

# **Das Interleukin 6-System bei Alzheimer Demenz**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Karin Beate Becker**

aus Singen

2012

Angefertigt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. F. Jessen
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. M. Heneka

Tag der Mündlichen Prüfung: 13. Januar 2012

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der  
Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. W. Maier

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1	Epidemiologie der Alzheimer Demenz	8
1.2	Klinik, Prognose und Therapie der Alzheimer Demenz	9
1.3	Pathologie der Alzheimer Demenz	10
1.4	Risikogene für die Entstehung der Alzheimer Demenz	16
1.5	Interleukin-6	19
1.6	Inteleukin-6 und die Alzheimer Demenz	23
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der eigenen Untersuchungen</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
3.1	Patienten	28
3.2	Materialien	29
3.2.1	Geräte	29
3.2.2	Reagenzien	30
3.2.3	Lösungen und Puffer	32
3.2.4	Gele zur Trennung von DNA-Fragmenten	34
3.3	Methoden	36
3.3.1	Enzym Linked Immunosorband Assay	36
3.3.2	DNA-Isolierung	37
3.3.3	Polymerase-Ketten-Reaktion	37
3.3.4	PCR-basierter Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus	42
3.3.5	Methoden zur Darstellung der Amplifikationsprodukte	44
3.3.6	Darstellung der Genpolymorphismen	46
3.3.7	Statistische Auswertung der Daten	50
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
4.1	Plasma- und Liquorspiegel von IL-6, sIL-6R und sgp130	51
4.2	Konzentrationsunterschiede abhängig von Erkrankungsschweregrad und Alter	52
4.3	Genotypisierung	56
4.4	Interaktion von sIL-6R mit dem Geschlecht und den Kandidatengen	56
4.5	Interleukin-6-Rezeptorsystem zentral und peripher	62

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>66</b>
5.1	Erhöhte Entzündungsparameter im Alter und bei Alzheimerkranken	67
5.2	Die IL-6R-Konzentration in Abhängigkeit von IL-6 Polymorphismen	71
5.3	Zusammenhänge zentraler und peripherer Prozesse	73
5.4	Interaktion des IL-6-Rezeptorsystem	77
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>83</b>
7.1	Abbildungen	83
7.2	Tabellen	85
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>86</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen</b>	<b>100</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>101</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>A</b>	Adenin
<b>ACT</b>	$\alpha$ 1-Antichymotrypsin
<b><math>\alpha</math>2-M</b>	$\alpha$ 2-Makroglobulin
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>ANOVA</b>	Analysis of Variants
<b>Apo E</b>	Apolipoprotein E
<b>AD</b>	Alzheimer Demenz
<b>AS</b>	Aminosäuren
<b>APP</b>	Amyloid-Vorläufer-Protein
<b>BBB</b>	Blood-Brain-Barrier
<b>BHS</b>	Blut-Hirn-Schranke
<b><math>\beta</math>2-M</b>	$\beta$ 2-Makroglobulin
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
<b>BSF-2</b>	B-Zell-Differenzierungsfaktor
<b>C</b>	Cytosin
<b>C1q, C4, C3</b>	Komplementfaktoren
<b>CNTF</b>	Ciliary Neurotrophic Factor
<b>CT-1</b>	Cardiotropin-1
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinsäure
<b><math>\epsilon</math>2</b>	Apo E* $\epsilon$ 2-Allel
<b><math>\epsilon</math>3</b>	Apo E* $\epsilon$ 3-Allel
<b><math>\epsilon</math>4</b>	Apo E* $\epsilon$ 4-Allel
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>G</b>	Guanin
<b>gp</b>	Glykoprotein
<b>gp130</b>	IL-6-Transduktionsrezeptor, $\beta$ -chain
<b><math>\gamma</math>-IFN</b>	Gamma-Interferon
<b>IL-1</b>	Interleukin-1
<b>IL-6</b>	Interleukin-6
<b>IL-6*IL-6RK</b>	IL-6*IL-6R-Komplex
<b>IL-6*IL-6R*gp130-K</b>	IL-6*IL-6R*gp130-Komplex

<b>IL-6R</b>	IL-6-Rezeptor, gp80, $\alpha$ -chain
<b>IL-6prom</b>	IL-6-Promoter-Polymorphismus
<b>IL-6prom*C</b>	C-Allels des IL-6-Promoter-Polymorphismus
<b>IL-6vntr</b>	Variable Number of Tandem Repeat-Polymorphismus des IL-6
<b>IL-6vntr*C</b>	C-Allels des IL-6-VNTR-Polymorphismus
<b>IL-11</b>	Interleukin-11
<b>kb</b>	Kilobasen
<b>kDa</b>	Kilo-Dalton
<b>Konz.</b>	Konzentration
<b>LIF</b>	Leukemia Inhibitory Factor
<b>LR</b>	Long Ranger
<b>M</b>	Metaphor
<b>MANOVA</b>	multifactoriel analysis of variants
<b>MD</b>	Major Depression
<b>MM</b>	Multiples Myelom
<b>MMSE</b>	Mini Mental State Examination
<b>mRNA</b>	messenger Ribonucleinsäure
<b>MMSE</b>	Mini Mental State Examination
<b>NINCDS-ADRDA</b>	National Institute of Neurological Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
<b>NSAID</b>	nichtsteroidale Antiphlogistika nonsteroidal antiinflammatory drugs
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>OSM</b>	Oncostatin M
<b>PCR</b>	Polymerase-Ketten-Reaktion
<b>PHA</b>	Phytohemagglutinin
<b>PS-1</b>	Presenilin-1
<b>PS-2</b>	Presenilin-2
<b>SDAT</b>	Senile Demenz vom Alzheimer-Typ
<b>sgp130</b>	soluble (löslicher) gp130
<b>sIL-6R</b>	soluble (löslicher) IL-6-Rezeptor
<b>T</b>	Thymin

<b>Taq-Polymerase</b>	Thermophilus aquaticus-Polymerase
<b>TEMED</b>	N,N,N,N'-Tetramethyl-ethylendiamin
<b>Tm</b>	Schmelztemperatur
<b>TNF</b>	Tumor Nekrose Faktor
<b>U/ <math>\mu</math>l</b>	Units/ $\mu$ l
<b>VNTR-Polymorphismus</b>	Variable Number of Tandem Repeat Polymorphismus
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

## 1 Einleitung

### 1.1 Epidemiologie der Alzheimer Demenz

Die nach Alois Alzheimer (1864-1916) benannte Alzheimer'sche Demenz (AD) ist eine degenerative Hirnerkrankung, an deren Entstehung multiple Prozesse beteiligt sind. Weitläufig wird sie Alzheimer Demenz, Morbus Alzheimer, Alzheimer'sche Erkrankung oder senile Demenz vom Alzheimer-Typ (SDAT) genannt.

Die AD ist eine der häufigsten Erkrankungen im Alter. Es wird unterschieden zwischen der AD mit frühem Beginn (< 65. Lebensjahr) und schnellem Verlauf, sowie der weit häufigeren AD mit spätem Beginn (> 65. Lebensjahr) und langsamem Verlauf. Die weltweite Prävalenz lag 2006 bei 26,6 Millionen Menschen und bis zum Jahr 2050 wird eine Vervierfachung erwartet, was hieße, dass 1 von 85 Personen an AD erkrankt wären (Brookmeyer et. al., 2007). Dabei nimmt die Prävalenz exponentiell mit dem Lebensalter zu und erreicht in der Altersgruppe der 80-89 jährigen etwa 24-33 % (Ferri et al., 2005). Die Inzidenz steigt ebenfalls mit dem Alter; in der Gruppe der über 65-jährigen liegt sie bei 1,5 % pro Jahr (Bickel und Copper, 1994). Die natürlichen Vorgänge des Alterns sind also ein wesentlicher Risikofaktor für die AD. In einer umfassenden Studie zeigen Lautenschlager et al. (1996) eine altersabhängige Risikokurve, die asymptotisch bei einem Risiko von 38 % im Alter von 85 Jahren ausläuft.

Neben dem unvermeidbaren Alterungsprozess beeinflussen genetische Dispositionen und individuelle Lebensbedingungen das Erkrankungsrisiko. Beispielsweise steigt die Wahrscheinlichkeit, wenn in der Vergangenheit ein Schädel-Hirn-Trauma mit Bewusstlosigkeit vorlag (Mortimer et al., 1985) oder die Mutter bei der Geburt über 40 Jahre alt war (Rocca et al., 1991). Ein hohes Ausbildungsniveau und lebenslange geistige Beanspruchung sollen die Wahrscheinlichkeit an einer symptomatischen AD zu erkranken verringern (Bennett et al., 2003). Daneben werden auch endokrine Erkrankungen wie eine Schilddrüsenunterfunktion (Heyman et al., 1984; Breteler et al., 1991) oder Diabetes mellitus (Adolfsson et al., 1980; Leibson et al., 1997) mit der AD assoziiert. Auch ein Zusammenhang zwischen Fetten, insbesondere Cholesterin, und der Alzheimer Krankheit wird angenommen. Im Hinblick auf Umweltfaktoren wird ein Einfluss von erhöhtem Nikotinkonsum diskutiert. Oddo et al. (2005) zeigen in einem transgenen Mausmodell, dass Nikotineinkonsum die Alzheimerpathogenese negativ beeinflusst.

Es handelt sich also um eine multifaktorielle Erkrankung, für deren Entstehung neben natürlichen Alterungsprozessen sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren verantwortlich sind.



## 1.2 Klinik, Prognose und Therapie der Alzheimer Demenz

Das klinische Bild der Alzheimer Demenz ist durch ein komplexes Störungsmuster charakterisiert. Eindeutige Symptome treten erst auf, wenn die Krankheit schon in fortgeschrittenem Stadium ist. Zu Beginn sind diese unspezifisch, so dass erst nach Manifestation charakteristischer, neuropsychologischer Ausfälle die klinische Diagnose gestellt werden kann. Es handelt sich um eine Ausschlussdiagnose, denn Erkrankungen wie Altersdepression, Entzündung der Hirngefäße (Vaskulitis), B-12- und Folsäuremangel, ein Schlaganfall, die Neurosyphilis, chronischer Alkoholabusus und Medikamentenmissbrauch führen zu einem ähnlichen klinischen Krankheitsbild. Zu diesem gehören vor allem Vergesslichkeit, Wortfindungsstörungen, Schwierigkeiten beim Rechnen, Lesen, Schreiben, Orientierungsstörungen (Haupt et al., 1992) und nicht zuletzt psychische Veränderungen, die sich in Antriebslosigkeit, Ängstlichkeit, psychomotorischer Unruhe, Depressivität, Wahnbildung und Aggressivität äußern (Mendez et al., 1990; Patterson et al., 1990).

Das Fortschreiten der AD ist unaufhaltsam, wobei die Persönlichkeit des Patienten noch lange erhalten bleiben kann. Spätestens in den Endstadien ist jedoch eine selbständige Lebensführung nicht mehr möglich. Die Sprache verarmt zunehmend und auch das Sprachverständnis geht verloren (Chobor und Brown, 1990). Im weiteren Verlauf kann es zu Verwirrheitszuständen kommen mit Unruhe und Erregbarkeit, sowie Misstrauen mit Bestehlungs- und/oder Verfolgungswahn. Häufig sind Erkrankte unfähig Gesichter naher Angehöriger zu erkennen. Nicht selten kommt es dann zu einer progredienten Kachexie, die meist nach 5-10 Jahren durch interkurrente Erkrankungen zum Tode führt.

Die AD ist zwar nicht heilbar, jedoch ist es möglich Symptome zu verringern. Hier kommen zentrale Acetylcholinesterasehemmer wie z. Bsp. Donepezil, Rivastigmin und Galantamin und NMDA-Modulatoren wie Memantin zum Einsatz. Die symptomatische Behandlung der Verhaltensstörungen spielt bei der Therapie eine wesentliche Rolle, da sie die Lebensqualität der Patienten erhöht und den Umgang Angehöriger und des Pflegepersonals mit ihnen erleichtert. Darüber hinaus werden ein kognitives Training, Ergotherapie und eine Bewegungstherapie empfohlen. Einen besonderen Stellenwert hat auch die psychosoziale Betreuung sowie eine psychotherapeutische Beratung und Behandlung der Patienten unter Einbeziehung ihrer nächsten Angehörigen und der sozialen Hilfsdienste (Berlit, 2007).

Therapien, welche die AD in frühen Stadien positiv beeinflussen können und damit natürlich auch Methoden der Früherkennung, sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Hier gibt

es vielseitige Ansatzpunkte. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Patienten, die auf Grund erhöhter Cholesterinspiegel mit Cholesterinsenker behandelt werden, seltener an Alzheimer erkranken. Fassbender et al. (2001) beobachten in diesem Zusammenhang, dass Cholesterinsenker die Konzentration von Amyloidplaques in der Hirnflüssigkeit verringern. Andere Studien zeigen, dass Patienten, die an inflammatorischen Erkrankungen wie die Rheumatoide Arthritis leiden und deshalb über Jahre mit entzündungshemmenden, nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID, Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs) behandelt werden, eine reduzierte Inzidenz der AD haben (Jenkinson et al., 1989; McGeer et al., 1990). Angesichts solcher Kenntnisse wird in pharmako-epidemiologischen Studien die Wirkung von NSAID auf die AD untersucht (Beard et al., 1998; Breitner et al., 1996). In Anbetracht der Tatsache, dass Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel auch das Interleukin-6 (IL-6), bei jungen, gesunden Probanden kaum nachweisbar sind, aber mit zunehmenden Alter schon bei Probanden ohne Erkrankungen messbar werden (Ershler 1993; Ershler et al., 1993; Wei et al., 1992), liegt die Überlegung nahe, antiinflammatorische Medikamente prophylaktisch oder therapeutisch einzusetzen.

### **1.3 Pathologie der Alzheimer Demenz**

Entstehung und Verlauf der AD sind zunächst durch Verlust synaptischer Verbindungen gekennzeichnet, in deren Folge Neuronen absterben. Pathohistologische Konsequenz der abnehmenden Neuronendichte (Struble et al., 1982) sind eine generalisierte Vergrößerung der Ventrikel und Sulci und eine kortikale Atrophie, wobei insbesondere der Hippokampus, der enterorhinale Kortex und der Neokortex betroffen sind.

Die in Folge dieser Degeneration ausgelösten pathologischen Prozesse sind vielseitig und ihre morphologischen Phänomene werden bereits von Alois Alzheimer beschrieben.

Das histologische Bild der AD ist von neuritischen Plaques, bestehend aus  $\beta$ -Amyloidablagerungen ( $\beta$ -Amyloidplaques,  $\beta$ -Amyloid), gekennzeichnet, die von einer Entzündungsreaktion umgeben sind, welche durch aktivierte Glia und eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren charakterisiert ist (Mrak et al., 1995). Darüber hinaus ergänzen Neurofibrillenbündel (Tangles) sowie eine ausgeprägte Angiopathie (Shi et al., 2000; Yamada, 2000) das pathohistologische Bild der AD.

## Amyloidplaques

Die Bildung unlöslicher Amyloidplaques aus  $\beta$ A4-Proteinen gilt als zentraler Pathomechanismus für die AD. Beta bezeichnet die  $\beta$ -Faltblattstruktur des 42 Aminosäuren (AS) langen Proteins, das ein Molekulargewicht von 4 Kilodalton hat (daher  $\beta$ A4). Die  $\beta$ A4-Proteine entstehen bei der Spaltung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP, Amyloid-Vorläufer-Protein).

APP ist ein Typ I Membranprotein, das ubiquitär im Organismus vorkommt. Es wird angenommen, dass zu seinen physiologischen Aufgaben die Bindung von Metallionen und Heparin gehört, und dass es am Kalziummetabolismus (Mattson et al., 1993) sowie an transmembraner Signaltransduktion (Nishimoto et al., 1993) beteiligt ist. Darüber hinaus besitzt es Zelladhäsions- und Wachstumsfaktoreigenschaften.

Nach seiner Synthese wird das APP als Transmembranprotein in die Zellmembran aufgenommen und innerhalb dieser proteolytisch gespalten. Infolge dieser Spaltung bleibt das längere N-terminale Ende des APP an die Zellmembran gebunden und die entstehenden  $\beta$ A4-Proteine werden frei. Je nach Spaltmodus entstehen 40-43 AS lange Fragmente, die aus transmembranen und extrazellulären Teilen des APP bestehen (Glennner und Wong, 1984; Masters et al., 1985). Die irreversible Aggregation dieser Fragmente führt zu den charakteristischen, unlöslichen und nicht abbaubaren Amyloidplaques. Eine exakte Spaltung scheint sowohl qualitativ als auch quantitativ von Bedeutung zu sein. Das Löslichkeitsverhalten und damit die Aggregationsneigung der  $\beta$ A4-Proteine hängen maßgeblich von der Länge des hydrophoben Teils und der Menge abgespaltener Proteine insgesamt ab. Besonders amylogen ist das 42 AS lange  $\beta$ A4-Protein ( $A\beta_{1-42}$ ), welches den weitaus größeren Anteil der Amyloidplaques ausmacht.

Es werden drei für die APP-Spaltung verantwortliche Sekretasen beschrieben, die als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen bezeichnet werden. Die physiologische Spaltung erfolgt durch die  $\alpha$ -Sekretase. Diese schneidet das APP innerhalb der  $\beta$ A4-Sequenz, wodurch lösliche  $\beta$ A4-Proteine entstehen. Für die Entstehung von  $\beta$ A4-Proteinen mit hoher Aggregationsneigung sind die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen verantwortlich. Dieser „amyloidogene Weg“ ist zwar auch im gesunden Organismus aktiv, hat aber dort eine untergeordnete Bedeutung. Das APP wird dabei zunächst durch die  $\beta$ -Sekretase, das sogenannte beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE 1,  $\beta$ -ACE) (Vassar et al., 1999), gespalten. Anschließend löst die so genannte  $\gamma$ -Sekretase das 39 - 43 AS lange Peptid aus der Zellmembran. Besonderheit ist, dass diese Proteolyse inmitten der Zellmembran stattfindet. Bei der  $\gamma$ -Sekretase handelt es sich nicht um ein einfaches Enzym

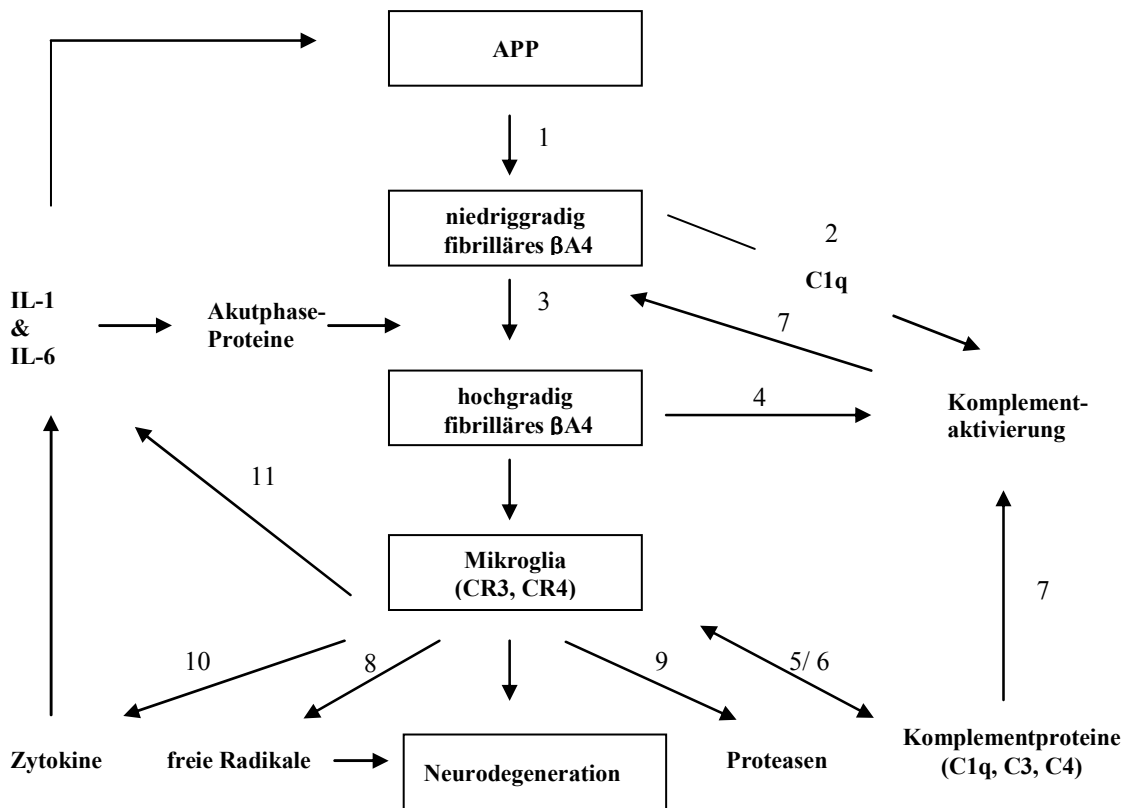
bzw. Protein, sondern um einen Proteinkomplex bestehend aus Presenilin, Nicastrin, Aph-1 (anterior pharynx-defective 1) und Pen-2 (presenilin enhancer 2) (De Stropper, 2003).

