate expression of the EGR gene family of transcription factors. *J Biol Chem* 273:14538-14544.
- von der Kammer H, Demiralay C, Andresen B, Albrecht C, Mayhaus M, Nitsch RM (2001) Regulation of gene expression by muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Symp*:131-140.
- von der Kammer H, Mayhaus M, Albrecht C, Andresen B, Klaudiny J, Demiralay C, Nitsch RM (2000) Regulation of gene expression by muscarinic acetylcholine receptors. A comprehensive approach for the identification of regulated genes. *Ann N Y Acad Sci* 920:305-308.
- Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, Lewis KW (1994) Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *Jama* 271:992-998.

- Wess J, Liu J, Blin N, Yun J, Lerche C, Kostenis E (1997) Structural basis of receptor/G protein coupling selectivity studied with muscarinic receptors as model systems. *Life Sci* 60:1007-1014.
- Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR (1981) Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol* 10:122-126.
- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215:1237-1239.
- Wienrich M, Meier D, Ensinger HA, Gaida W, Raschig A, Walland A, Hammer R (2001) Pharmacodynamic profile of the M1 agonist talsaclidine in animals and man. *Life Sci* 68:2593-2600.
- Wilcock GK, Esiri MM, Bowen DM, Smith CC (1982) Alzheimer's disease. Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. *J Neurol Sci* 57:407-417.
- Wiley RG, Oelmann TN, Lappi DA (1991) Immunolesioning: selective destruction of neurons using immunotoxin to rat NGF receptor. *Brain Res* 562:149-153.
- Wilson BW, Padilla S, Henderson JD, Brimijoin S, Dass PD, Elliot G, Jaeger B, Lanz D, Pearson R, Spies R (1996) Factors in standardizing automated cholinesterase assays. *J Toxicol Environ Health* 48:187-195.
- Winkler J, Suhr ST, Gage FH, Thal LJ, Fisher LJ (1995) Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. *Nature* 375:484-487.
- Wu SX, Wang W, Wang YY, Ni TS, Li YQ, Yew DT (2002) C-fos antisense oligodeoxynucleotide decreases subcutaneous bee venom injection-induced nociceptive behavior and fos expression in the rat. *Neurosignals* 11:224-230.
- Yankner BA (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 16:921-932.
- Yankner BA (2000) A century of cognitive decline. *Nature* 404:125.

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                   |  |
|-------------------|--|
| Abb               | Abbildung  |
| Acetyl-Co-A       | Acetyl-Co-Enzym A                                      |
| ACh               | Acetylcholin   |
| AChE              | Acetylcholinesterase                                   |
| AChR              | Acetylcholinrezeptor                                   |
| APP               | Amyloid Precursor Protein                              |
| APP <sub>as</sub> | α-sekretierte Ektodomäne des Amyloid Precursor Protein |
| ADRDA             | Alzheimer's Disease and Related Disorders Association  |
| AracC             | Cytosin-α-arabinofuranoside-HCL                        |
| ATP               | Adenosintriphosphat                                    |
| CA                | Cornu Ammonis Region                                   |
| cAMP              | cyklisches Adenosinmonophosphat                        |
| Cch               | Carbachol  |
| CCT               | cranial computer tomographie                           |
| cDNA              | complementary DNA                                      |
| cpm               | counts per minute                                      |
| CTP               | Cytosintriphosphat                                     |
| DAG               | Diacylglycerol   |
| dATP              | desoxyATP  |
| dCTP              | desoxyCTP  |
| dGTP              | desoxyGTP  |
| dTTP              | desoxyTTP  |
| dNTP              | desoxyNukleotidtriphosphat                             |
| DD-PCR            | Differential Display-PCR                               |
| DEPC              | Diethylpyrocarbonat                                    |
| DMSO              | Dimethylsulfoxid                                       |
| DNA               | Desoxyribonucleic Acid                                 |
| DNase             | Desoxyribonuklease                                     |
| DTT               | Dithiothreitol   |
| E-AChE            | “erythrozytäre” Acetylcholinesterase-Isoform           |
| EDTA              | Ethylendiamintetraacetic Acid                          |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|                 |  |
|-----------------|--|
| egr1            | Gencode : Early growth response gene Nr. 1   |
| FKS             | Fötale Kälberserum   |
| GAPDH           | Gencode : Glyceraldehydphosphate-dehydrogenase                                       |
| gig-2           | Gencode : G-Protein coupled receptor induced gene-2                                  |
| G-protein       | GTP-bindendes Protein  |
| GTP             | Guanosintriphosphat  |
| hAChE           | humane Acetylcholinesterase  |
| HBSS            | Hank's Balanced Salt Solution  |
| HEK293          | Human embryonic kidney cell line 293 (Wildtyp)                                       |
| HEK293m1        | Human embryonic kidney cell line 293 (mit dem Muskarinrezeptor Subtyp1 transfiziert) |
| ICD-10          | International Classification of Diseases (10. Fassung)                               |
| IEG             | immediate early gene   |
| IP <sub>3</sub> | Inositoltriphosphat  |
| kB              | kilobasen  |
| M. Alzheimer    | Morbus Alzheimer   |
| m1              | muskarinischer Acetylcholinrezeptor Subtyp 1   |
| mAChR           | muskarinischer Acetylcholinrezeptor  |
| MEM             | Modified Eagle Medium  |
| MOPS            | 3-N-Morpholinopropansulfonic Acid  |
| MMS(T)          | Mini Mental Status (Test)  |
| mRNA            | messenger ribonucleic acid   |
| MRT             | Magnetresonanz-Tomographie   |
| NINCDS          | National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke            |
| OD              | Optische Dichte  |
| PET             | Positronen-Emissions-Tomographie   |
| PCR             | Polymerase Chain Reaction  |
| PKA             | Proteinkinase A  |
| PKC             | Proteinkinase C  |
| PLC             | Phospholipase C  |
| RNA             | Ribonucleic Acid   |
| RNase           | Ribonuclease   |
| rpm             | rotations per minute   |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|        |   |
|--------|---|
| rAChE  | Acetylcholinesterase der Ratte                                  |
| R-AChE | „readthrough“-Acetylcholinesterase-Isoform                      |
| RT     | Reverse Transkriptase   |
| RT-PCR | Reverse Transkription mit anschließender PCR                    |
| S-AChE | „synaptische“ oder sog. „neuronal“ Acetylcholinesterase-Isoform |
| sog.   | sogenannt   |
| u.a.   | unter anderem   |
| UTP    | Uridintriphosphat   |
| UV     | ultraviolett  |