### **Neurofibrillenbündel**

Neben den Amyloidplaques trägt die Entstehung von Neurofibrillenbündeln, auch Tangels genannt, maßgeblich zum neuropathologischen Bild der AD bei. Neurofibrillenbündel sind paarig angeordnete, helikale Filamente, die sich aus hyperphosphorylierten Tau-Proteinen zusammensetzen. Tau-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Organisation von Mikrotubuli, wobei ihre Aktivität über den Phosphorylierungsgrad spezifischer Serin- und Threoninreste reguliert wird (Mandelkow et al., 1996). Durch Hyperphosphorylierung verliert das Protein seine Bindungsfähigkeit an die Mikrotubuli und damit an Stabilität. Als Folge sterben die betroffenen Zellen ab (Roush, 1995). Im Gegensatz zur Menge der Plaques korreliert die Menge an Neurofibrillen gut mit der Schwere der Erkrankung (Gomez-Isla et al., 1997).

### **Einfluss immunologischer- und inflammatorischer Prozesse auf die Entstehung von AD**

Ohne genaue Kenntnisse über die pathogenetischen Prozesse immunologischer und inflammatorischer Reaktionen zu haben, wird angenommen, dass diese einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung der AD nehmen (Aisen et al., 1997; Lanzrein et al., 1998). Die Abb. 1 nach Eikelenboom und Veerhuis (1996) zeigt, in welchem Rahmen das Immunsystem die Plaquebildung beeinflussen könnte und wie es dabei zur Neurodegeneration kommt.

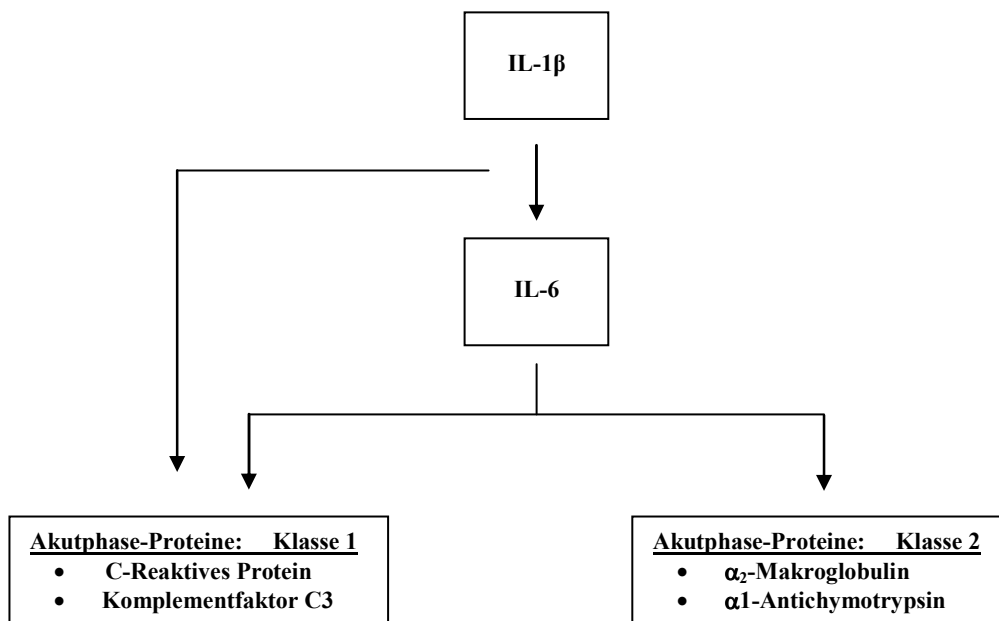


**Abb. 1: Einfluss von Entzündungsfaktoren auf die Neurodegeneration nach Eikelenboom und Veerhuis (1996)**

Initialer Schritt der Pathogenese ist der fehlerhafte APP-Metabolismus mit resultierender zerebraler Ablagerung von  $\beta$ A4-Proteinen in niedriggradig fibrillärer Form (1). In frühen, diffusen Amyloidplaques kann nur schwache Komplementaktivität nachgewiesen werden, deren Menge kaum ausreicht, um Mikrogliazellen zu aktivieren. Geringe Mengen des Komplementfaktors C1q führen jedoch zur Komplementaktivierung (2). Nach langsamer Organisation der diffusen Plaques in hochgradig fibrilläre, bzw. kompakte Plaques (3) führt dann eine direkte Komplementaktivierung durch hochgradig fibrilläre  $\beta$ A4-Plaques (4) zur Aktivierung von Mikrogliazellen (5). Diese exprimieren daraufhin Komplementrezeptoren (CR3 und CR4) auf ihrer Zelloberfläche und erhöhen außerdem die Produktion der Komplementfaktoren C1q, C4 und besonders C3 (Haga et al., 1993) (6), die sich ihrerseits um die Plaques anordnen. Diese Komplementfaktoren beschleunigen wiederum in erhöhtem Maße die Umformung der diffusen Plaques in kompakte (7) und aktivieren chemotaktisch Mikrogliazellen (6).

Die Mikroglia wird als Hauptproduktionsort der Komplementfaktoren gesehen. Als Makrophagen des zentralen Nervensystems (ZNS) sind sie jedoch auch in der Lage Amyloidplaques abzubauen. Werden Mikrogliazellen von Ratten mit  $\beta$ A4-Peptiden oder Komplementfaktor C1q (Eikelenboom und Veerhuis, 1996) oder C3 (Colton und Gilbert, 1987) stimuliert, können Superoxidanionen nachgewiesen werden (8). Darüber hinaus scheint auch  $\beta$ -Amyloid selbst die Bildung von Radikalen zu induzieren (McDonald et al., 1997; Pappolla et al., 1998). Die neurotoxische Wirkung dieser freien Radikale führt zur Degeneration von Neuronen mit zunehmender Hirnatrophie und daraus folgender klinischer Symptomatik.

Zytokine (10) sind die Mediatoren der so genannten Akutphase-Reaktion, in der als Antwort auf pathologische Prozesse unter anderem Fibrinogen, C-Reaktives-Protein (CRP),  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin (ACT) und  $\alpha$ 2-Makroglobulin ( $\alpha$ 2-M) ausgeschüttet werden. Zu den Zytokinen gehört auch das Interleukin 1 (IL-1) und IL-6. Für IL-1, dessen Hauptbildungsort im Gehirn Mikrogliazellen sind (11), konnte gezeigt werden, dass es in vitro die APP-Expression in Endothelzellen (Goldgaber et al., 1989) und Astrozyten (Rogers et al., 1999) erhöht.



**Abb. 2: Zytokin-Akutphase-Protein-Kaskade nach Wood et al. (1993)**

In Abb. 2 nach Wood et al. (1993) wird die Zytokin-Akutphase-Protein-Kaskade dargestellt. Es gibt im Gehirn zwei molekulare Formen (IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) (Wood et al., 1993), die sich von unterschiedlichen Genen ableiten lassen. Nach posttranslationaler Modifikation ist IL-1 $\beta$  in der Lage, Astrogliazellen zur Zellteilung anzuregen und die Produktion von IL-6 und Akutphase-Proteinen zu induzieren. Letztere können in zwei Klassen eingeteilt werden. Zur Klasse 1 gehören Proteine, deren Expression gemeinsam von IL-1 $\beta$  und IL-6 stimuliert wird. Die Expression der zur Klasse 2 gehörenden Proteine wird von IL-6 alleine reguliert. Von besonderer Bedeutung ist hier das  $\alpha$ 2-M. Als potentester der im menschlichen Organismus vorkommenden Proteinaseinhibitoren spielt dieses Protein möglicherweise bei der Inhibierung der physiologischen APP-Spaltung eine wichtige Rolle. In vivo sind  $\alpha$ 2-M wie auch IL-6 in erhöhtem Maße in den APP-Plaques nachweisbar, während sie in Gehirnen altersgleicher, gesunder Probanden nicht messbar sind (Bauer et al., 1991). In vitro kann durch Stimulation von humanen SH-SY5Y Neuroblastomazellen mit IL-6 eine erhöhte  $\alpha$ 2-M-Synthese induziert werden (Strauss et al., 1992). Diese Neuroblastomazellen ähneln morphologisch differenzierten Neuronen und zeigen unbehandelt eine vergleichbar schwache  $\alpha$ 2-M-Immunoreaktivität wie sie in normal gealterten Gehirnen gemessen werden kann.

Insgesamt kann eine enge Kausalität zwischen der AD und inflammatorischen Prozessen angenommen werden. Insbesondere auch das IL-6 scheint hierbei eine Rolle zu spielen. Astrozyten, die den Hauptanteil der Gliazellen, also das so genannte Stützgerüst der Neuronen bilden, tragen Rezeptoren für Interleukin-1 (IL-1) (Ban, 1994; Rubio, 1994) und es wird angenommen, dass sie auch Interleukin-6-Rezeptoren (IL-6R) exprimieren (Gottschall et al., 1994; Norris und Benveniste, 1993). Bei Untersuchungen von post mortem Hirngewebe von Alzheimerpatienten werden in kompakten Plaques reaktive Astrozyten (Frederickson, 1992, Nieto-Sampedro, 1987) und in nahezu allen Plaquestadien aktivierte Mikroglia (McGeer et al., 1993) nachgewiesen. Darüber hinaus wird eine Vielfalt von Entzündungsmediatoren wie Komplementfaktoren (C1q, C4, C3) (Eikelenboom et al., 1982), IL-1 (Griffin et al., 1989), IL-6 (Bauer, 1991, Bauer et al., 1992) und der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) (Fillit et al., 1991) mit deutlich höherer Aktivität gefunden, als es unter physiologischen Bedingungen der Fall ist. Erhöhte IL-6-Konzentrationen sind in mehreren Studien besonders in den niedriggradig diffusen Plaques, also in frühen Stadien nachweisbar (Strauss et al., 1992; Hüll et al., 1995 und 1996).

Vor näherer Betrachtung des Interleukin-6 folgt zunächst ein Überblick über die Alzheimer-Genetik.

## 1.4 Risikogene für die Entstehung der Alzheimer Demenz

Um die Entstehung der AD vorzubeugen, oder die Progredienz der Erkrankung zu verzögern, ist das frühzeitige Wissen um das Alzheimerisiko eines Menschen wichtig. Resultierend ist die Suche nach genetischen Markern von großem Interesse. Schon in den 30er Jahren wurde eine familiäre Häufung beobachtet (Critchley, 1933; Schottky, 1932) und eine positive Familienvorgeschichte als wichtiger Risikofaktor für die AD gesehen (Mohs et al., 1987). Es wird unterschieden zwischen genetischen Variationen, die zur autosomal dominant vererbten, familiären AD führen und solchen, bei denen es zur nicht-familiären, sporadischen AD kommt.

### Autosomal dominant vererbte Risikogene der Alzheimer Demenz

Die autosomal dominant vererbte Form betrifft nur etwa 1 % der Alzheimerpatienten, die in der Regel früh erkranken (< 65. Lebensjahr). Es sind drei Gene bekannt, die nach Mendel'schen Regeln vererbt werden. Es handelt sich bei diesen Genen, die durch Kopplungsanalysen identifiziert werden konnten, um das APP-Gen und das Presenilin-1- und Presenilin-2-Gen (PS-1 und PS-2).

### Das Amyloid-Precursor-Protein-Gen

APP ist, wie zuvor beschrieben, ein ubiquitär vorkommendes Membranprotein. Durch unterschiedliche Spaltung der messenger RNA (mRNA) existieren Isoformen mit unterschiedlicher Aminosäurelänge (395, 563, 695, 751, 770). Die 751 und 770 AS langen Formen enthalten eine Proteinase-Inhibitor-Domäne im extrazellulären Bereich (Tanzi et al., 1988; Ponte et al., 1988), welche bei der Hauptisoform in Neuronen, dem 695 AS langen Molekül, fehlt.

Das APP-Gen, welches das Amyloid-Precursor-Protein codiert, liegt auf Chromosom 21 (21q21) und ist in 19 Exone unterteilt (Price et al., 1995). Es sind etwa 33 verschiedene Mutationen bekannt ([www.alzforum.org](http://www.alzforum.org)), die den Spaltungsvorgang des APP zu beeinflussen scheinen. So führt beispielsweise die schwedische Mutation in den benachbarten Codons 670 und 671 (Mullan et al., 1992) zur Mehrproduktion aller Amyloidfragmente (Lannfelt et al., 1994), während Mutationen im Codon 171 (Chartier-Harlin et al., 1991) bei transgenen Mäusen zu erhöhter A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Produktion führen und gleichzeitig eine reduzierte Lernfähigkeit der Tiere beobachtet werden kann (Games et al., 1995). Bei der Trisomie 21 (Down-Syndrom) liegt das



APP-Gen drei Mal vor. Es wird angenommen, dass bereits infolge der daraus resultierenden vermehrten Produktion von APP schon um das 30. Lebensjahr ein Plaquestadium erreicht wird, bei dem AD-typische Symptome auftreten (Holland und Oliver, 1995; Mann, 1989).

### **Die Presenilin-Gene**

Mutationen im Presenilin-1- und Presenilin-2-Gen führen ebenfalls zu Veränderungen im  $\beta$ APP-Metabolismus (Lemere et al., 1996), die mit erhöhter  $\beta$ A4-Produktion einhergehen.

Das Presenilin-1 liegt auf Chromosom 14 (14q24.3) (Sherrington et al., 1995). Es sind mehr als 180 Mutationen beschrieben, die den  $\beta$ APP-Metabolismus unterschiedlich beeinflussen ([www.alzforum.org](http://www.alzforum.org)). Mutationen des PS-1 sollen zu 30 % bis 50 % für die monogen vererbte AD mit frühem Krankheitsbeginn verantwortlich sein (Hutton et al., 1996). In Tiermodellen transgener Mäuse, welche PS-1-Mutationen tragen, konnte erhöhte  $A\beta_{1-42}$ -Produktion nachgewiesen werden (Duff, 1997).

Das Presenilin-2 ist auf Chromosom 1 (1q31-42) lokalisiert. Es sind etwa 14 Mutationen bekannt ([www.alzforum.org](http://www.alzforum.org)), die mit einem Krankheitsbeginn von 44 bis 77 Jahren korrelieren (Rogaev et al., 1995; Tedde et al., 2003). Im Gegensatz zum PS-1 soll die Variation von PS-2 innerhalb einer Familie größer sein (Schellenberg, 1995).

Wie beim APP handelt es sich bei den Presenilinen um ubiquitär im Organismus vorkommende Membranproteine, die gehäuft in Nervenzellen auftreten. Sie sind jedoch nicht in der äußeren Zellmembran, sondern in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Der strukturelle Aufbau dieser Proteine ähnelt sich sehr (Rogaev et al., 1995) und sie sind - wie bereits im Vorfeld erwähnt (siehe 1.3) - Bestandteil der  $\gamma$ -Sekretasen, womit sie eine besondere Bedeutung für die Alzheimerpathogenese haben. So zeigen beispielsweise Studien mit Mäusen, in denen das Presenilin-1-Gen entfernt wurde, eine deutlich verringerte  $\gamma$ -Sekretasen-Aktivität (De Stropper et al., 1998), während bei Knockout-Mäusen für Presenilin-1 und Presenilin-2 kein APP mehr nachgewiesen werden konnte (Herremann et al., 2000; Zhang et al., 2000).

### **Die nicht-familiäre, sporadisch entstehende Alzheimer Demenz**

Bei den viel häufigeren, sporadischen Fällen der AD handelt es sich für gewöhnlich um den AD-Typ mit spätem Beginn ( $> 65$ . Lebensjahr). Zahlreiche genetisch-epidemiologische Studien zeigen, dass das AD-Risiko in der Allgemeinbevölkerung ebenfalls an genetische Faktoren gebunden ist und bei ca. 30-50 % liegt (St. George-Hyslop, 1999). Als nicht-familiäres,

sporadisch auftretendes Risikogen ist vor allem das Apolipoprotein E-Gen (ApoE), das in der Literatur als gesichertes Risikogen gilt, von Bedeutung.

In den letzten Jahren werden in der Alzheimerforschung in zunehmender Zahl genomweite Assoziationsstudien (GWAS) durchgeführt, deren Ergebnisse in einer Online-Datenbank zusammengefasst werden (<http://www.alzgene.org>). Diese Studien liefern bislang vor allem Hinweis für Mutationen, die mit dem ApoE-Gen assoziiert sind, d. h. im Linkage-Disequilibrium mit diesem liegen, ohne signifikante neue Genorte beschreiben zu können. Jüngst ist jedoch eine GWAS mit deutlich höherer Power, als die der vorangehenden Studien, durchgeführt worden, die neben den bekannten Assoziationen zum ApoE-Gen zwei neue, signifikante Risikogene beschreibt (Harold et al., 2009). Hierbei handelt es sich um das CLU- und PICALM-Gen.

Das CLU-Gen liegt auf Chromosom 8 (8p21- p12) und kodiert Clusterin, ein weiteres Apolipoprotein des Gehirns (Jenne und Tschopp, 1992), welches bei allen Säugetieren vorkommt (Jones und Jomary, 2002). Es gibt Hinweise dafür, dass es unter pathologischen Bedingungen wie Verletzungen oder chronischen Entzündungen des Gehirns erhöht ist. Bei Alzheimerkranken soll es in Amyloidplaques, sowie im Liquor messbar sein (Calero et al., 2000). Es handelt sich um ein Molekül, welches in Tiermodellen die lösliche Form des A $\beta$  reversibel binden und einen Komplex bilden soll, der die Blut-Hirn-Schranke (BHS) überschreitet (Zlokovic et al, 1994).

Das PICALM-Gen, auch bekannt als CALM-Gen (clathrin assembly lymphoid-myeloid leukemia gene), liegt auf Chromosom 11 und codiert das „Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein“, ein Protein, welches ubiquitär in allen Gewebetypen, besonders aber in Neuronen, vorkommt. Dort soll es sich vor allem auf prä- und postsynaptische Strukturen verteilen. Es scheint dort indirekt die Neurotransmitterausschüttung im synaptischen Spalt zu beeinflussen (Harel et al., 2007).

In beiden Genen werden Punktmutationen, also sogenannte SNPs (single nucleotide polymorphisms) signifikant mit der AD assoziiert. Eine Assoziation auch zum ApoE-Gen konnte ausgeschlossen werden.

### **Das Apolipoprotein E-Gen**

Das ApoE-Gen liegt auf Chromosom 19 (19q13, 2) und ist Träger eines Polymorphismus, dessen drei Allele  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 4 mit einer Häufigkeit von 7 %, 78 % bzw. 15 % vorkommen (Roses, 1996). Auf Proteinebene handelt es sich beim ApoE um einen Lipidtransporter im Serum. Im ZNS spielt es im Lipidstoffwechsel eine wichtige Rolle bei Regenerations- und

Reparaturvorgängen der Nervenzellen. Dort wird es hauptsächlich von Astrozyten synthetisiert, die es mit Cholesterin und Phospholipiden zu einem Lipid-Protein-Komplex verpackt in den Extrazellulärraum entlassen, wo sie an "Low Density Lipoprotein"- und "Very Low Density Lipoprotein"- Rezeptoren binden. In vitro Versuche zeigen, dass die einzelnen Isoformen des ApoE eine unterschiedliche Wirkung entfalten. So entwickeln sich Zellkulturen unter dem Einfluss des Genproduktes des  $\epsilon 4$ -Allels deutlich schlechter als solche, die dem Genprodukt des  $\epsilon 3$ -Allels ausgesetzt sind (Holtzman et al., 1995). Es ist tatsächlich anzunehmen, dass besonders das  $\epsilon 3$ -Allel eine maßgebliche Rolle bei Regenerations- und Reparationsvorgängen spielt und Träger von ein oder zwei  $\epsilon 4$ -Allelen diesbezüglich Defizite aufweisen (Poirier, 1996). Ferner wurde beobachtet, dass homozygote  $\epsilon 4$ -Träger wesentlich stärkere Amyloidablagerungen aufweisen als  $\epsilon 3$ -homozygote Patienten (Schneider et al., 1995). Zusätzlich ist nachweisbar, dass das Genprodukt des  $\epsilon 4$ -Allels an Tauprotein bindet (Strittmatter et al., 1993) und mit erhöhter Neurofibrillenveränderung im Zusammenhang steht (März et al., 1996). Für arteriosklerotische Prozesse sowohl in der Peripherie (Ilveskoski et al., 1999) als auch im ZNS (Premkumar et al., 1996) wird das  $\epsilon 4$ -Allel ebenfalls als signifikanter Risikofaktor beschrieben.

Bei Alzheimerpatienten liegt die Frequenz des  $\epsilon 4$  ungefähr dreimal höher als bei gesunden Personen (Kurz und Müller, 1997). Dieses gehäufte Vorkommen des  $\epsilon 4$  kann bei Patienten mit spätem Krankheitsbeginn sowohl mit als auch ohne positive Familienvorgeschichte gefunden werden (Saunders et al., 1993). Das relative Krankheitsrisiko liegt bei heterozygoten  $\epsilon 4$ -Trägern wesentlich höher als bei homozygoten  $\epsilon 3$ -Trägern, und es steigt bei Vergleich homozygoter  $\epsilon 4$ -Träger mit homozygoten  $\epsilon 3$ -Trägern. Diese Angaben beziehen sich jedoch nur auf kaukasische Stichproben. In der asiatischen und afroamerikanischen Bevölkerung weicht die Genotypverteilung von dieser ab (Farrer et al., 1997). Der Besitz des  $\epsilon 4$ -Allel ist weder eine notwendige noch eine hinreichende Bedingung an AD zu erkranken, denn fast zwei Drittel der Alzheimerpatienten sind Nicht-Träger dieses Allels, und viele Träger werden sehr alt, ohne Krankheitssymptome zu zeigen (Borgaonkar et al., 1993; Rebeck et al., 1994).

## 1.5 Interleukin-6

IL-6 und seine Rezeptoren stehen im Mittelpunkt dieser Arbeit, so dass ihnen ein eigenes Kapitel gewidmet ist. Es handelt sich um ein multifunktionelles Zytokin, das ursprünglich als B-Zell-Differenzierungsfaktor (BSF-2) bezeichnet wurde. Die Umbenennung in IL-6 ist

angesichts seiner molekularen Übereinstimmung mit dem Hepatozyten-Stimmulierungsfaktor, Hybridoma-Plastozyten-Wachstums-Faktor und  $\beta$ -Interferon sowie seiner großen Ähnlichkeit mit anderen Zytokinen erfolgt. Das 26 kDa (Kilo-Dalton) lange Glykoprotein (gp), dessen Gen auf dem kurzen Arm des Chromosom 7 (7p21) lokalisiert ist, wirkt als Botenstoff zwischen den Zellen des Immunsystems, gilt als potentester Induktor der Synthese von Akutphase-Proteinen in der Leber (Morrone et al., 1988) und spielt eine wichtige Rolle als Differenzierungs- und Wachstumsfaktor von hämatopoetischen Zellen bzw. Zellen des Immunsystems. Eine Vielfalt von Zellen wie Astrozyten, Oligodendrozyten, Neuronen, Endothelzellen und Mikroglia sezernieren IL-6 oder reagieren auf IL-6-vermittelte Signale (Gruol und Nelson, 1997).

Im ZNS wirkt IL-6 neurotroph, wie auch neuroprotektiv (Satoh et al., 1988; Hama et al., 1989; Gadiant und Otten, 1997; Loddick et al., 1998; März et al., 1998). Beispielsweise führt ein Verschluss der Arteria cerebralis media zu erhöhter Bioaktivität von IL-6 in der ischämischen Hemisphäre und Injektion desselben in diese Region führt experimentell zu signifikanter Reduktion von Hirnschäden (Loddick et al., 1998). Des Weiteren wirkt es antiinflammatorisch indem es die Expression von VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und TNF- $\alpha$  hemmt (Benveniste et al., 1995; Shrikant et al., 1995; Oh et al., 1998).

IL-6 wird aber auch mit pathophysiologischen Prozessen im ZNS assoziiert. Wie bereits für IL-1 beschrieben, wird IL-6 ebenfalls mit einer erhöhten APP-Synthese in Verbindung gebracht (Altstiel und Sperber, 1991). Ursache könnte die stellenweise Übereinstimmung der Promotersequenz der meisten IL-6-induzierten Akutphase-Proteine (Tsuchiya et al., 1987) mit der Nukleotidsequenz des APP-Promoters (Salbaum et al., 1988) sein. In den  $\beta$ -Amyloidplaques führt IL-6 zur Akkumulation von Akutphase-Proteinen wie beispielsweise ACT (Aisen et al., 1997).

In transgenen Mausmodellen werden erhöhte IL-6-Konzentrationen im ZNS demonstriert, die mit neuropathologischen Effekten bzw. Erkrankungen in Verbindung gebracht werden können (Campbell et al., 1993 und 1995). Heyser et al. (1996) zeigen bei transgenen Mäusen, deren Astrozyten chronisch IL-6 exprimieren, ein konzentrations- und altersabhängiges Defizit im Lernverhalten, welches mit spezifischen neuropathologischen Veränderungen verbunden ist. Einer weiteren Studie (Luterman et al., 2000) beschäftigt sich mit der mRNA-Expression unterschiedlicher Zytokine (IL-6, TGF- $\beta$ 1, IL-1  $\beta$ , TNF-  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 Rezeptor Antagonist,  $\gamma$ -IFN) in drei unterschiedlichen Hirnregionen (entorhinaler-, superior temporaler-, occipitaler Kortex) postmortalen Hirngewebes mit dem Ziel, einen Zusammenhang der mRNA-Expression, der Schwere der Erkrankung, sowie der Menge an Neurofibrillenbündeln

nachzuweisen. Es zeigt sich, dass die IL-6-mRNA-Expression im entorhinalen und superior temporalen Kortex bei Patienten mit schwerer Demenz signifikant höher ist, als bei kognitiv normalen Probanden. Darüber hinaus weisen Probanden mit starker Ablagerung von Neurofibrillenbündeln in diesen Regionen ebenfalls signifikant höhere IL-6-mRNA-Konzentrationen auf, als Probanden ohne oder mit geringen Mengen an Neurofibrillenbündeln. Keine Veränderung zeigte sich bei steigender Amyloidablagerung.

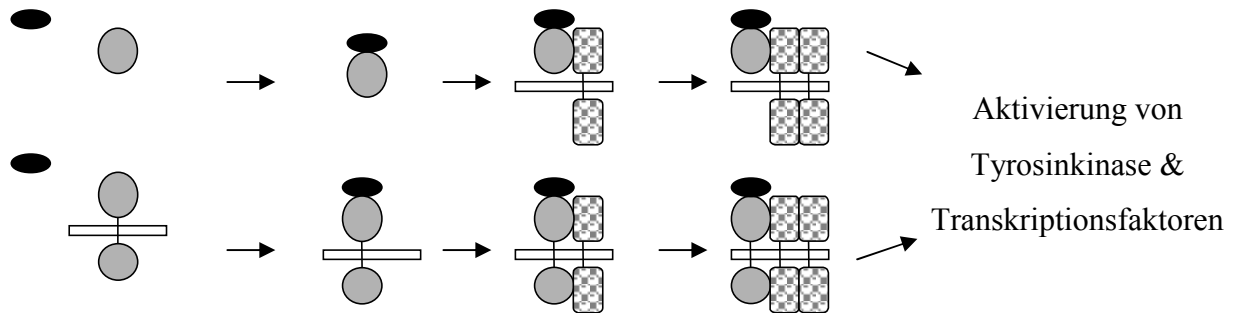
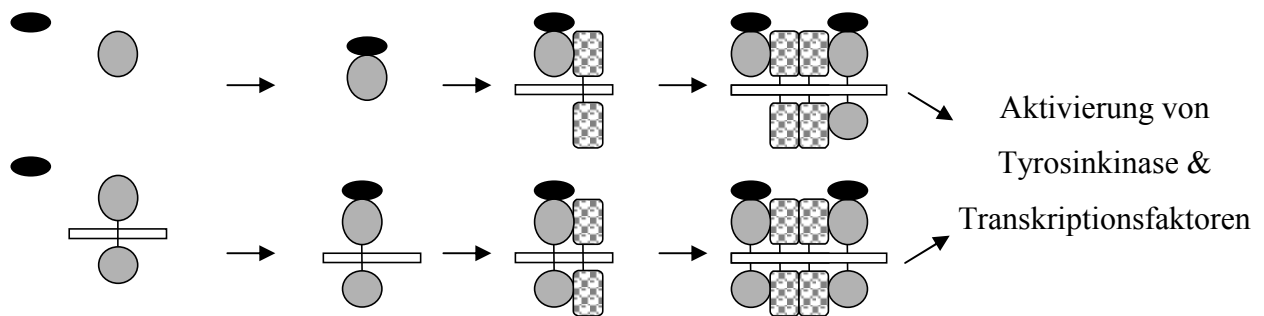
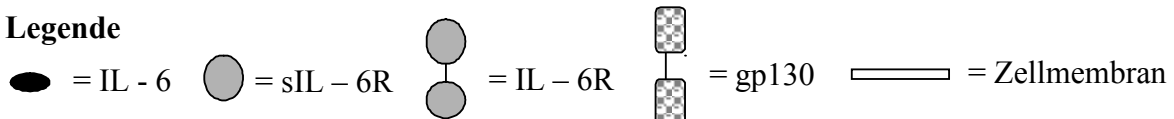
Solche Daten stützen die Hypothese, dass IL-6 eine wichtige Rolle für die Entstehung und den Verlauf der AD spielen könnte.

### **Der Wirkmechanismus**

IL-6 entwickelt seine biologische Wirkung über ein Rezeptorsystem. Dieses besteht aus zwei Rezeptoren, einem 80 kDa langen Glykoprotein, dem IL-6-Rezeptor (IL-6R, gp80,  $\alpha$ -chain) und einem weiteren 130 kDa langen Glykoprotein, das lediglich als gp130 bzw.  $\beta$ -chain bezeichnet wird.

Der IL-6R bindet das IL-6 direkt. Er kommt sowohl als lange, membranständige (IL-6R), sowie auch als kürzerer, rein lösliche Form (sIL-6R, s = soluble) vor. Letztere entsteht durch zwei unterschiedliche Wege. Entweder führt eine unterschiedliche mRNA-Spleißung (to splice = miteinander verbinden/ verkleben) zu einem sIL-6R, dem ein zytoplasmatischer und Zellmembran übergreifender Anteil fehlt (Rose-John und Heinrich, 1994), oder durch Proteolyse innerhalb der membrangebundenen Form nahe der Zelloberfläche, auch als "shedding" (to shed = etw. abwerfen) bezeichnet (Müllberg et al., 1993a).

Für die eigentliche Signaltransduktion ist das gp130 verantwortlich, wobei Voraussetzung ist, dass es als membrangebundene Form vorliegt. Allerdings wird es ebenfalls spontan in löslicher Form exprimiert (sgp130) (Müllberg et al., 1993b). Der gp130 Rezeptor kommt ubiquitär in fast allen Geweben vor und wird von einer Vielzahl von Zytokinen wie dem "Leukemia Inhibitory Factor" (LIF), Oncostatin M (OSM), Interleukin-11 (IL-11), Cardiotropin-1 (CT-1) und "Ciliary Neurotrophic Factor" (CNTF) als Signaltransduktor genutzt. IL-6 wird jedoch nicht von gp130 direkt gebunden. Erst im Komplex mit dem IL-6-Rezeptor steigt die Affinität und der IL-6\*IL-6R-Komplex (IL-6\*IL-6RK) assoziiert im Weiteren mit gp130. Dabei können Zellen, die zwar gp130, nicht aber den IL-6R exprimieren, durch einen Komplex von IL-6 und sIL-6R aktiviert werden. Der exakte Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt und die meisten Informationen leiten sich von Studien peripherer Systeme ab.

**A: Homodimerisation****B: Dimerisierung zum Hexamer****Legende****Abb. 3: Interleukin-6-vermittelte Signaltransduktion**

Es wird angenommen, dass es nach Bildung des IL-6\*IL-6RK sowohl mit der membrangebundenen als auch löslichen Form des IL-6R und Assoziation dieses Komplexes mit gp130 zur gp130-Homodimerisation kommt (Abb. 3, A). Der IL-6\*IL-6RK ist somit kovalent an zwei gp130 Moleküle gebunden, die gemeinsam die Signaltransduktions-Einheit bilden (Taga et al., 1989; Murakami et al., 1993). Diese Einheit besitzt keine wesentliche für die Signaltransduktion notwendige Kinaseaktivität, aber vermutlich assoziiert sie mit Tyrosinkinasen und aktiviert diese (Murakami et al., 1993; Stahl et al., 1994; Narazaki et al., 1994), was schließlich über Transkriptionsfaktoren zu Kernsignalen und Regulierung der Genexpression führt (Nakafuku et al., 1992; Satoh et al., 1992; Trautwein et al., 1993).

In anderen Studien stellt sich die Signaltransduktions-Einheit nicht als trimerer IL-6\*IL-6R\*gp130-Komplex dar, sondern als ein hexamerer Komplex, der jeweils zwei Moleküle von IL-6, IL-6R und gp130 umfasst (Ward et al., 1994; Paonessa et al., 1995). In diesem alternativen Modell bilden also IL-6, IL-6R und gp130 einen trimeren Komplex von dem wiederum zwei zu einem hexameren Komplex dimerisieren (Abb. 3, B). Es gibt Hinweise für eine direkte Wechselwirkung des IL-6 sowohl mit dem IL-6R als auch mit gp130 (D'Alessandro et al., 1993) und auch ein Kontakt der beiden IL-6 Moleküle innerhalb des hexameren Komplexes ist denkbar. In diesem Fall wäre IL-6 anders konfiguriert als in dem stabilen dimeren IL-6\*IL-6R-Komplex (Paonessa et al., 1995).

Die Ursache von Veränderungen der IL-6-Expression kann sowohl im IL-6, als auch in seinen Rezeptoren liegen. So zeigen Ringheim et al. (1998), dass IL-6 den APP-Metabolismus nur dann induziert, wenn der sIL-6R in ausreichender Konzentration vorliegt. Honda et al. (1992) zeigen, dass erhöhte IL-6-Konzentrationen mit erhöhter Produktion des sIL-6R assoziiert sind. Wir nehmen an, dass Messungen der löslichen IL-6-Rezeptoren im Liquor oder Serum Hinweise für pathologische Vorgänge geben könnten.

## 1.6 Inteleukin-6 und die Alzheimer Demenz

Bislang existieren nicht viele Studien, in denen IL-6-Rezeptoren im Liquor oder Serum von Alzheimerpatienten gemessen und verglichen werden, und die Ergebnisse sind inhomogen.

Weitaus mehr Studien gibt es hingegen zu IL-6 im Liquor und Serum, wobei die Ergebnisse nicht weniger divergent sind. Für gewöhnlich sind IL-6 Serumspiegel in Abwesenheit von Entzündungsvorgängen nicht messbar. Erst mit zunehmendem Alter werden sie auch unter physiologischen Bedingungen nachweisbar. So wird in einer Studie von Angelis et al. (1997) IL-6 im Serum von Alzheimerpatienten und gesunden Kontrollen nur bei wenigen Proben überhaupt nachweisbar. In anderen Studien ist es wiederum messbar, aber es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Alzheimerpatienten und Kontrollen (van Duijn et al., 1990; Lanzrein et al., 1998).

In einer Studie an Zellkulturen von Alzheimerpatienten und Kontrollen weisen jedoch Huberman et al. (1995) bei Monozyten, die mit Phytohemagglutinin (PHA) stimuliert wurden, signifikant höhere IL-6-Konzentrationen bei Alzheimerpatienten nach. Kálmán et al. (1997) stützen diesen Fund, indem sie bei Alzheimerpatienten im fortgeschrittenen Stadium signifikant höhere IL-6-Serumspiegel als bei Kontrollen finden. Zu gleichem Ergebnis kommen Bonaccorso

et al. (1998) bei Alzheimerpatienten im Vergleich zu altersgleichen, gesunden Probanden, und auch Maes et al. (1999 a) und Licastro et al. (2000) finden bei Alzheimerpatienten signifikant höhere IL-6-Serum bzw.- Plasmaspiegel als in ihrer Kontrollgruppe. Richartz et al. (2005) hingegen weisen ohne, als auch mit PHA-Stimulierung signifikant niedrigere IL-6-Spiegel im Serum von Alzheimerpatienten nach.

Liquormessungen zum IL-6 zeigen bei Alzheimerpatienten sowohl signifikant erhöhte (Blum-Degen et al., 1995; Jia et al., 2003; Martínéz et al., 2000), als auch erniedrigte (Yamada et al., 1995) IL-6-Konzentrationen. In der überwiegenden Zahl der Studien kann jedoch kein signifikanter Unterschied gemessen werden (Galimberti et al., 2008; Garlind et al., 1999; Gómez-Tortosa et al., 2003; Hampel et al., 1997; Kálmán et al., 1997; März et al., 1997; Popp et al., 2009; Sala et al., 2003).

Im Rahmen von Rezeptormessungen weisen Angelis et al. (1997) signifikant niedrigere sIL-6R-Konzentrationen im Serum von Alzheimerpatienten nach, was von Hampel et al. (1997) für Messungen im Liquor bestätigt wird. Dieselbe Arbeitsgruppe kann auch von einer signifikanten Erniedrigung löslicher Anteile des gp130 im Liquor von Alzheimerpatienten berichten (Hampel et al., 1999).

Grundsätzlich ist anzunehmen, dass bei psychiatrischen Erkrankungen Veränderungen im IL-6-Rezeptorsystem messbar sind. So zeigt eine Studie zur Major Depression (Stübner et al., 1999) bei Untersuchungen von IL-6, sIL-6R und sgp130 im Liquor bei Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant niedrigere IL-6- sowie auch sIL-6R-Konzentrationen. Keine Korrelation zeigt sich bei Vergleich der drei Parameter mit dem Alter oder Geschlecht. Für die Kontrollgruppe besteht ein signifikanter Zusammenhang bei Vergleich von sgp130 mit dem Alter.

Studien, die Zusammenhänge zwischen IL-6 und seinen Rezeptoren oder anderen, Faktoren wie dem Alter, der MMSE (Mini Mental State Examination: Kurztest zur Beurteilung geistiger Leistungsfähigkeit, der zur Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle Anwendung findet) und dem Geschlecht untersuchen, weisen bislang wenig richtungsweisende Ergebnisse auf. Weder IL-6 und sIL-6R (Angelis et al., 1997) noch IL-6 und der MMSE (Angelis et al., 1997; Galimberti et al., 2008; Hampel et al., 1997) beziehungsweise das Alter oder das Geschlecht (Hampel et al., 1997; Schuitemaker et al., 2009) korrelieren in den vorliegenden Studien bei AD miteinander.



## Das Interleukin 6-Gen

Genetische Varianten innerhalb des IL-6-Rezeptor-Systems nehmen voraussichtlich Einfluss auf Entstehung und Verlauf von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Somit kommen Mutationen sowohl im IL-6-Gen als auch in den Rezeptorgenen als Risikofaktoren im Rahmen der Alzheimerpathogenese in Frage. Für das IL-6 sind Polymorphismen bekannt, welche die Expression oder Funktionalität dieses Zytokins möglicherweise verändern.

Für einen "Variable Number of Tandem Repeat" Polymorphismus (VNTR-Polymorphismus) (Bowcock et al., 1989), der durch seinen Adenin- und Thymin-Reichtum und kurze Sequenzen, die sich mehrmals wiederholen, charakterisiert ist, wurde in einer Studie von Murray et al. (1997) eine signifikante Korrelation zwischen dem IL-6-Genotyp und der Knochendichte bei 200 weiblichen Probanden festgestellt. In einer vorangehenden Studie mit unserem Patientengut konnten wir eine ähnliche Beziehung zur AD nachweisen (Papassotiropoulos et al., 1999).

Der VNTR-Polymorphismus (IL-6vntr) befindet sich im intronischen Bereich des 3'-Endes des Interleukin-6-Gens. Die Struktur ist ausgesprochen polymorph, sodass in Abhängigkeit der Elektrophoresemethode unterschiedlich viele Allele detektiert werden können, die sich in ihrer Länge von 10 bp (bp = Basenpaare) bis zu 200 bp unterscheiden. Papassotiropoulos et al. (1999) zeigen einen Zusammenhang zwischen dem C-Allel des IL-6vntr (IL-6vntr\*C) und der AD. Die Präsenz dieses Allels ist bei Alzheimerpatienten im Gegensatz zu beiden Kontrollgruppen (gesunde Probanden und altersgleiche Patienten mit depressiven Erkrankungen) signifikant erniedrigt. Zusätzlich haben Alzheimerpatienten, die Träger des C-Allels sind, ein um fünf Jahre höheres Manifestationsalter. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass das IL-6vntr\*C einen protektiven Einfluss auf die Alzheimergenese hat. Träger haben demnach ein vermindertes Risiko, an der AD zu erkranken, bzw. entwickeln wesentlich später klinische Symptome, da der Krankheitsverlauf verzögert ist.

Ein anderer Polymorphismus im IL-6 Gen, der in der Promoterregion liegt (IL-6prom), führt bei Patienten mit juveniler chronischer Arthritis zu einem veränderten IL-6-Stoffwechsel (Fishman et al., 1998). Genauer handelt es sich um einen G → C- Polymorphismus in Position -174 am 5'-Ende des IL-6-Gens. Je nach Genotyp werden veränderte IL-6-Plasmakonzentrationen gemessen, die bei Trägern des C-Allels (IL-6prom\*C) signifikant erniedrigt sind. Da die Häufigkeit dieses Allels bei Erkrankten stark reduziert ist, geht man von einem protektiven Effekt bei Präsenz des IL-6prom\*C aus. Ein solcher Effekt wäre auch bei der AD denkbar.

Bagli et al. (2000) finden für diesen Polymorphismus jedoch zunächst bei Alzheimerpatienten keine positive Assoziation. Sowohl Genotyp- und Allelverteilung, als auch das Manifestationsalter stehen in keinem statistischen Zusammenhang. Interessanterweise besteht jedoch ein starkes Linkage-Disequilibrium zwischen dem IL-6vntr und IL-6prom ( $\chi^2 = 104,28$ ,  $df = 2$ ,  $p \leq 0,001$ ). Dies könnte bedeuten, dass unter Umständen noch ein weiterer, funktionell bedeutender Polymorphismus ebenfalls im Linkage-Disequilibrium mit dem IL-6vntr steht und eine Erklärung für die mutmaßlichen Folgen des VNTR- Polymorphismus liefern könnte.