## **ERKLÄRUNG**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmitteln nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Cüneyt Demiralay

## DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation wurde mit einigen „akademischen“ Unterbrechungen in der Zeit von Juni 1998 bis zum Januar 2001 unter Anleitung von Herrn Prof. Roger Nitsch im Rahmen der Alzheimer-Forschungsgruppe Hamburg am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) und an der Abteilung für psychiatrische Forschung der Universität Zürich durchgeführt. Mein besonderer Dank gilt dementsprechend Herrn Prof. Dr. Roger Nitsch für die Initiierung und Unterstützung der vorliegenden Arbeit sowie für die anregende wissenschaftliche Arbeitsatmosphäre, die unzweifelhaft mit seiner Person verbunden ist, die großzügig gewährte wissenschaftliche Freiheit und seine kritische Durchsicht des Manuskripts.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Naber und Herrn Dr. Müller-Thomsen für Ihre freundliche und selbstlose Unterstützung und Mitabnahme dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch den Gutachter/innen für Ihre kritische Durchsicht des Manuskripts.

Die Arbeit wurde durch ein Stipendium der „Deutschen Forschungsgemeinschaft“ im Rahmen des Graduiertenkollegs „Neurale Signaltransduktion und ihre pathologischen Störungen“ unterstützt.

Herrn Dr. Heinz von der Kammer danke sehr ich für die hilfreiche Einführung ins wissenschaftliche Arbeiten und die Supervision meines Projektes.

Herrn Dr. Manuel Mayhaus gilt mein besonderer Dank für seine uneigennützig, großzügige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Mit seinem Fachwissen und seiner Kreativität soll er mir stets ein Vorbild sein.

Herrn Prof. Christoph Hock danke ich für seine Unterstützung des klinisch-experimentellen Anteils der Arbeit.

Herrn Dr. Josef Arlt danke ich für seine Hilfsbereitschaft bei den statistischen Analysen.

## **Danksagung**

---

Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Axel Wollmer, Dr. Claudia Albrecht, Dr. Joachim Velden, Dr. Luisa Benussi, Dr. Tiana Michel sowie Dr. Michaela Schweitzer ebenfalls bedanken. Sie glänzten durch Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Darüber hinaus gilt der gesamten „Forschungsgruppe Nitsch“ mein Dank für das angenehme Arbeitsklima.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner liebsten Nuray, die mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet und es immer wieder schafft mich zu motivieren.

## LEBENS LAUF

### Personalien

Name und Vorname: Demiralay, Cüneyt  
Geburtsdatum: 13.05.1973  
Geburtsort: Hamburg  
Familienstand: ledig  
Vater: Sadik Demiralay  
Mutter: Yüksel Demiralay

### Schulbildung:

1993 Abitur am Emilie Wüstenfeld-Gymnasium

### Zivildienst:

1993-1994 Kinderkrankenhaus Hamburg-Altona  
Gemeindepsychiatrisches Zentrum Hamburg

### Hochschulbildung:

1995 Beginn des Medizinstudium an der Universität Hamburg  
1997 Ärztliche Vorprüfung  
1998-2001 Experimentelle Doktorarbeit am Zentrum für Molekulare Neurobiologie der Universität Hamburg und der Abteilung für psychiatrische Forschung der Universität Zürich bei Prof. Roger Nitsch  
1999-2000 Stipendiat der DFG (Graduiertenkolleg „Neurale Signaltransduktion und ihre pathologischen Störungen“)  
1999 Erstes Medizinisches Staatsexamen  
2000 Zweites Medizinisches Staatsexamen  
2001 Drittes Medizinisches Staatsexamen

### Beruflicher Werdegang:

Januar 2002 Arzt im Praktikum in der Psychiatrischen Notaufnahme und dem Neurobiologischen Labor der psychiatrischen Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf  
März 2003 Arzt im Praktikum an der Neurologischen Universitätsklinik Hamburg Eppendorf  
Juli 2003 Assistenzarzt an der Neurologischen Universitätsklinik Hamburg Eppendorf