Folgestudien kommen auch hier zu unterschiedlichen Ergebnissen. Licastro et al. (2003) bestätigen ein verringertes Vorkommen des IL-6vntr\*C bei Alzheimerpatienten im Vergleich zu Kontrollen und assoziieren es außerdem mit einem geringen Erkrankungsrisiko. Darüber hinaus finden sie, im Gegensatz zu Bagli et al. (2000), dass das IL-6prom\*C bei Patienten überrepräsentiert und das Alzheimerisiko der Allelträger signifikant erhöht ist. In Anlehnung ist wiederum ein starkes Linkage-Disequilibrium, welches von Licastro et al. (2003) zwischen dem D-Allel des IL-6vntr und dem IL-6prom\*C beschrieben wird, wobei homozygote Träger erhöhte IL-6-Plasma-Spiegel aufweisen. Auch Arosio et al. (2004) stellen die Theorie des protektiven Effekts bei Präsenz des IL-6prom\*C in Frage. Sie finden in einer Studie mit 65 Alzheimerpatienten und 65 Kontrollen bei Genotypisierung des IL-6prom den GG-Genotyp bei Alzheimerpatienten erniedrigt und das CC-Genotyp signifikant ( $p < 0,005$ ) erhöht. Es wird ein 3-fach erhöhtes Alzheimerisiko bei Vorliegen des CC-Genotyps abgeleitet, das interessanterweise auf das 11-fache steigt, wenn neben dem C-Allel des IL-6prom, auch noch das A-Allel eines Polymorphismus in der Promoterregion des Interleukin 10 (IL-10: -1082 G  $\rightarrow$  A-Polymorphismus) vorliegt.

Weitere Studien zum Promoterpolymorphismus des IL-6 bestätigen wiederum das Ergebnis von Bagli et al. (2000), in dem sie keinen signifikanten Unterschied bei der Allelverteilung zwischen Alzheimerpatienten und Kontrollen finden (Capurso et al., 2004; Depboylu et al. 2004; Ravaglia et al., 2006; van Oijen M et al., 2006; Paradowski et al., 2008; Zhang et al., 2004). Letzteres gilt auch für Vural et al. (2009), die kein erhöhtes Krankheitsrisiko bei Präsenz des IL-6prom\*C allein, jedoch wie bereits bei Arosio (2004) für einen Promoterpolymorphismus im IL-10 beobachteten, bei gleichzeitigem Vorkommen des IL-6prom\*C Allel und des A-Allel des TNFalpha-308-Polymorphismus ein 3-fach erhöhtes Alzheimerisiko beschreiben. Auch Vural et al. (2009) vermuten im Hinblick auf die Alzheimergenese einen modifizierenden Effekt bei Vorliegen mehrerer Polymorphismen.

## 2 Zielsetzung der eigenen Untersuchungen

Die Studie wird an Alzheimerpatienten und einer gemischten Kontrollgruppe, bestehend aus Patienten mit Depressionen, leichten Gedächtnisstörungen, vaskulärer und alkoholtoxischer Demenz, erfolgen.

Eine Aufgabe der Alzheimerforschung ist diagnostische Parameter zu finden, welche Diagnosestellung und Verlaufskontrolle vereinfachen. In diesem Zusammenhang sind auch inflammatorische bzw. immunologische Faktoren von Bedeutung. In dieser Arbeit werden IL-6-Parameter (IL-6, sIL-6R, sgp130) im Serum und Liquor bei Alzheimerpatienten und einer gemischten Kontrollgruppe untersucht. Ziel ist festzustellen, ob bei Alzheimerpatienten signifikante Veränderungen nachzuweisen sind, die für die Alzheimerdiagnostik von Nutzen sein könnten.

Desweiteren soll der Frage nachgegangen werden ob IL-6-Genpolymorphismen (IL-6vntr, IL-6prom) und der ApoE-Polymorphismus Einfluss auf die Konzentrationen der IL-6-Parameter nehmen. Der ApoE-Polymorphismus wird in der Literatur als gesicherter Risikofaktor für die AD angesehen, was in vorangehenden Studien auch für unsere Probanden bestätigt werden konnte.

Die Hypothese ist, dass sich die Konzentration von IL-6 und seinen Rezeptoren in Serum und Liquor bei Patienten und Kontrollen unterscheiden und dass die Expression von IL-6 und möglicherweise auch seiner Rezeptoren durch den IL-6-Genotyp beeinflusst wird.

Im Hinblick auf zukünftige, weniger invasive Methoden in der Alzheimerdiagnostik stellen wir die Hypothese auf, dass eine Korrelation der IL-6- bzw. IL-6-Rezeptorkonzentrationen im Serum- und Liquor besteht, so dass durch Messungen peripherer Marker auf zentrale Vorgänge geschlossen werden kann.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Patienten

Für diese Studie wurden 58 Alzheimerpatienten (Alter:  $71,2 \pm 8,6$  Jahre) und eine gemischte Kontrollgruppe von 25 Probanden (Alter  $65,4 \pm 10,5$  Jahre) rekrutiert (Tab. 1). Die Rekrutierung der Kontrollgruppe, sowie 31 der Alzheimerpatienten fand in der Psychiatrischen Klinik der Universität Bonn statt. Weitere 27 Alzheimerpatienten wurden in der Psychiatrischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München rekrutiert. Der IL-6prom- Polymorphismus wurde nur im Bonner Kollektiv analysiert.

Die klinische Diagnose wurde in Übereinstimmung mit den NINCDS-ADRDA-Kriterien (McKhann et al., 1984) gestellt. Zum Ausschluss anderer psychiatrischer Erkrankungen wurde sowohl die klinische als auch familiäre Anamnese erhoben. Darüber hinaus fanden ein psychiatrisches Gespräch, eine allgemeinmedizinische und -neurologische Untersuchung, neuropsychologische Tests, Blut- und Liquoruntersuchungen, sowie computertomographische Aufnahmen statt.

Die Kontrollgruppe setzte sich aus sechs Patienten mit Depressionen, sechs mit leichten Gedächtnisstörungen, zwölf Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen und einem Patienten mit einer alkoholtoxischen Demenz zusammen. Patienten, die an einer akuten oder chronischen Entzündung litten und solche, die antiinflammatorische Medikamente einnahmen, wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn genehmigt. Alle Probanden wurden über die Verwendung ihrer Blut- und Liquorproben aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis. Die Studie wurde verblindet durchgeführt, das heißt weder der Versuchsleiter noch der Doktorand kannten die Zugehörigkeit der einzelnen Proben zu einer der beiden Gruppen.

		Patienten	Kontrollen
<b>Anzahl</b>	<b>n</b>	58	25
<b>weiblich</b>	<b>%</b>	62,1	56
<b>Alter</b>	<b>m <math>\pm</math> <math>\sigma</math></b>	$71,2 \pm 8,6$	$65,4 \pm 10,5$
<b>MMSE</b>	<b>m <math>\pm</math> <math>\sigma</math></b>	$19,4 \pm 5,0$	$24,5 \pm 4,4$

n: Personenzahl, m: Mittelwert in Jahren,  $\sigma$ : Standardabweichung

**Tab. 1: Demographische und klinische Daten der Alzheimerpatienten und Kontrollen**

## 3.2 Materialien

### 3.2.1 Geräte

Elisa-Reader MRX:	DYNEX Technologies GMBH, The Microtiter® Company, Frankfurt, Deutschland
Färberahmen:	Bender'scher Färberahmen von Bio Tech Trade und Service GmbH (BTS), St. Leon-Rat, Deutschland
Fluoreszenz-Tisch:	TFX 20M von Vilber Lourmat, Marne-LA-Vallee Cedex 1, Frankreich
Gelkammer (horizontal):	Wide Mini-Sub Cell GT von BioRad Lab., California, USA
Gelkammer (vertikal):	Sequi-Gen® GT von BioRad Lab., California, USA
Gelelektrophorese:	PowerPac 3000 von Bio-Rad Lab., Hercules, Ca, USA
Gel-Vakuumtrockner:	HydroTech - Vakuum Pump, Gel-Dryer (M 583) von BioRad Lab., Hercules, Ca, USA
Inkubator:	Unitek HB-130 von LTF Labortechnik GmbH, Wasserberg, Deutschland
Laborwaage:	SBA/SBC von Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
Mikrowelle:	HMT 8123 von Bosch, Deutschland
PCR-Thermocycler:	PTC-200 Peletier-Thermal-Cycler von MJ Research, Global Medical Instrumentation, Inc., St. Paul, Minnesota, USA
pH-Meter:	Multi Cal von WTW, Weilheim, Deutschland

Photodokumentation:	DS-34 Direct Screen Instant Camara mit 3¼ x 4¼ Film Packs von Polaroid GmbH, Offenbach, Deutschland
Qiagen-Tip Säulen:	Qiagen, Hilden, Deutschland
Semimikrowaage:	SBC21 von Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
Sequenzier-Apparatur:	Sequenzer 373A von Applied Biosystems, Perkin Elmer, Weiterstedt, Deutschland
Spektralphotometer:	Spectrometer UV-120-02 von Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Deutschland
Tisch-Zentrifuge:	Model 5412 von Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln, Deutschland
Vakuumtrockner:	HydroTech Vacuum Pump mit Gel-Dryer (Model 583) von BioRad, München, Deutschland
Vakuumzentrifuge:	Speed Vac Plus SC 110A Savant, Refrigerated Condensation Trap RT 100 von Thermo Life Sciences, England
Wasserbad:	Wanne 22A von Julabo PC und Zubehör, Seelbach, Schwarzwald
Zentrifuge:	Varifuge 3,0R Heraeus Sepatech von Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf, Deutschland

### 3.2.2 Reagenzien

Gene Amp dNTPs (10 mM):	Applied Biosystems, Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland
Ammonium-Persulfat (APS) TEMED:	Bio-Rad Lab., Hercules, Ca, USA

Agarose-Gel, "Seakem GTC Agarose", FMC BioProducts, Rockland, Maine, USA  
 Gelstar (10000x in DMSO), Metaphor-  
 Agarose, Long Ranger Gel Solution:

Primer (100 pmol/μl): Interaktiva Biotechnologie, Ulm, Deutschland:

Molecular Weight Marker, Proteinase K: Roche Molecular Biochemicals, Mannheim,  
 Deutschland

Aqua dest, "HPLC analyzed": T.J. Baker

Folgende **Chemikalien** wurden mit pro analysi (p.a.) Reinheitsgrad von *Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland* bezogen:

Borsäure, Bromphenolblau-Natriumsalz, Dichlordimethylsilan, Dimethylsulfoxid (DMSO), getrocknet, EDTA (Titriplex), Essigsäure konz. (98 %), Ethanol (absoluto), Ethanol (70 %), Formaldehyd (37 % und 95 %), Glycerol, HCl konzentriert 37,5 %, Harnstoff, Isopropanol, Natriumacetat, Natriumhydroxid 6M (Plätzchen), Salpetersäure (65 %), Silbernitrat, Tris-HCl, Xylencyanol.

### Enzymsysteme

Taq DNA Polymerase System: Amersham Pharmacia Biotech,  
 Buckinghamshire, England

Expand High Fidelity PCR System: Boehringer, Mannheim, Deutschland

Restriktionsenzyme (BstNI, Hha I, SFA NI, Mwo I): New England Biolabs GmbH,  
 Schwalbach/Taunus, Deutschland

### Kits

Quantikine®HS human IL-6, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt,  
 Quantikine® human IL-6 sR, Deutschland

Quantikine™ human soluble gp130:

DNA-Analyse-Kit: Qiagen, Hilden, Deutschland

### 3.2.3 Lösungen und Puffer

Wenn nicht anders erwähnt, wurde destilliertes Wasser verwendet, das mit einem Ionenaustauscher (SG-280) der Firma SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH (Barsbüttel, Deutschland) gereinigt wurde. 10x bedeutet, dass die Lösung 10fach konzentriert war.

**TBE-Puffer (10x):** Tris-HCl (892 mM), Borsäure (825 mM), EDTA (40 mM); pH 8

#### DNA-Analyse-Kit:

G1-Puffer: Saccharose (310 mM), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), Tris-HCl (10 mM), Triton-X-100 (1 %); pH 7,5

G2-Puffer: Guanidin-HCl (800 mM), EDTA (30 mM), Tris-HCl (30 mM), Tween 20 (5 %), Triton-X-100 (0,5 %); pH 7,5

QBT-Puffer: NaCl (750 mM), MOPS (50 mM), Triton-X-100 (0,15 %), Ethanol abs. (15 %); pH 7

QC-Puffer: NaCl (1M), Tris-HCl (50 mM), Ethanol abs. (15 %); pH 7

QF-Puffer: NaCl (1,25 M), Tris-HCl (50 mM), Ethanol abs. (15 %); pH 8,5

TE-Puffer: Tris-HCl (10 mM), EDTA (1 mM); pH 8

Proteinase K: 100 mg Proteinase K (Roche) in 5 ml Aqua dest. gelöst = 20 mg/ml, pro Probe wurden 200 µl = 4 mg eingesetzt.

#### Reagenzien zur PCR:

**Primer:** Die Primer wurden in destilliertem Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 100 ng/µl eingestellt



**Nukleotid-Mix:**

Die Nukleotide (je Stammlösung 10 mM) wurden zu gleichen Anteilen gemischt (Nukleotidlösung 2 mM) und bei -20 °C gelagert.

**Expand High Fidelity PCR System:**

Enzym:

3.5 U/  $\mu$ l

Puffer (10 x):

20 mM Tris-HCL (pH 7,5 bei 25 C), 100 mM KCl, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 0,1 mM EDTA, 0,5 % TWEEN-20, 0,5 % Nonidet P40 (v/v), 50 % Glycerol

MgCl<sub>2</sub>-Lösung:

25 mM

**Taq DNA Polymerase-System:**

Enzym :

5 Units/ $\mu$ l (U/ $\mu$ l)

Puffer (10 x) :

100 mM Tris-HCl (pH 9), 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>

**Restriktionsenzyme:****BstN I:**

Enzym:

10 U/ $\mu$ l in 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCL (pH 7,4), 0,1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 200  $\mu$ g/ml BSA, 50 % Glycerin

NE-Puffer 2:

50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol (pH 7,9)

**Hha I:**

Enzym:

20 U/ $\mu$ l in 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCL (pH 7,4), 0,1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 200  $\mu$ g/ml BSA, 50 % Glycerin

NE-Puffer 2: 50 mM Kaliumacetat, 20 mM Tris-HCl, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM Dithiotreitol (pH 7,9)

**Mwo I:**

Enzym: 5 U  $\mu$ l in 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 200  $\mu$ g ml BSA, 50 % Glycerin

NE-Puffer: 150 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM Dithiotreitol (pH 7,9)

**SfaN I:**

Enzym: 1 U  $\mu$ l in 250 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 200  $\mu$ g ml BSA, 50 % Glycerin

NE-Puffer 3 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM Dithiotreitol (pH 7,9)

Bei jedem Enzymsystem wurde zusätzlich bovines Serumalbumin (BSA = 100 mM) eingesetzt.

### 3.2.4 Gele zur Trennung von DNA-Fragmenten

**Agarosegele:**

Metaphorgele (2-4 %): 2-4 % Metaphor in 1x-TBE-Puffer (70 ml), Färbung mit 1x-Gelstar (7  $\mu$ l Gelstar auf 70 ml)

Auftragspuffer (10 x): 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylenecyanol, 15 % Ficoll 400; der Ansatz wird im Ultraschallbad gelöst

Laufmittel: 10 x TBE-Puffer wird mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnt

**Polyacrylamidgele:**

Long Ranger Gel (denaturierend) 5 %:	Harnstoff (25,5g), 0,6x TBE-Puffer (3,6 ml), 5 % Long Ranger Gel Solution (6,0 ml), mit Aqua dest. auf 60 ml aufgefüllt, 10 % (100mg auf 1 ml) APS (300 µl), TEMED-Lsg.( 30 µl)
Ladepuffer:	Fornamid (47,5 ml), Xylencyanol (50 mg), Bromphenolblau (50 mg), EDTA 0,25 M pH 9,5 (2 ml) auf 50 ml Aqua dest
Laufmittel:	10 x TBE-Puffer (120 ml), Aqua dest. (1180 ml)
Silberfärbung: Ethanol (10 %):	200 g Ethanol absolut ad 2l H <sub>2</sub> O
Salpetersäure (1 %):	31 ml konz.- (65 %)-Salpetersäure ad 2l H <sub>2</sub> O
Silbernitrat (0,2 %):	4 g Silbernitrat ad 2l H <sub>2</sub> O
Formaldehyd-Lsg.:	60 g Natriumcarbonat und 2,5 ml Formaldehyd ad 2l H <sub>2</sub> O
Essigsäure (10 %):	200 ml konz. Essigsäure (98 %) ad 2l H <sub>2</sub> O

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Enzym Linked Immunosorbent Assay

##### Prinzip

Der Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) ist ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Proteinen. Das Prinzip basiert darauf, die zu bestimmenden Proteine bzw. Peptide an einen spezifischen Antikörper zu binden, an den gleichzeitig ein Enzym gekoppelt ist. Dieses ist in der Lage ein spezifisches Substrat umzusetzen, was einen Farbumschlag zur Folge hat. Die Farbintensität ist proportional zur Konzentration der Substanz, die bestimmt werden soll, und wird photometrisch (ELISA-Reader) ermittelt.

##### Durchführung

Für die Messungen von IL-6, sIL-6R und sgp130 im Plasma und Liquor wurden Kits der Firma R&D-Systems verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentrationen der einzelnen Parameter lagen alle innerhalb der vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenzen. Die untere technisch mögliche Nachweisgrenzen wurden mit 0,15 ng/l für das IL-6 und mit 0,016 µg/l für das sIL-6R mit bestimmt. Zum Kalibrieren der Assays wurden nach Vorgabe des Herstellers Verdünnungsstufen angelegt, die vor jeder Messung durchgeführt wurden und als Eichkurve dienten. Der Hersteller sah für das IL-6 eine Standardkonzentration von 10,0 ng/l vor, die in sechs Schritten auf 0,156 ng/l verdünnt wurde. 10,0 ng/l entsprach somit der höchsten Eichkonzentration, die Kalibrator-Lösung RD5C diente respektive als Nullstandard (0 ng/l). Beim sIL-6R und sgp130 erfolgten die Verdünnungsstufen in gleicher Weise ausgehend von einer Standardkonzentration von 2 µg/l auf 0,0312 µg/l beim sIL6-R und respektive von 8,0 µg/l auf 0,125 µg/l beim sgp130. Der Intraassayvariationskoeffizient lag jeweils bei unter 5 %.

Vor Messung von sIL-6R und sgp130 wurden unserer Plasma- und Liquorproben mit Kalibrator-Lösung RD5C (1x) verdünnt (Tab. 2). Die Messung von IL-6 erfolgte mit unverdünnten Proben.

Parameter	Probematrix	Verdünnung
sIL-6R	Plasma	1:40
	Liquor	1:2
sgp130	Plasma	1:100
	Liquor	1:10

**Tab. 2: Verdünnung der ELISA-Proben**

### 3.3.2 DNA-Isolierung

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde unter der Verwendung eines Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben isoliert. Es wurden jeweils 10 ml EDTA Vollblut verwendet, was 4 ml Blutzellsediment entsprach. Nach Abschluss der Isolierung wurde die DNA getrocknet und in TE-Puffer gelöst.

#### Konzentrationsbestimmung der DNA

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die DNA im Verhältnis 1:50 (10 µl DNA-Lösung auf 490 µl Aqua dest.) verdünnt und die Konzentration (Konz.) über die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen und mit TE-Puffer auf 300 µl/ml (Sollwert) eingestellt. Als Referenzwert (Nullwert) diente Wasser. Die OD ist die Menge an Substanz gelöst in 1 ml, die in einem Spektralphotometer bei einer optischen Schichtdicke von 1 cm eine Absorption von 1 hat. Die Konzentration wurde nach der Formel:

$$1 OD_{260} = \frac{50 \mu g \text{ DNA}}{ml}$$

berechnet. Aus dem Koeffizienten der OD bei 260 nm und 280 nm ließ sich die Reinheit (Verhältnis der DNA-Menge zum Proteinanteil) der Probe ermitteln. Der Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die zur Konzentrationseinstellung benötigte Puffermenge (X) berechnet sich nach der Formel:

$$X = \text{Probenvolumen} - \frac{\text{Konzentration } (\mu l/ml)_{(gemessen)} * \text{Probenvolumen}}{300 \mu l/ml_{(Sollwert)}}$$

Frühestens einen Tag nach jedem Verdünnungsschritt wurde die Konzentration erneut photometrisch bestimmt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4 °C.

### 3.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

#### Prinzip

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR: Polymerase-Chain-Reaction) dient der in vitro Amplifikation von definierten DNA-Abschnitten. Durch den Einsatz hitzestabiler

DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien (*Thermophilus aquaticus*, Taq-Polymerase), die auch noch bei Denaturierungstemperaturen (94 °C) ihre biologische Aktivität behalten, werden DNA-Abschnitte von bis zu 20 kb (Kilobasen = kb = 1000 Basenpaare) amplifiziert. Die Zielsequenz, also beispielsweise ein polymorpher Bereich, wird festgelegt und dazu passende Oligonukleotide (Primer) ausgewählt. Diese werden benötigt, um den zu amplifizierenden Bereich einzugrenzen und die Synthese zu dirigieren. Die Taq-Polymerase liest die Einzelstrang-DNA vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende. Die Nukleotidsequenz der Primer muss somit den jeweiligen DNA-Einzelstrang vom 5'-Ende ausgehend komplementieren. Nachdem das Original (Template) einmal abgelesen wurde, dienen auch die Kopien als Matrize. So erhält man nach  $n$  Zyklen theoretisch  $(2n-1)$  Kopien des Originals. Tatsächlich erhält man bei optimalen Bedingungen nach 30-35 Zyklen ca. 106 Kopien (Saiki et al., 1988).

### **Reaktionszyklen:**

**Vordenaturierung:** Vor Beginn der eigentlichen PCR wurde die DNA bei einer Temperatur von 92-96 °C vordenaturiert, um den Doppelstrang in seine Einzelstränge zu zerlegen und optimale Anlagerungsbedingungen für Primer zu schaffen.

### **PCR-Zyklen:**

**Denaturierung:** Zu Beginn jedes neuen Zyklus wurde die DNA erneut denaturiert, um hybridisierte Einzelstränge zu trennen.

**Annealing:** In der Annealingphase lagerten sich beide Primer an die Einzelstränge an und hybridisierten mit ihnen. In Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung der Primer, lag die Annealingtemperatur zwischen 55 °C und 72 °C.

**Elongation:** Es erfolgte die Elongation (Verlängerung) der Primer bzw. Synthese des neuen DNA-Stranges durch den Einbau freier Nukleotide. Gewöhnlich fand diese bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der hitzestabilen DNA-Polymerase statt.

**Endelongation:** Nach 30 bis 35 solcher Zyklen wurde abschließend eine ca. siebenminütige Inkubation bei Elongationstemperatur durchgeführt. Diese sollte garantieren, dass zum Schluss alle synthetisierten Stränge bis zum Ende repliziert wurden, und sich so die Anzahl abgebrochener Replikationen verringert. Die PCR war nach Abkühlung der Proben auf 4° C beendet.

Die für diese Studien verwendeten genspezifischen PCR-Bedingungen sind in Tab. 3 und Tab. 4 zusammengefasst. Die Optimierung der PCR orientierte sich an den Empfehlungen der Hersteller des Enzymsystems, sowie am Protokoll des Erstautors (Tab. 3). Für alle Amplifikationen wurde genomisches Template verwendet.

**PCR-Bedingungen:**

Gen	PCR	Auswertung	Optimierung nach:
<b>Apo E</b>	95 °C für 5 min, (95 °C für 20 sec, 55 °C für 30 sec, 72 °C für 40 sec) x 30, 72 °C für 7 min	3 % M-Gel	Hixson und Vernier, 1990
<b>IL-6vnr</b>	95 °C für 5 min, (95 °C für 30 sec, 57 °C für 30 sec, 72 °C für 1 min) x 30, 72 °C für 5 min	5 % LR-Gel	Bowcock et al., 1989
<b>IL-6prom</b>	95 °C für 5vmin, (95 °C für 1 min, 64 °C für 1 min, 72 °C für 2 min) x 25, 72 °C für 10 min	2 % M-Gel	Fishman et al., 1998

M: Metaphor, LR: Long Ranger

**Tab. 3: Genspezifische PCR-Zyklen und Auswertung**

Gen	Template (ng)	Enzym-system	Enzym (U)	Primer (nM)	Nucleotide (µM)	DMSO (%)	MgCL2 (mM)	Tubevolumen (µl)	Restriktions-enzym
<b>Apo E</b>	750	HF	1	300	200	10	1,5	50	Hha I
<b>IL-6vnr</b>	1050	T	2,5	520	80	2	1,5	50	-
<b>IL-6prom</b>	300	T	2,0	300	500	-	3,0	50	SFA NI

HF: High Fidelity PCR System, T: Taq-Polymerase

**Tab. 4: Genspezifischer PCR-Ansatz**



### Auswahl der PCR-Primer

Um eine hohe Spezifität zu gewährleisten, sollte ein Primer möglichst nur mit einer Stelle im Genom hybridisieren. Eine Primerlänge von 18-30 bp war für die meisten DNA-Amplifikationen optimal. Bei Primern unterhalb einer Länge von 15 bp ist die Wahrscheinlichkeit, dass es mehr als eine komplementäre Region gibt, groß. Die optimale Annealingtemperatur wich oft von der abgeschätzten Schmelztemperatur ( $T_m$ ) ab. Dies kam auch vor, wenn die Schmelztemperatur beider Primer nahe beieinander lag. Die  $T_m$  konnte annäherungsweise mit der Formel:

$$T_m = (n_A + n_T) \cdot 2^\circ\text{C} + (n_G + n_C) \cdot 4^\circ\text{C}$$

ermittelt werden. Für gewöhnlich wurde jedoch die exakte  $T_m$  vom Hersteller angegeben. Als Ausgangspunkt für die empirische Optimierung der Annealingtemperatur wurde 3-5 °C unterhalb der  $T_m$  begonnen und ein Temperaturgradient gefahren.

Bei der Primerwahl wurden nach Möglichkeit nicht mehr als drei Guanin (G) oder Cytosin (C) an das 3'-Ende gelegt, da diese drei Wasserstoffbrückenbindungen eingehen, und somit eine unspezifische Anlagerung der Primer stabilisiert würde. Da Thymin (T) mehr als die anderen Nukleotide dazu neigt, unspezifische Bindungen einzugehen, wurde es weitestgehend vermieden, den Primer mit Thymin enden zu lassen. Um der Bildung von Primerdimeren vorzubeugen, wurden komplementäre Sequenzen innerhalb eines Primers oder zwischen beiden Primern zueinander ausgeschlossen. Als Folge solcher Primerdimere können unspezifische Beiprodukte entstehen. Darüber hinaus würde die Ausbeute der PCR verringert, da weniger Primer zur Amplifikation zu Verfügung stünde. Die Sequenzspezifität der Primer wurde an Online-Gendatenbanken (Altschul et al., 1997) überprüft. In der nachfolgenden Tab. 5 sind die verwendeten Primer dargestellt. Alle Primer (100 mol/ $\mu$ l) wurden von Interactiva Ulm, Deutschland bezogen. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) richtete sich nach den Angaben des Herstellers.

Gen	Vorwärts-Primer (5' → 3')	Tm °C	Rückwärts-Primer (3' → 5')	Tm °C	Wildtyp- länge (bp)
<b>Apo E</b>	ggc acg gct gtc caa gga g	63,8	aca gaa ttc gcc ccg gcc tgg tac ac	60,6	244
<b>IL-6vnt</b>	gca act ttg agt gtg tca cg	48,7	tga cgt gat gga tgc aac ac	52,2	610-822
<b>IL-6prom.</b>	cag aag aac tca gat gac tgg	46,1	gact ggg ctc ctg gag ggg	59,0	611

**Tab. 5: Verwendete Primer und ihre Schmelztemperaturen**

### 3.3.4 PCR-basierter Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus

#### Prinzip

Mit einem PCR-basierten Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) kann ein Amplifikat im Hinblick auf eine Mutation untersucht werden. Genauer gesagt kann durch diese Methode nach Amplifikation einer bestimmten Zielsequenz zwischen unterschiedlichen Genotypen bzw. Allelen unterschieden werden.

Es gibt Restriktionsenzyme, die ein bestimmtes Nukleotid oder sogar eine längere mehr oder weniger genau definierte DNA-Sequenz erkennen und den DNA-Strang an einer definierten Stelle teilen, also schneiden. Je nachdem ob diese definierte Sequenz ein Mal oder mehrmals in dem Amplifikationsprodukt vorkommt, erhält man unterschiedlich viele Schnittstücke. Es handelt sich bei diesen Restriktionsenzymen um nativ vorkommende Enzyme, die von Bakterien geklont werden.

Zahlreichen Polymorphismen liegt der Austausch eines Nukleotids zugrunde. Bei solchen Punktmutationen besteht häufig die Möglichkeit, die DNA an genau dieser Stelle durch ein passendes Restriktionsenzym zu schneiden. Das Zielgen wird mittels einer PCR amplifiziert und anschließend mit dem Restriktionsenzym verdaut (Inkubation von 4-12 Stunden). Je nach Sequenz liegen dann das ungeschnittene Amplifikationsprodukt, ein weiteres oder auch mehrere Schnittstücke vor. In Abhängigkeit ihrer DNA-Konfiguration haben die DNA-Sequenzen ein unterschiedliches Laufverhalten, was in der elektrophoretischen Auswertung dann je nach Genotyp unterschiedlich viele Banden ergibt. Ein bestimmter Genotyp ist also durch ein charakteristisches Bandenmuster definiert. Die in dieser Studie verwendeten Restriktionsenzyme und Inkubationsbedingungen wurden in Tab. 6 und Tab. 7 zusammengefasst. Jedem Ansatz wurden BSA (1 x) und ein Enzymspezifischer Reaktionspuffer (1 x) zugegeben und beim

IL-6prom bezieht sich die Berechnung von BSA und Puffer auf das Gesamtvolumen und nicht wie sonst auf den Enzymmix.

Gen	Länge des Amplifikationsprodukts (bp)	Erkennungssequenz mit Schnittstelle	Länge der Schnittprodukte (bp)
Apo E	228	5'...GCG*C...3' 3'...C*GCG...5'	jedes Allel: 16 + 18 + 38 ε2-Allel: 81 + 91 ε3-Allel: 33 + 48 + 91 ε4-Allel: 20 + 33 + 48 + 71
IL-6prom	611	5'...GCATC(N)5*...3' 3'...CGTAG(N)9*...5'	G-Allel: 611 C-Allel: 244 + 377

**Tab. 6: Restriktionsenzyme und Schnittprodukte**

Gen	Enzym-system	Enzym-menge (U)	PCR-Produkt (µl)	Enzymmix pro Probe (µl)	Inkubation Temp./Zeit (°C/h)
Apo E	Hha I	5	50	5	40 / 18
IL-6prom	SfaN I	0,25	20	5	37 / 4

**Tab. 7: Enzymsystem und Inkubationsbedingungen**

### Fällung

Um unspezifische Reaktionen bei der Verdauung durch ein Restriktionsenzym und daraus resultierende undeutliche, schlierige Banden im Elektrophoresegel zu vermeiden, wurde das PCR-Produkt im Falle des ApoE und IL-6prom aufgereinigt. Dazu wurden dem gesamten PCR-Ansatz 2 µl 3 M Na-Acetat und 50 µl Ethanol (absolut) hinzugegeben. Die Fällung der DNA fand dann über 18 h bei  $-20^{\circ}$  C statt. Daran schloss sich eine Zentrifugation von 30 min bei 3500 g und  $4^{\circ}$  C an. Der Überstand wurde verworfen. Es folgte die Zugabe von 100 µl 70 %-igen Ethanol und eine Inkubation von 30 min bei  $-20^{\circ}$  C, nach welcher der Ansatz wie zuvor

zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Proben getrocknet. Im Anschluss wurde dann erst das Restriktionsenzym zugegeben.

### **3.3.5 Methoden zur Darstellung der Amplifikationsprodukte**

#### **Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Darstellung der unterschiedlichen Amplifikationsprodukte wurde überwiegend die horizontale Gelelektrophorese nach Meyers et al. (1976) verwendet.

#### **Prinzip**

In der Elektrophorese werden gelöste und geladene Teilchen in einem elektrischen Feld durch ihre unterschiedliche Wechselwirkung mit dem Trennmedium und unterschiedlichem Molekulargewicht voneinander getrennt. Bei Agarosegelen besteht das Trennmedium aus einem Polysaccharid, welches aus D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose aufgebaut ist. Durch Ausbildung einer Netzstruktur entstehen Poren, welche die Wanderung der Moleküle je nach ihrer Größe unterschiedlich beeinflussen, woraus unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten resultieren. Agarose bildet sehr große Poren, sodass das Laufverhalten der Moleküle primär durch ihre Ladung bestimmt wird. Da die DNA polyanionisch geladen ist, eignen sich Agarosegele gut, um unterschiedliche DNA-Fragmente zu trennen. Bei einer angelegten Spannung von 50-100 V wandern DNA-Moleküle umgekehrt proportional zu ihrem Molekulargewicht Richtung Anode. Die physikalische Eigenschaft des Agarosegels wird in erster Linie durch die Agarosekonzentration bestimmt. Je höher die Dichte bzw. Konzentration, desto feiner ist die Netzstruktur.

#### **Durchführung**

Je nach Fragmentgröße und der daraus ableitbaren Laufgeschwindigkeit wurden 2-4 %-ige Agarosegele eingesetzt und zur Identifizierung der Fragmentgröße DNA-Längenstandards (Molecular Weight Marker) mit definierten Referenzgrößen verwendet.

Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose (Metaphor) in 70 ml 1xTBE-Puffer aufgekocht, bis sie vollständig gelöst war. Nach Abkühlung im Wasserbad auf 55 °C wurden 7 µl Gelstar zugegeben und die Gellösung möglichst blasenfrei in einen geeigneten Gelträger gegossen. Gelstar ist ein Farbstoff, der durch Interkalation an die Doppelhelix bindet, so dass die Banden unter UV-Licht nachweisbar werden. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 45 min wurden die Proben, sowie der Längenstandard (1 µl mit 9 µl HPLC-Wasser (1:10) verdünnt) im

Verhältnis 1:5 mit einem Auftragspuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Durch den Auftragspuffer wurde die Dichte der Proben gegenüber dem Elektrophoresepuffer erhöht, damit diese nicht aus der Gelmatrix diffundierten. Die Elektrophorese wurde bei 4 °C durchgeführt und dauerte in Abhängigkeit von Gelkonzentration und DNA-Größe zwei bis fünf Stunden. Anschließend wurden die Gele unter UV-Licht ausgewertet.

## **Denaturierendes Long-Ranger-Gel**

### **Prinzip**

Das denaturierende Long-Ranger-Gel dient ebenfalls der Darstellung von Amplifikationsprodukten. Das elektrophoretische Prinzip dieses Polyacrylamidgels (PAA-Gel) ist vergleichbar mit dem der Agarosegele. Der Vorteil ist jedoch, dass die Nachweisgrenze wesentlich sensibler ist und je nach Zusammensetzung des Gels Unterschiede der Amplifikationsprodukte von wenigen Basenpaaren bis zu Punktmutationen nachgewiesen werden können. Dabei wird die zuvor durch Denaturierung entstandene Einzelstrang-DNA nach Größe beziehungsweise Nukleotidzusammensetzung aufgetrennt.

Da Polyacrylamidgele chemisch inert sind, treten sie nicht in Wechselwirkung mit den zu trennenden Polyionen und verursachen keine Elektroosmose. Durch radikalische Polymerisation entsteht eine siebartige Netzstruktur, welche die Einzelstrang-DNA passieren muss. Die freien Radikale, die bei dem Zerfall von Ammoniumpersulfat (APS) zu Ammoniumsulfat entstehen, werden durch N,N,N,N'-Tetramethyl-ethylendiamin (kurz: TEMED) stabilisiert.

Die DNA wird erst während der Elektrophorese durch hohe Temperaturen und den Harnstoff, der dem Gel zugesetzt wird, denaturiert. Die resultierenden Nucleotideinzelstränge mit komplementärer Basenzusammensetzung und die daraus folgenden Unterschiede in Molekulargewicht und Ausbildung möglicher Sekundärstrukturen haben ein voneinander abweichendes Laufverhalten zur Folge. So sind nach der Elektrophorese beim Wildtyp sowie homozygoten Mutationsträger jeweils zwei und beim heterozygoten Träger vier Banden zu sehen.

### **Durchführung**

Die Polyacrylamidgelelektrophoresen wurden in vertikalen Kammern durchgeführt, die sich durch ihre längere Trennstrecke auszeichnen. Zur Herstellung des Gels wurden Harnstoff, TBE-Puffer (0,6x) und die Long Ranger Gel Solution (5 %) in ca. 30 ml destilliertem Wasser auf dem vorgewärmten Magnetrührer gelöst und daraufhin ebenfalls mit destilliertem Wasser auf

60 ml aufgefüllt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe der Polymerisations-substanzen (APS 10 % und TEMD-Lsg.) wurde die Lösung zügig in die Kammer gegossen. Die IPC Platte (Integral Plate Chamber), an der das Gel nicht anhaften sollte, wurde zuvor mit ca. 2 ml Dichlordimethylsilan (5 %) silanisiert. Nach einer Stunde Härtingszeit wurde die Apparatur zusammengebaut, mit Laufmittel (0,6x TBE-Puffer) gefüllt und auf 45 °C vorgeheizt. Die mit Ladepuffer versetzten Proben wurden vor dem Auftragen 10min bei 4 °C vordenaturiert. Als interner Standard zum Vergleich der Gele untereinander wurde ein Längenstandard eingesetzt. Als Längenvergleich dienten sequenzierte Proben mit bekanntem Genotyp. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Temperatur und 55 Watt 3-4 Stunden laufen gelassen.

### **Silberfärbung**

Da Polyacrylamidgelen kein Farbstoff zugegeben wird, welcher mit DNA interkaliert, wurde die DNA nachträglich gefärbt. Eine empfindliche Methode stellt die Silberfärbung dar, mit der ein Nachweis von 0,03 ng DNA pro mm<sup>2</sup>, d.h. von weniger als 50 pg Nukleinsäuren pro Bande möglich ist.

### **Durchführung**

Zur Fixierung der DNA wurde diese mit 1 %-iger Salpetersäure in Gegenwart von Alkohol (Ethanol 10 %) denaturiert und ausgefällt. Um die Dissoziation der entstandenen Protonen zu verhindern, wurde der pH-Wert erniedrigt. Die Nukleinsäuren verloren dabei ihre negative Ladung und präzipitierten. Im Anschluss daran wurde eine neutrale Silbernitratlösung (0,2 %) zugegeben. Die präzipitierten Nukleinsäuren banden die Silberionen, und es entstand metallisches Silber, das in der Entwicklungsphase die Reduktion der verbleibenden Silberionen zu metallischem Silber katalysiert. Für diese Reaktion wurde der pH-Wert durch Natriumcarbonat erhöht und Formaldehyd als starkes Reduktionsmittel zugegeben (Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung). Dabei färbte sich die DNA in dunkelbraune bis schwarze Banden. Durch Zugabe von 10 %-iger Essigsäure wurde der pH-Wert stark gesenkt und die Reaktion dadurch gestoppt.

### **3.3.6 Darstellung der Genpolymorphismen**

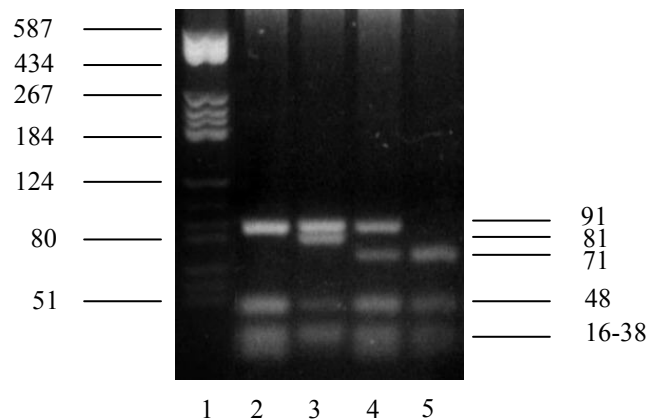
Im Folgenden werden die untersuchten Polymorphismen dargestellt. Auf den Gelabbildungen entsprechen die Zahlenwerte rechts der Länge des Genprodukts in bp. Handelt es sich um ein Agarosegel entspricht die linke Spur dem Genprodukte des Längenstandards in bp.

Da in dieser Studie nur Probanden aufgenommen wurden, von denen eine Liquorprobe vorlag, hat diese Auswahl dazu geführt, dass nicht immer alle Genotypen vorlagen.

### Apolipoprotein E

Die drei ApoE\* $\epsilon$ -Allele, die nach der Methode von Hixson und Vernier (1990) amplifiziert wurden, unterscheiden sich durch Gegenwart bzw. Fehlen einer Punktmutationen in Position 112 und/oder 158. Liegt ein Cytosin anstelle eines Thymins vor, wird das 244 bp-Amplifikationsprodukt durch das Restriktionsenzym Hha I geschnitten. Jedes Allel wird an drei Stellen geteilt. Es resultieren Schnittprodukte mit einer Länge von 16, 18 und 38 bp, die regelmäßig bei jedem Allel vorkommen. Das  $\epsilon$ 2-Allel wird dann nicht weiter, das  $\epsilon$ 3-Allel in Position 158 und das  $\epsilon$ 4-Allel sowohl in Position 158 als auch 112 geschnitten. Die Allele unterscheiden sich in der Kombination folgender zusätzlicher Schnittstücke:  $\epsilon$ 2 (91 bp + 81 bp),  $\epsilon$ 3 (91 bp + 48 bp + 33 bp),  $\epsilon$ 4 (71 bp + 48 bp + 33 bp + 20 bp)

In unserer Auswertung liefen die Schnittprodukte von 16, 18, 20, 33 und 38 bp in einer gemeinsamen, schlierigen Bande, so dass sich die drei Allele im Gel durch folgende zusätzliche Bande unterschieden:  $\epsilon$ 2 (91 bp + 81 bp),  $\epsilon$ 3 (91 bp + 48 bp),  $\epsilon$ 4 (71 bp + 48 bp).



**Abb. 4: Apolipoprotein E**

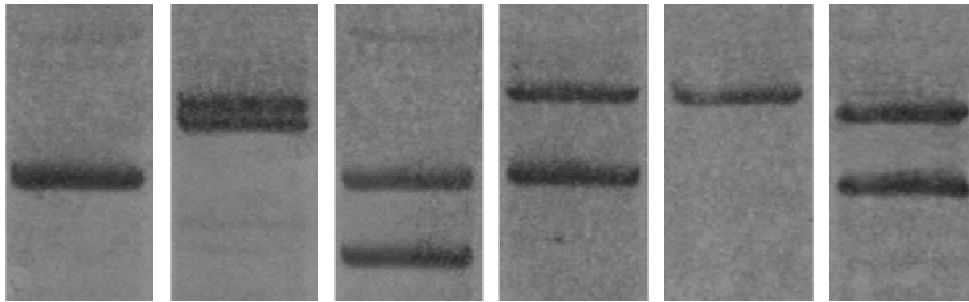
3 % Metaphorgel

Spur 1: Standard V, Spur 2-5: Genotyp ApoE\* $\epsilon$ 3/3, 2/3, 3/4, 4/4.

Die Genotypen  $\epsilon$ 2/2 und  $\epsilon$ 2/4 wurden in diesem Kollektiv nicht gefunden.

### Interleukin-6-VNTR

Der von Bowcock et al. (1989) erstmals beschriebene VNTR-Polymorphismus des IL-6 ist durch Sequenzabschnitte charakterisiert, die sich je nach Allel unterschiedlich häufig wiederholen. Das Resultat sind unterschiedlich lange Amplifikationsprodukte. Die Nomenklatur dieser Allele wird in der Literatur nicht einheitlich verwendet, so dass auch gleich bezeichnete Allele nicht immer genau der gleichen Basenpaarlänge entsprechen. Diese Tatsache ist Folge der großen Variabilität von VNTR-Polymorphismen. Entscheidend ist, dass bei Vergleich unterschiedlicher Studien auf die annäherungsweise Übereinstimmung der Allellänge geachtet wird, nicht aber auf die Bezeichnung derselben. Bowcock et al. (1989) beschrieben vier Allele: B1 (760 bp), B2 (680 bp), B3 (640 bp), B4 (610 bp) und Murray et al. (1997) sechs: A (822 bp), B (698 bp), C (672 bp), D (662 bp), E (652 bp), F (642 bp). Für die Bezeichnung der bei uns detektierten Allele übernahmen wir die Nomenklatur von Murray et al. In einer vorangehenden Studie wurden in unserem Bonner Gesamtkollektiv alle Allele nachgewiesen. In der vorliegenden Studie mit selektiertem Kollektiv fehlen die Allele A und D.



**Abb. 5: Interleukin-6-VNTR**

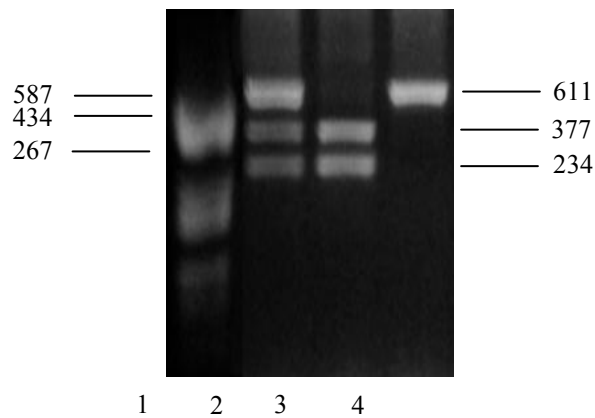
5 %iges Long-Ranger Gel

Von links nach rechts sind die Genotypen EE, BC, EF, BE, BB, und CE dargestellt.



### Interleukin-6-Promoter

Beim nach Fishman et al. (1998) beschriebenen Promoterpolymorphismus des IL-6 handelt es sich um eine einfache Punktmutation (G → C) in Position -174 am 5'-Ende des Promotergens. Liegt das Cytosin (C-Allel) anstelle von Guanin vor, schneidet das Restriktionsenzym SfaN I das 611 bp lange Amplifikationsprodukt, mit zwei resultierenden Schnittstücken von 234 und 377 bp Länge. Handelt es sich um den Wildtyp (G-Allel) wird im Gel eine Bande bei etwa 611 bp sichtbar.



**Abb. 6: Interleukin-6-Promoter**

2 % Metaphorgel. Spur 1: Standard V, Spur 2-4: Genotyp CG, GG, CC.

### 3.3.7 Statistische Auswertung der Daten

Zur Datenanalyse wurden statistische Prozeduren des Software-Pakets SPSS/PC+ Version 9.0.1 für Windows (SPSS: Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chicago, Ill., USA) und Microsoft Office Excel 2007 verwendet.

Alle zu testenden Variablen wurde zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test unter Annahme der Nullhypothese, d.h. der Annahme auf Vorliegen einer Normalverteilung, bei einem Kolmogorov-Smirnov-Z-Wert von  $p > 0,05$  auf Normalverteilung getestet.

Die Assoziation zweier metrischer Merkmale wurde unter der Verwendung von Pearsons Korrelationskoeffizient ( $r = 0$ ) analysiert. Es wurde jeweils der Korrelationskoeffizient ( $r$ ) angegeben, sowie der p-Wert, der sich auf die Nullhypothese, dass keine Korrelation vorliegt, bezieht.

Wie sich zwei Gruppen von metrischen Merkmalen unterscheiden, wurde mittels eines t-Test analysiert. Dieser Test dient dem Vergleich zweier unabhängiger Stichproben hinsichtlich ihrer Mittelwerte. Es soll der Frage nachgegangen werden, ob auftretende Mittelwertunterschiede mit zufälligen Schwankungen erklärt werden können oder nicht. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Mittelwerte aus Stichproben mit normalverteilten Werten stammen. Um dies zu gewährleisten wurde der zuvor erwähnte Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Es wurde bei fester Hypothese die einseitige und wenn nicht anders gekennzeichnet die zweiseitige Signifikanz berechnet.

Für alle Tests wurde als Signifikanzniveau eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0,05$  gewählt, dass heißt eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  führte zu Ablehnung der Nullhypothese.

Bei den uns zu Verfügung stehenden Proben des Münchner Kollektivs wurde nicht die IL-6prom – Genotypisierung durchgeführt. Im Falle, dass sich die Ergebnisse nur auf das Bonner Kollektiv beziehen, wird darauf hingewiesen.

## 4 Ergebnisse

Plasma- und Liquorspiegel unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Probanden unserer gemischten Kontrollgruppe, sodass diese für alle statistischen Analysen zu einer Gruppe zusammengefasst wurden. Dies wurde durch eine Varianzanalyse (ANOVA) statistisch überprüft ( $p \geq 0,2$  für alle Vergleiche) (Bagli et al. 2003).

### 4.1 Plasma- und Liquorspiegel von IL-6, sIL-6R und sgp130

Der Mittelwertvergleich von IL-6, sIL-6R und sgp130 in Plasma und Liquor zwischen Patienten und Kontrollen, sowie den Geschlechtern erfolgte mit einem t-Test. Der sIL-6R-Spiegel war sowohl im Plasma als auch im Liquor bei Alzheimerpatienten höher als in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied erwies sich im Plasma als signifikant ( $p = 0,048$ ), im Liquor jedoch nicht ( $p = 0,225$ ). Bei den IL-6- und sgp130-Konzentrationen konnte weder im Plasma noch im Liquor ein wesentlicher Unterschied beobachtet werden (Tab. 8). In folgenden Analysen (4.4) wird somit ausschließlich der sIL-6R als biochemischer Parameter einbezogen.

Bei Einteilung der Probanden nach ihrem Geschlecht ließ sich weder beim IL-6 noch bei seinen Rezeptoren ein signifikanter Konzentrationsunterschied messen (Tab. 9).

	Plasma			Liquor		
	Patienten	Kontrollen	p	Patienten	Kontrollen	P
IL-6 [ng/l]	2,55 ± 2,24	2,55 ± 3,37	0,999	2,42 ± 1,12	2,71 ± 2,64	0,479
sIL-6R [µg/l]	<b>34,8 ± 9,1*</b>	<b>30,6 ± 8,1*</b>	<b>0,048</b>	0,98 ± 0,27	0,91 ± 0,22	0,225
sgp130 [µg/l]	291,25 ± 62,32	290,69 ± 59,30	0,970	47,01 ± 13,40	44,92 ± 12,64	0,512

Tab. 8: Plasma- und Liquorspiegel von IL-6, sIL-6R und sgp130 bei Patienten und Kontrollen

	Plasma			Liquor		
	weiblich	männlich	p	weiblich	männlich	P
IL-6 [ng/l]	2,49 ± 2,49	2,65 ± 2,79	0,794	2,56 ± 1,39	2,41 ± 2,13	0,703
sIL-6R [µg/l]	34,33 ± 9,2	32,39 ± 8,67	0,341	0,95 ± 0,24	0,97 ± 0,29	0,702
sgp130 [µg/l]	290,81 ± 60,7	291,5 ± 62,56	0,960	46,8 ± 13,67	45,7 ± 12,44	0,715

Tab. 9: Plasma- und Liquorspiegel von IL-6, sIL-6R und sgp130 bei Männern und Frauen

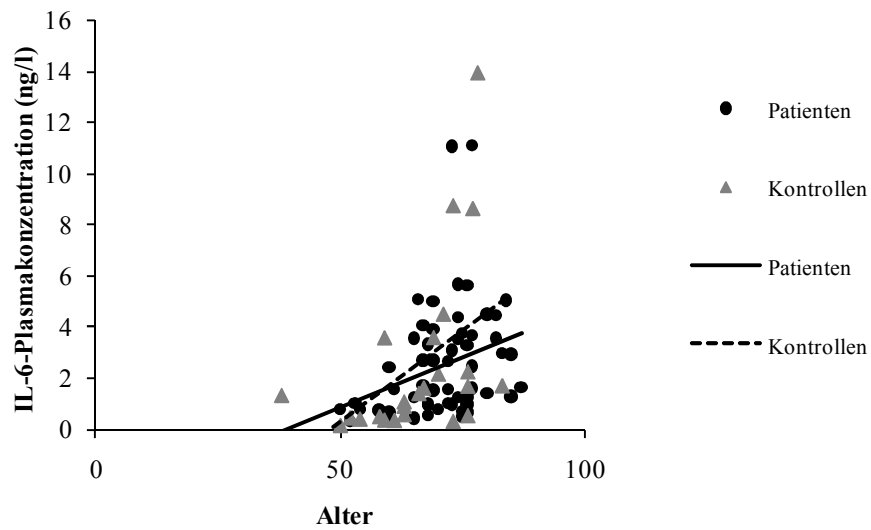
#### 4.2 Konzentrationsunterschiede abhängig von Erkrankungsschweregrad und Alter

Bei Korrelationsanalysen der IL-6-Parameter mit der kognitiven Fähigkeit der Probanden (ausgedrückt im MMSE) und des Alters, korrelierte der Faktor Alter mit der IL-6-Plasmakonzentration sowohl bei Patienten ( $r = 0,302$ ,  $n = 58$ ,  $p < 0,021$ ), als auch bei Kontrollen ( $r = 0,453$ ,  $n = 24$ ,  $p < 0,026$ ) (Abb. 7). Darüber hinaus zeigte sich in der Patientengruppe ein Zusammenhang zwischen dem Alter und sgp130-Spiegel im Plasma ( $r = 0,368$ ;  $p = 0,005$ ;  $n = 58$ ) (Abb. 11).

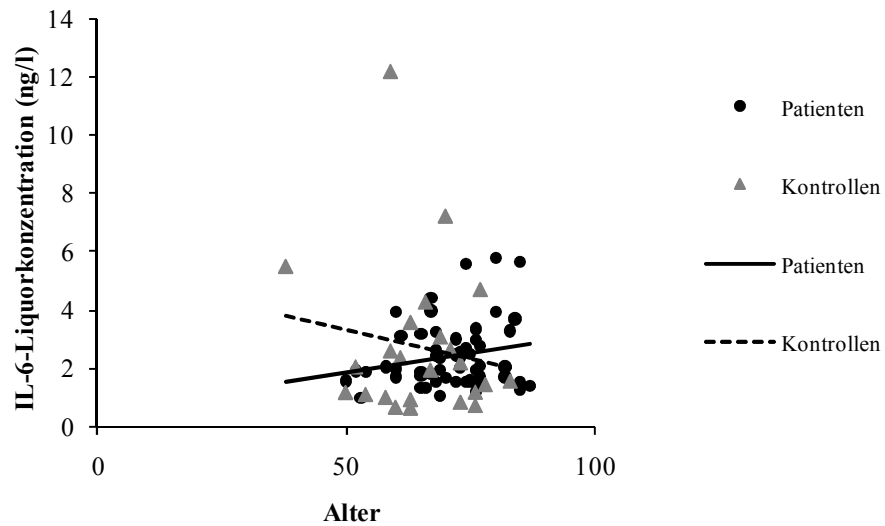
In keiner der untersuchten Gruppen zeigte sich eine signifikante Beziehung des Alters zur sIL-6R-Plasmakonzentration (Abb. 9), oder zu den Liquorkonzentrationen (Abb. 8, Abb. 10 und Abb. 12) und bei Analyse des MMSE mit den biochemischen Parametern war ebenfalls kein Zusammenhang feststellbar (Tab. 10).

			Plasma			Liquor		
			IL-6	sIL-6R	sgp130	IL-6	sIL-6R	sgp130
MMSE	Patienten	r	-0,033	-0,070	-0,009	-0,146	0,130	0,197
		p	0,817	0,623	0,947	0,302	0,357	1,63
		n	53	52	53	52	52	52
	Kontrollen	r	-0,181	-0,366	-0,322	0,044	-0,115	0,177
		p	0,432	0,94	0,143	0,848	0,610	0,432
		n	21	22	22	21	22	22

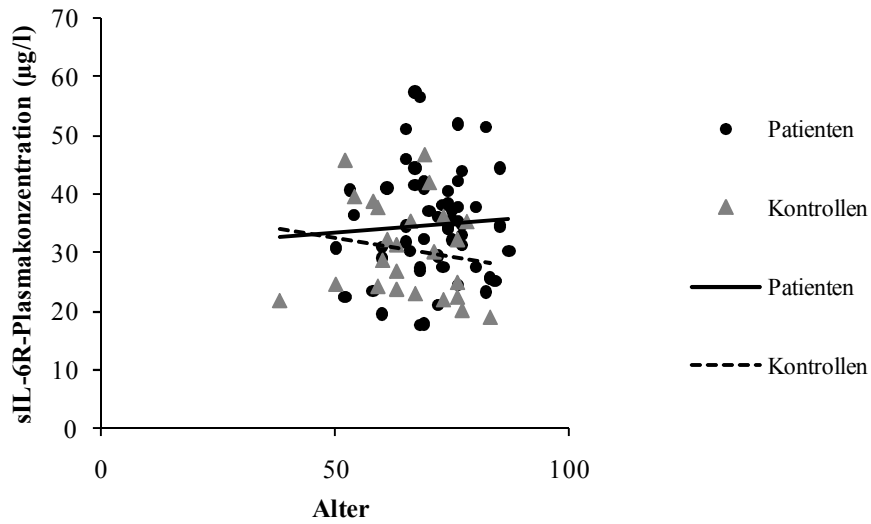
**Tab. 10: Korrelation des MMSE mit der IL-6-, sIL-6R- und gp130-Konzentration im Plasma und Liquor bei Patienten und Kontrollen**



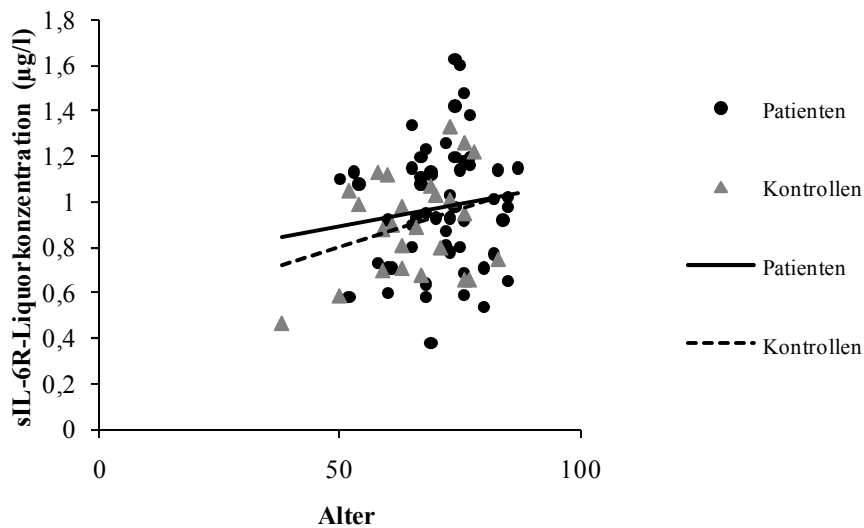
**Abb. 7:** Korrelation des Alters mit der IL-6-Plasmakonzentration bei Patienten ( $r = 0,302$ ;  $p = 0,021$ ;  $n = 58$ ) und Kontrollen ( $r = 0,453$ ;  $p = 0,026$ ;  $n = 24$ )



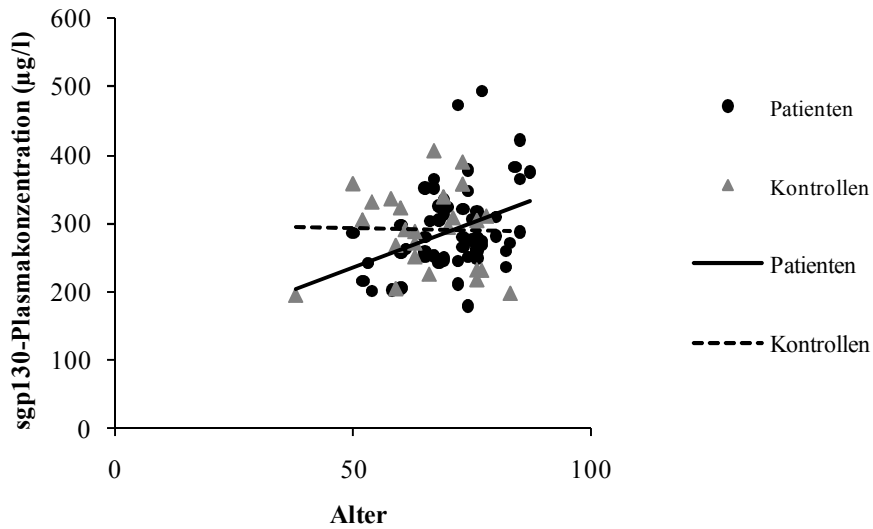
**Abb. 8:** Korrelation des Alters mit der IL-6-Liquorkonzentration bei Patienten ( $r = 0,211$ ;  $p = 0,115$ ;  $n = 57$ ) und Kontrollen ( $r = -0,158$ ;  $p = 0,460$ ;  $n = 24$ )



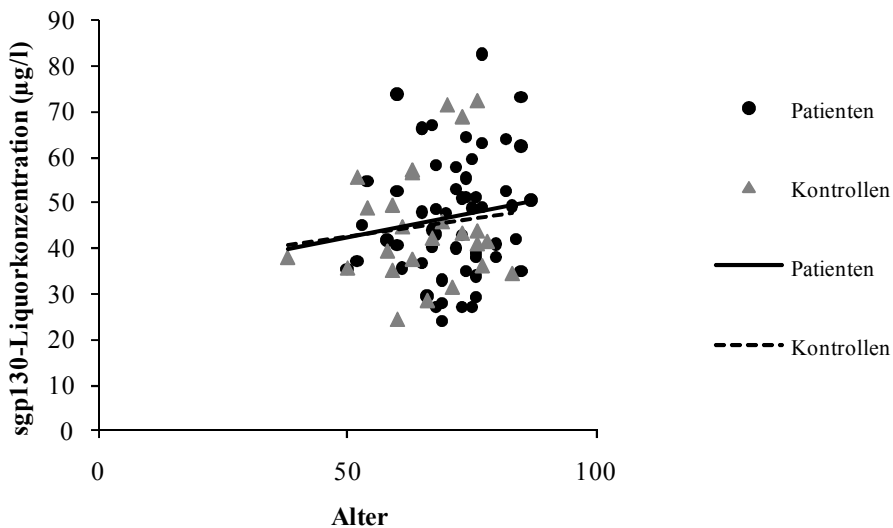
**Abb. 9:** Korrelation des Alters mit der sIL-6R-Plasmakonzentration bei Patienten ( $r = 0,059$ ;  $p = 0,664$ ;  $n = 57$ ) und Kontrollen ( $r = -0,162$ ;  $p = 0,438$ ;  $n = 25$ )



**Abb. 10:** Korrelation des Alters mit der sIL-6R-Liquorkonzentration bei Patienten ( $r = 0,117$ ;  $p = 0,390$ ;  $n = 56$ ) und Kontrollen ( $r = 0,312$ ;  $p = 0,129$ ;  $n = 25$ )



**Abb. 11:** Korrelation des Alters mit der sgp130-Plasmakonzentration bei Patienten ( $r = 0,368$ ;  $p = 0,005$ ;  $n = 58$ ) und Kontrollen ( $r = 0,024$ ;  $p = 0,908$ ;  $n = 25$ )



**Abb. 12:** Korrelation des Alters mit der sgp130-Liquorkonzentration bei Patienten ( $r = 0,139$ ;  $p = 0,307$ ;  $n = 56$ ) und Kontrollen ( $r = 0,127$ ;  $p = 0,545$ ;  $n = 25$ )

### 4.3 Genotypisierung

Es wurde eine Genotypisierung des ApoE-, IL-6prom- und IL-6vntr- Gens durchgeführt. Das Augenmerk lag darauf, ob das jeweilige Kandidatenallel vorlag oder nicht. Beim Apo E handelt es sich dabei um das ApoE\*4- Allel, welches bei Alzheimerpatienten vermehrt vorkommt und mit der APP-Bildung assoziiert wird. Das IL-6vntr\*C-Allel, Kandidatenallel des IL-6vntr-Polymorphismus, wird hinsichtlich der Alzheimergenese in der Literatur mit einem protektiven Effekt in Verbindung gebracht (Papassotiropoulos et al., 1999). Das Kandidatenallel des IL-6prom, das IL-6prom\*C-Allel, steht hingegen im Linkage-Disequilibrium einerseits (Bagli et al., 2000) und es wurde bei Vorliegen des Allels für die Genese eine anderen entzündlichen Erkrankung (der juvenilen chronischen Arthritis) ebenfalls ein protektiver Effekt angenommen (Fishman et al., 1998).

Es ergab sich die in Tab. 11 dargestellte Verteilung der Kandidatenallele. Beim IL-6prom beziehen sich die Ergebnisse ausschließlich auf das Bonner Kollektiv.

Allel		Patienten	Kontrollen
Apo E*4	+	69	36
	-	31	64
IL-6prom*C	+	83	64
	-	17	36
IL-6vntr*C	+	36	24
	-	64	76

Angaben sind in Prozent (%).

(+) Allel vorhanden, (-) Allel nicht vorhanden

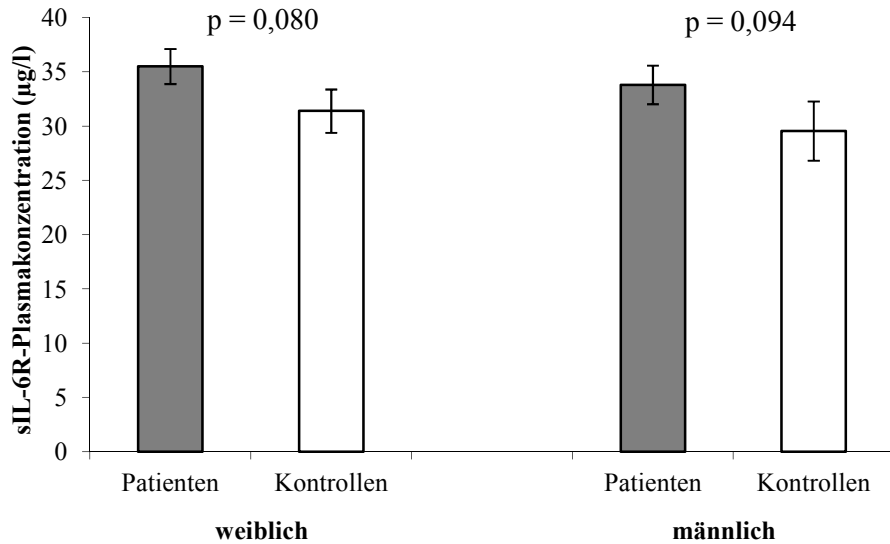
**Tab. 11: Allelverteilung**

### 4.4 Interaktion von sIL-6R mit dem Geschlecht und den Kandidatengen

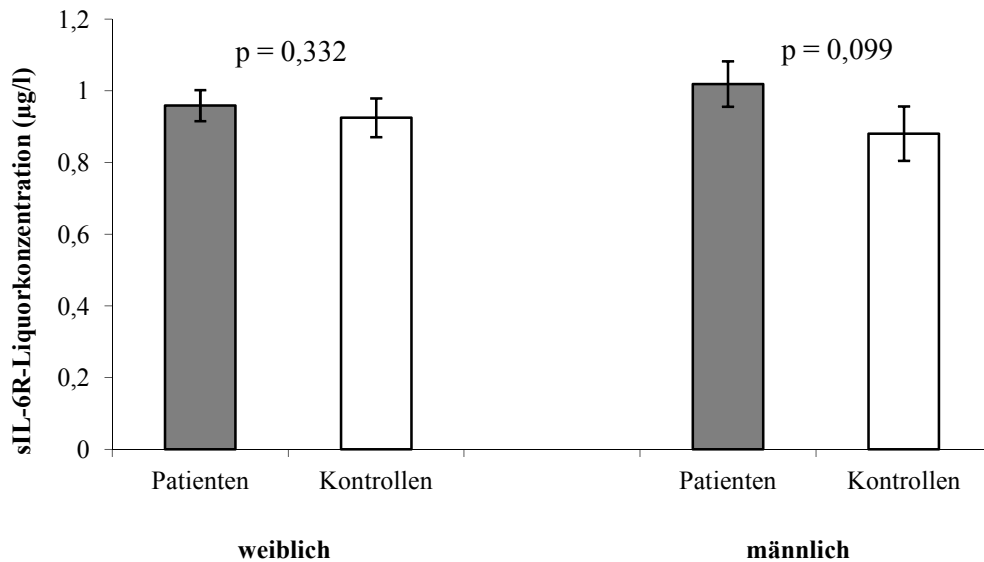
Der Mittelwertvergleich der sIL-6R-Plasma- und -Liquorkonzentration mit der Diagnose einerseits und dem Geschlecht bzw. dem Genotyp andererseits erfolgte mit dem Student's t-Test. Die sIL-6R-Konzentration, für die ausschließlich eine Korrelation nachgewiesen werden konnte (siehe 4.1), ging als abhängige, alle anderen als unabhängige Variable in die Analyse ein. Es wurde jeweils die einseitige Signifikanz berechnet. Der in den Graphiken dargestellte „Fehlerindikator“ entspricht dem Standardfehler.



Es zeigte sich sowohl im Plasma als auch Liquor, dass die sIL-6R-Konzentration weiblicher wie auch männlicher Alzheimerpatienten tendenziell höher war, als die der Kontrollprobanden (Abb. 13 und Abb. 14). Signifikant waren die Unterschiede jedoch nicht.



**Abb. 13:** sIL-6R-Plasmakonzentration bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit des Geschlechts

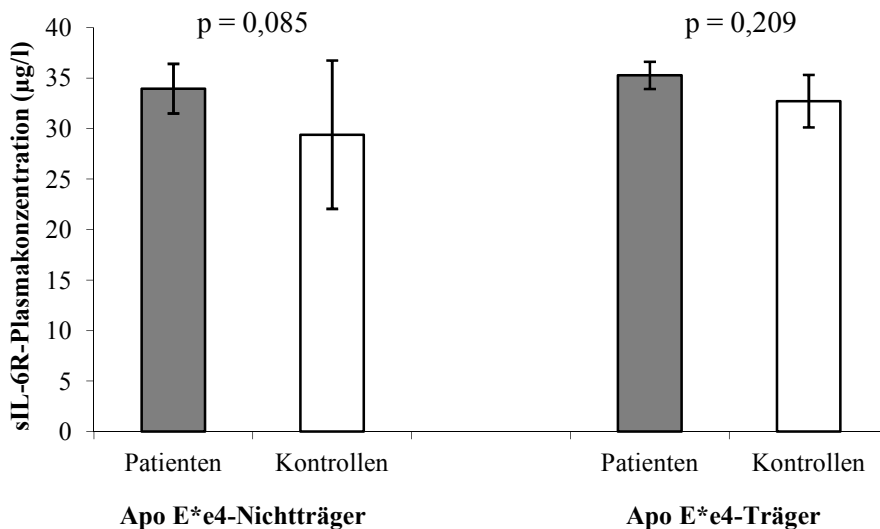


**Abb. 14:** sIL-6R-Liquorkonzentration bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit des Geschlechts

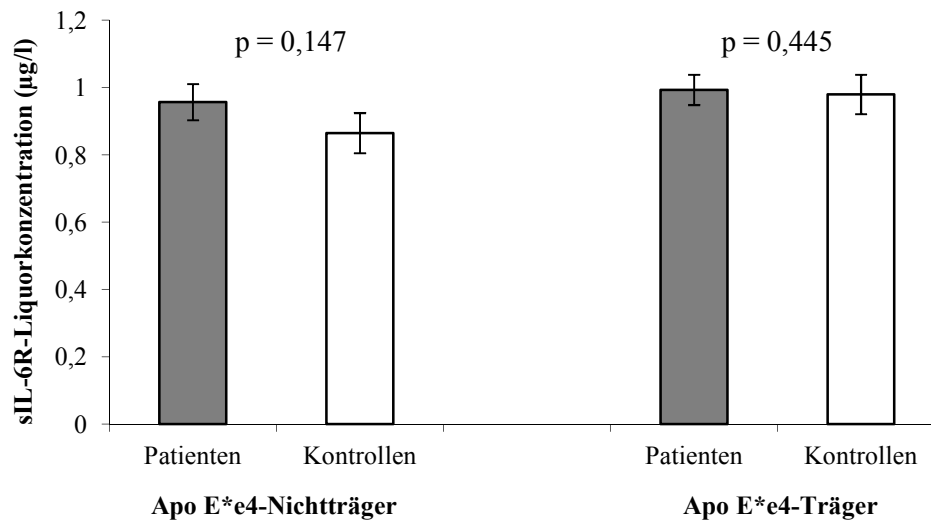
Bei Betrachtung der Kandidatengene, welche als unabhängige Faktoren in die Varianzanalyse eingingen, konnten wir für beide IL-6-Polymorphysmen signifikante Unterschiede messen. Beim ApoE-Kandidatengen zeigte sich hier nur ein Trend.

Mit Ausnahme der IL-6vntr-Träger und IL-6prom-G-homozygoten zeigte sich bei Patienten eine höhere sIL-6R-Konzentration als in der Kontrollgruppe. Dies traf sowohl für Risikoallelträger, als auch für Nichtträger in beiden Kompartimenten zu. Der Unterscheid erwies sich für IL 6vntr\*C-Nichtträger sowie für IL-6prom\*C-homozygote Probanden als signifikant. Darüber hinaus waren mit Ausnahme des ApoE-Genotyps im Plasma und Liquor bei Patienten die sIL-6R-Spiegel bei Allel-Nichtträgern konstant höher, als bei IL-6vntr\*C- Trägern. Gleiches konnte für IL-6prom-homozygoten (CC > GG > CG) beobachtet werden. In der Kontrollgruppe fiel das Ergebnis dagegen inhomogen aus (Abb. 15 - Abb. 20).

Beim ApoE-Polymorphismus konnte eine gegensätzliche Tendenz beobachtet werden. Sowohl bei Patienten als auch Kontrollen waren die sIL-6R-Konzentrationen bei Risikoallel-Trägern minimal, also nicht signifikant, höher als in der Gruppe der Nichtträger (Abb. 15 und Abb. 16).



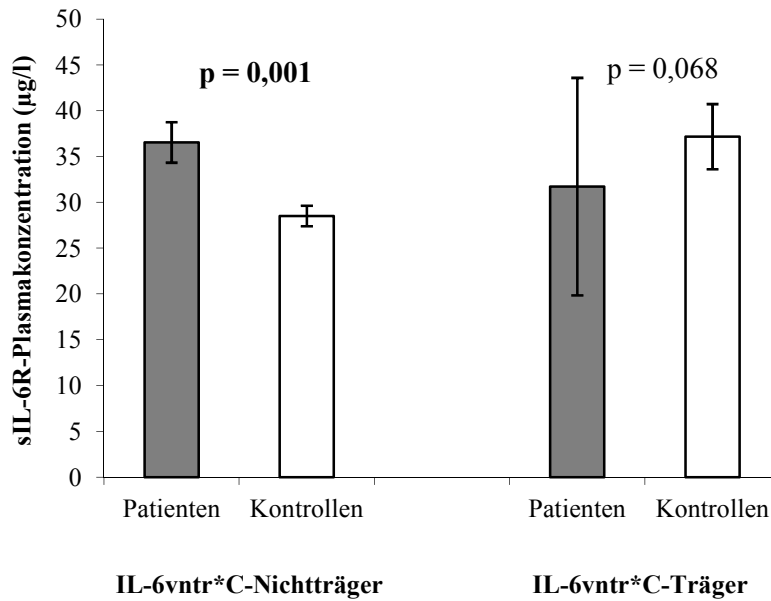
**Abb. 15: sIL-6R-Plasmakonzentration bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit des Apo E\*ε4-Allels**



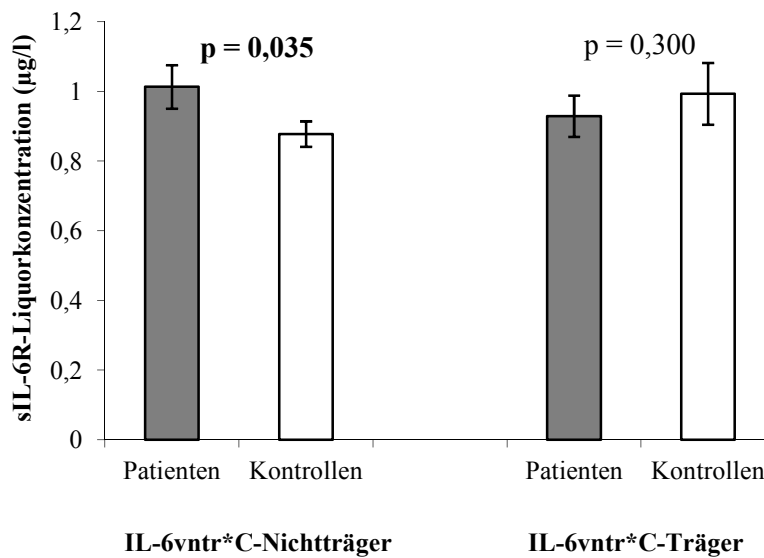
**Abb. 16: sIL-6R-Liquorkonzentration bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit des Apo E\*ε4-Allels**

Wie einleitend bemerkt konnten wir bei Stratifizierung nach den IL-6-Polymorphismen im Plasma und Liquor von IL-6vnr\*C-Nichtträgern signifikante sIL-6R-Konzentrationsunterschied zwischen Patienten und Kontrollen beobachten ( $p = 0,001$  und  $p = 0,035$ ). Patienten, die IL-6vnr\*C-Nichtträger waren, wiesen gegenüber Kontrollen erhöhte Konzentrationen auf (Abb. 17 und Abb. 18).

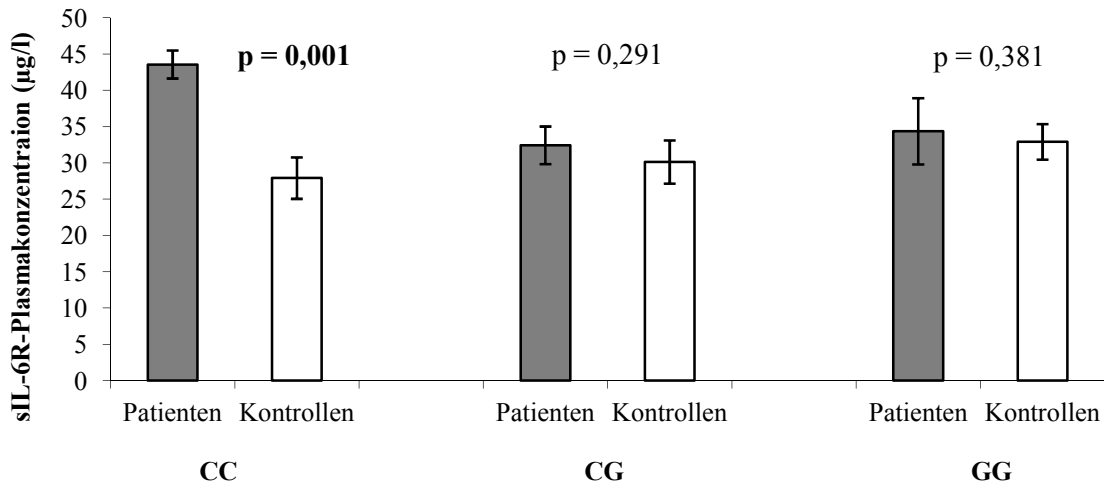
Bei Genotypisierung des IL-6prom zeigten sich in der Gruppe der IL-6prom\*C-Allel-homozygoten bei Alzheimerpatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere sIL-6R-Plasma- ( $p = 0,001$ ) und Liquorspiegel ( $p < 0,001$ ) (Abb. 19 und Abb. 20). In der Gruppe mit heterozygoter (IL-6prom\*CG), aber auch IL 6prom\*GG-homozygoter Allelverteilung konnten weder im Plasma noch im Liquor signifikante sIL-6R-Konzentrationsunterschiede beobachtet werden. Auch bei Einteilung der Gruppen nach Vorhandensein oder Nichtvorhandensein des IL-6prom\*C-Allels wurde kein signifikanter Unterschied gemessen wurde.



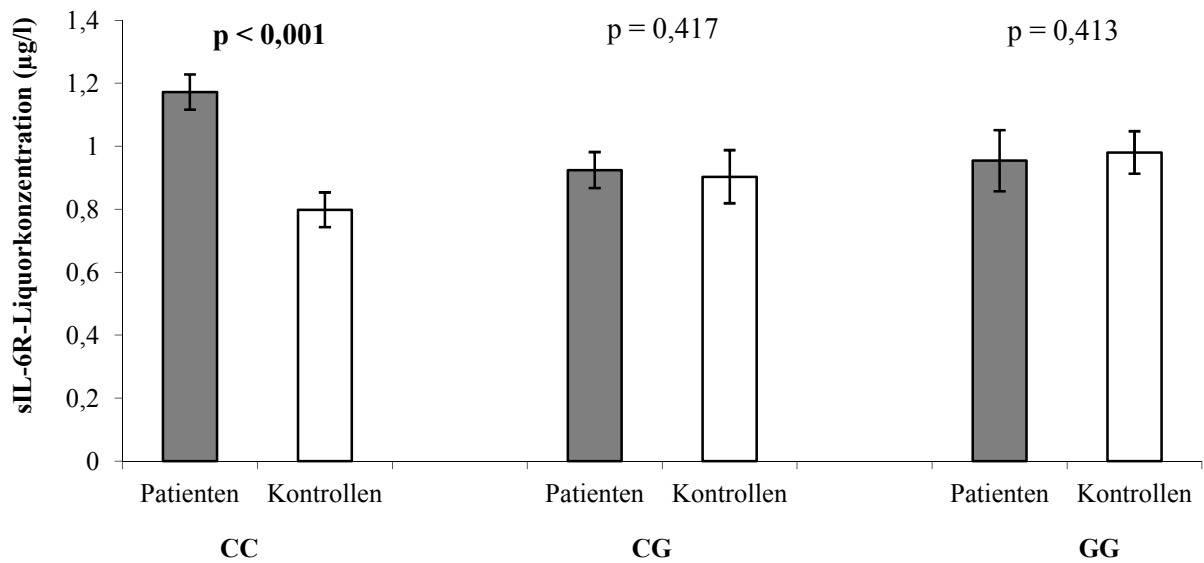
**Abb. 17:** sIL-6R-Plasmakonzentrationen bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit des IL-6vnr\*C-Allels



**Abb. 18:** sIL-6R-Liquorkonzentration bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit des IL-6vnr\*C-Allels



**Abb. 19:** sIL-6R-Plasmakonzentration bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit des IL-6prom-Genotyps

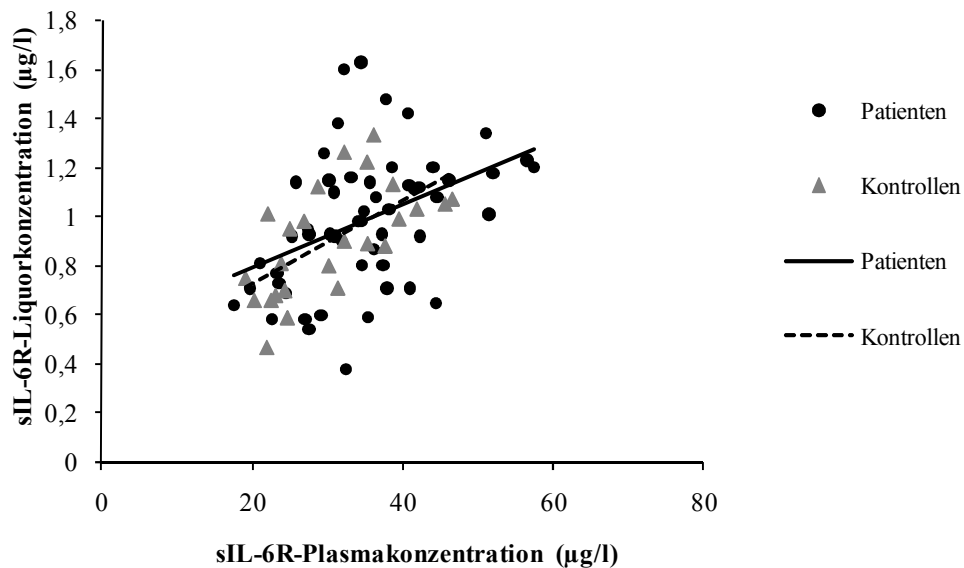


**Abb. 20:** sIL-6R-Liquorkonzentration bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit des IL-6prom-Genotyps

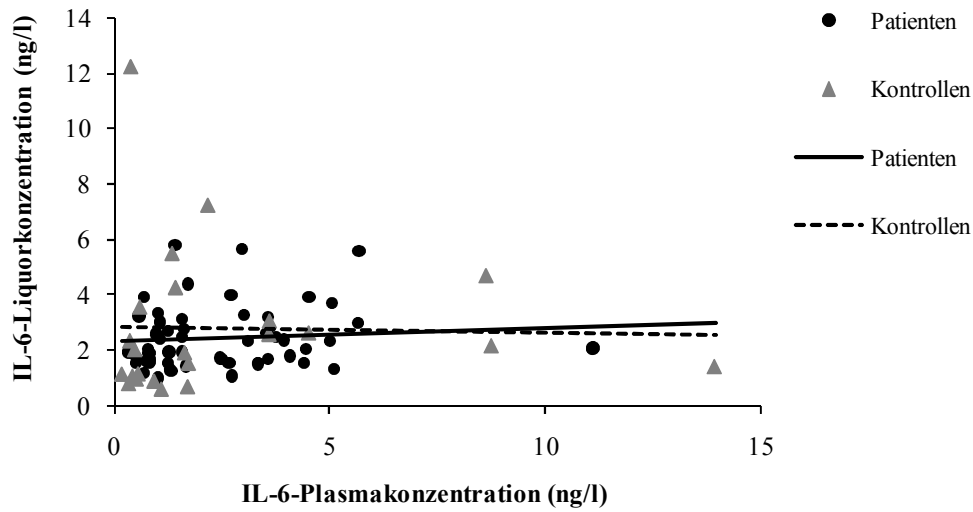
#### 4.5 Interleukin-6-Rezeptorsystem zentral und peripher

Um den Zusammenhang peripherer und zentraler Prozesse zu untersuchen, wurde ebenfalls der Korrelationskoeffizient nach Pearson verwendet. Wir verglichen alle Plasma- und Liquorwerte miteinander, darüber hinaus wurden Plasma- und Liquorkonzentrationen beider Rezeptoren miteinander, sowie jedes Rezeptors mit der IL-6-Konzentration korreliert. Wir stellten fest, dass ein Zusammenhang peripherer und zentraler Prozesse darstellbar ist.

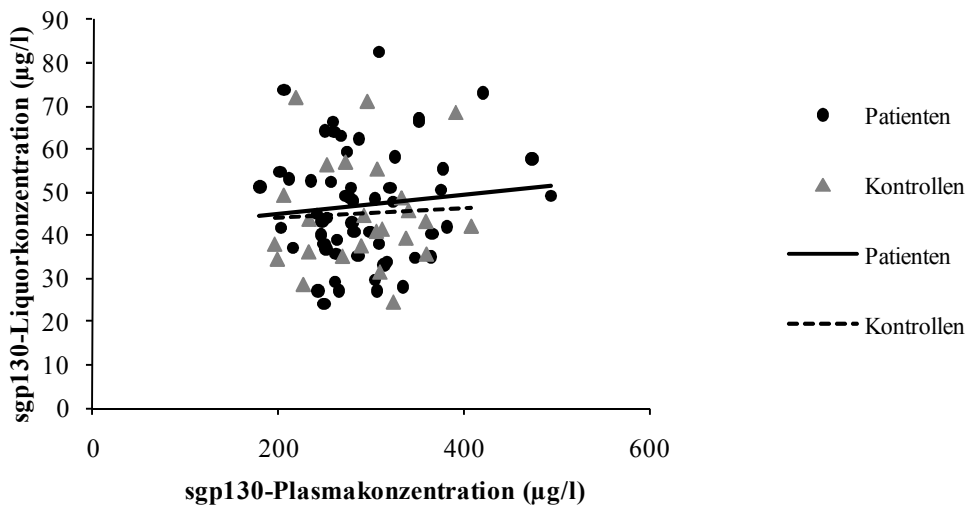
Sowohl bei Patienten als auch in der Kontrollgruppe korrelierten die sIL-6R-Konzentration im Plasma und Liquor miteinander ( $r = 0,426$ ,  $n = 55$ ,  $p < 0,001$  und  $r = 0,620$ ,  $n = 25$ ,  $p < 0,001$ ) (Abb. 21). Keine signifikante Beziehung zwischen Plasma- und Liquorwerten konnte beim IL-6 und sgp130 (Abb. 22 und Abb. 23) gemessen werden.



**Abb. 21:** Korrelation der sIL-6R-Konzentration im Plasma und Liquor bei Patienten ( $r = 0,426$ ;  $p < 0,001$ ;  $n = 55$ ) und Kontrollen ( $r = 0,620$ ;  $p < 0,001$ ;  $n = 25$ )



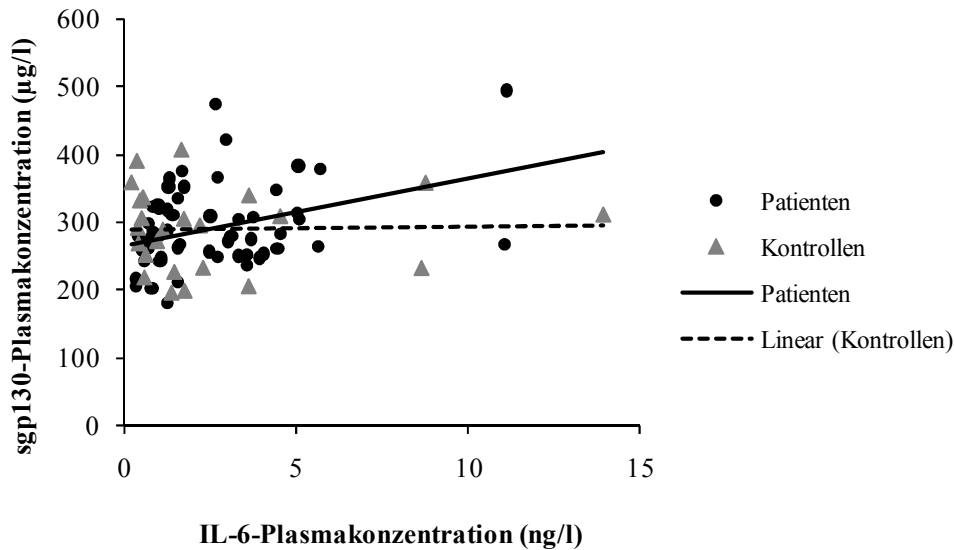
**Abb. 22:** Korrelation der IL-6-Konzentration im Plasma und Liquor bei Patienten ( $r = 0,1$ ;  $p = 0,457$ ;  $n = 57$ ) und Kontrollen ( $r = -0,027$ ;  $p = 0,904$ ;  $n = 23$ )



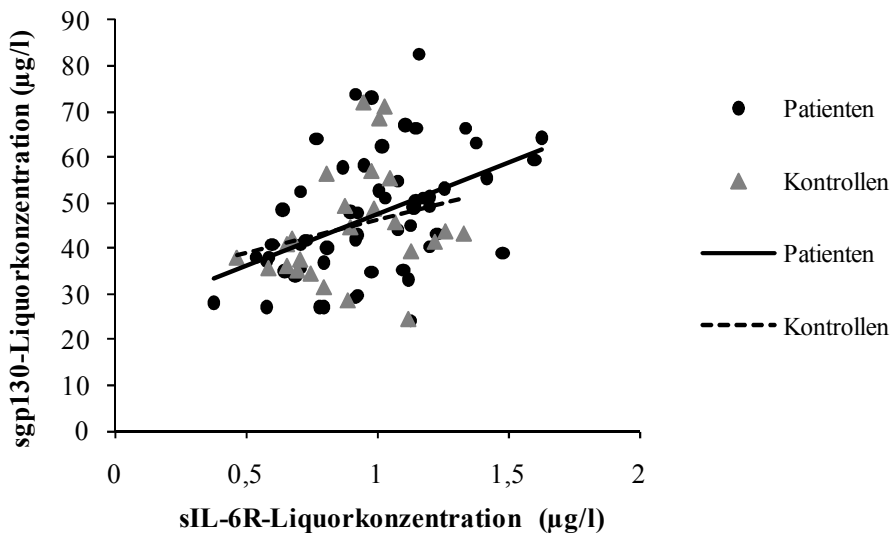
**Abb. 23:** Korrelation der sgp130-Konzentration im Plasma und Liquor bei Patienten ( $r = 0,106$ ;  $p = 0,438$ ;  $n = 56$ ) und Kontrollen ( $r = 0,053$ ;  $p = 0,803$ ;  $n = 25$ )

Bei Analyse des IL-6-Rezeptorsystems (Tab. 12) korrelierte im Plasma von Patienten die IL-6-Konzentration mit der des sgp130 ( $r = 0,348$ ;  $p = 0,007$ ;  $n = 58$ ) (Abb. 24) und im Liquor

die Konzentrationen der beiden Rezeptoren miteinander ( $r = 0,457$ ;  $p = 0,000$ ;  $n = 56$ ) (Abb. 25). In der Kontrollgruppe wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen.



**Abb. 24:** Korrelation der IL-6- mit der sgp130-Plasmakonzentration bei Patienten ( $r = 0,348$ ;  $p = 0,007$ ;  $n = 58$ ) und Kontrollen ( $r = 0,034$ ;  $p = 0,875$ ;  $n = 24$ )



**Abb. 25:** Korrelation der sIL-6R- mit der sgp130-Liquorkonzentration bei Patienten ( $r = 0,457$ ;  $p = 0,000$ ;  $n = 56$ ) und Kontrollen ( $r = 0,257$ ;  $p = 0,215$ ;  $n = 25$ )



			Plasma		Liquor	
			sIL-6R	sgp130	sIL-6R	sgp130
Patienten	IL-6	r	0,066	0,348	-0,010	0,099
		p	0,624	<b>0,007</b>	0,941	0,467
		n	57	58	56	56
	sgp130	r	0,160	-	0,457	-
		p	0,236	-	<b>0,000</b>	-
		n	57	-	56	-
Kontrollen	IL-6	r	0,121	0,034	-0,268	-0,049
		p	0,573	0,875	0,205	0,820
		n	24	24	24	24
	sgp130	r	0,202	-	0,257	-
		p	0,332	-	0,215	-
		n	25	-	25	-

**Tab. 12: Korrelation der Parameter des IL-6-Rezeptorsystems im Plasma und Liquor bei Patienten und Kontrollen**

## 5 Diskussion

Mit zunehmendem Alter unserer Bevölkerung steigt auch die Inzidenz der AD und damit der Bedarf nach sensitiven Testverfahren zur Früherkennung dieser Erkrankung, sowie nach prognostischen Markern, die der Erstellung von Therapieplänen, der Verlaufskontrolle und der individuellen Lebensplanung Betroffener und ihrer Angehörigen dienen. Die Kenntnis der zu Grunde liegenden Pathomechanismen ist dafür Voraussetzung. Es wird eine multifaktorielle Genese der AD angenommen, welche neben natürlichen Alterungsprozessen sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren und nicht zuletzt inflammatorische Prozesse umfasst (Giunta et al., 2008, Parihar und Hemnani, 2004). In der vorliegenden Studie wurden alzheimerrelevante inflammatorische Prozesse und ihr genetischer Hintergrund untersucht. Das Ziel war festzustellen, ob die Bestimmung immunochemischer Parameter (IL-6, sIL-6R, sgp130) und relevanter Gen-Polymorphismen (ApoE, IL-6vnr, IL-6prom) einen diagnostischen Wert zur (Früh-) Erkennung der AD haben und ob sie gegebenenfalls eine Aussage über den Schweregrad der Erkrankung zulassen.

Die Untersuchungen zeigen, dass bei Alzheimerpatienten erhöhte IL-6-Parameter zu messen sind. Die sIL-6R-Konzentration war bei Alzheimerpatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe in Plasma- und Liquorproben signifikant erhöht. Des Weiteren korrelierten in beiden Gruppen, also bei Alzheimerpatienten wie auch in der Kontrollgruppe, die IL-6-Plasmakonzentrationen mit dem Alter. Das heißt, mit zunehmendem Alter konnten innerhalb dieser beiden Gruppen höhere IL-6-Plasmakonzentrationen gemessen werden. Bei Alzheimerpatienten traf dies auch für die sgp130-Plasmakonzentration zu.

In den molekulargenetischen Analysen stellten wir fest, dass die Expression der drei IL-6-Parameter vom IL-6-Genotyp beeinflusst wird. Alzheimerpatienten, die den IL-6vnr\*C- Polymorphismus nicht trugen, hatten im Vergleich zu Trägern erhöhte sIL-6R-Plasma- und Liquorkonzentrationen. Beim Vergleich von Patienten und Kontrollen innerhalb der Gruppe der IL-6vnr\*C- Nicht-Träger wiesen wir bei Alzheimerpatienten signifikant höhere sIL-6R-Plasma- und Liquorkonzentrationen nach. Beim IL-6prom-Polymorphismus maßen wir bei IL-6prom\*C-homozygoten Alzheimerpatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höherer sIL-6R-Plasma- und Liquorkonzentrationen.

Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, dass zentrale Prozesse in der Peripherie messbar sind. Das heißt Veränderungen im ZNS, repräsentiert durch die Analyse unserer Liquorproben, korrelierten mit Veränderungen in der Peripherie, also mit den Plasmaproben. In beiden Gruppen

korrelierte die sIL-6R-Konzentration im Plasma mit der sIL-6R-Liquorkonzentration, d. h. steigende Plasmakonzentrationen gehen mit steigenden Liquorkonzentrationen einher. Darüber hinaus zeigte sich für Alzheimerpatienten, dass IL-6 und sgp130 im Plasma und sIL-6R und sgp130 im Liquor positiv miteinander korrelieren.

Es kann festgehalten werden, dass die vorliegende Studie bei Alzheimerpatienten sowie auch bei hohem Lebensalter erhöhte Interleukin 6-Parameter nachweist. Diese Parameter könnten prospektiv als diagnostische Marker eingesetzt werden. Darüber hinaus können wir Zusammenhänge zwischen IL-6-Parametern und -Genetik darstellen.

### **5.1 Erhöhte Entzündungsparameter im Alter und bei Alzheimerkranken**

Unter physiologischen Bedingungen sind Entzündungsreaktionen gegen pathogene Stimuli gerichtet. Unspezifische oder verlängerte immunologische Aktivierung führt jedoch auch zu Zerstörung intakten Gewebes. Eine fehlerhafte Immunreaktion wird für die Pathogenese der AD vielseitig diskutiert. Mikrogliaaktivierung und Aktivierung IL-6-vermittelter neuroimmunologischer Reaktionen werden als Teil eines Teufelskreises angesehen, der in Degeneration von Neuronen endet. Es ist anzunehmen, dass eine solche Fehlregulierung mit veränderten Plasma- und Liquorspiegeln der Zytokine sowie ihrer Rezeptoren einher geht.

In der vorliegenden Studie wurde sowohl bei Alzheimerpatienten als auch in der Kontrollgruppe ein altersabhängiger Anstieg der IL-6-Plasmakonzentration beobachtet. Auf Rezeptorebene konnte im Patientenkollektiv eine altersabhängige Zunahme der sgp130 Plasmakonzentration gemessen werden. Darüber hinaus hatten Alzheimerpatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere sIL-6R-Plasmakonzentrationen. Für die Schwere der Erkrankung, dargestellt mit dem MMSE, war in unserer Studie kein Zusammenhang zur IL-6-, sIL-6R- oder sgp130-Plasma- oder Liquorkonzentration nachweisbar.

Die Tatsache, dass andere Arbeiten sowohl vergleichbare als auch unterschiedliche Ergebnisse erheben, könnte in einer voneinander abweichenden Methodik liegen. Noch vor dem experimentellen Teil, sind die Auswahl der Patienten und einer angemessenen Kontrollgruppe, sowie die Zahl der Probanden insgesamt ausschlaggebend. Besonders bei Liquorstudien ist die Fallzahl häufig sehr klein, wodurch Repräsentativität und Vergleichbarkeit der Ergebnisse in Frage gestellt werden müssen. Darüber hinaus können Faktoren wie genetische und soziodemographische Heterogenität der unterschiedlichen Studien divergente Ergebnisse bedingen. So beschreiben beispielsweise Capurso et al. (2004) einen regionalen europäischen

Unterschied in der IL-6prom- Genotyp- und Allelverteilung. Genauer finden sie ein Nord-Süd-Gefälle, wobei der IL-6-GG-Genotyp im Süden signifikant häufiger vorkam. Auf experimenteller Ebene beeinflussen Faktoren wie die Auswahl der biologischen Kompartimente (Liquor oder Plasma bzw. Serum) und die Probenaufbereitung sowie Sensitivitätsunterschiede der verwendeten Kits das Ergebnis.

Wir wiesen einen Zusammenhang zwischen dem Alter und der IL-6-Plasmakonzentration nach, was mit Ergebnissen vorangehender Studien (Ershler 1993; Ershler et al., 1993; Wei et al., 1992) übereinstimmt. Die Autoren der zitierten Studien begründen diesen Anstieg mit dem Einfluss von Östrogen bzw. Testosteron; Hormonen, die in der Lage sind die IL-6-Produktion zu hemmen. Es wird unter anderem angenommen, dass möglicherweise niedrigere Hormonspiegel mit Beginn der Meno- bzw. Andropause mit steigenden IL-6-Konzentrationen im Alter einhergehen.

Der in unserer Studie gemessene sgp130-Konzentrations-Anstieg mit dem Alter stimmt mit den Ergebnissen einer Studie von Giuliani et al. (2001) überein. Es wurden alters- und menopausenabhängige Konzentrationsveränderungen von IL-6 und seinen löslichen Rezeptoren im Serum von 220 Frauen im Alter von 25 bis 104 Jahren gemessen. Die IL-6-Konzentration stieg exponentiell mit dem Alter und die Konzentration des sIL-6R und sgp130 zeigte bis in die 7. Lebensdekade einen signifikanten Konzentrationsanstieg und danach eine stetige Konzentrationsabnahme. Wir finden also auch durch diese Studie einen IL-6-Konzentrationsanstieg mit zunehmendem Alter bestätigt. Der darüber hinaus beschriebene Anstieg der sgp130-Konzentration bis in die 7. Lebensdekade stimmt nicht mit unseren Ergebnissen überein. Im Vergleich zu unserer Studie handelt es sich bei Giuliani et al. ausschließlich um weibliche Probanden und die Fallzahl ist mit 220 Probanden deutlich größer als in unsere Studie (58 Alzheimerpatienten, 25 Probanden). Letzteres könnte der Grund dafür sein, dass kein Anstieg der sgp130-Konzentration innerhalb unserer Kontrollgruppe, sowie der sIL-6R-Konzentration in beiden Gruppen messbar ist. Obwohl auch in unserem Kollektiv etwas mehr weibliche Probanden vorliegen (62% des Patienten-, 56% des Kontroll-Kollektivs), können wir nicht den Abfall der sgp130-Plasmakonzentration nach dem 70. Lebensjahr bestätigen. Etwa 64% unserer Alzheimerpatientinnen überschritt das 70. Lebensjahr.

In zwei weiteren Studien mit ebenfalls kleiner Fallzahl wird ein Zusammenhang zwischen dem Alter und der sgp130- sowie auch sIL-6R-Konzentration beschrieben. Maes et al. (1999 b) untersuchten sIL-6R- und sgp130-Serumkonzentrationen (Abnahmezeitpunkt 07:45h +/- 15 min)

bei 13 posttraumatischen Patienten (posttraumatic stress disorder) und 32 gesunden Kontrollen (HC = healthy controls). Sowohl bei Patienten, als auch Kontrollen korrelierte das Alter positiv mit dem sgp130 ( $r = 0,43$ ,  $p = 0,005$ ) im Serum. In beiden Gruppen waren ebenfalls prozentual mehr Frauen eingeschlossen (Patienten 70%, Kontrollen 84%), jedoch wurde im Gegensatz zu unserer Studie in keiner der beiden Gruppen die 7. Lebensdekade erreicht (Patienten 47 J +/- 9,3, Kontrollen 45,3 J +/- 7,7). Stübner et al. (1999) fanden auch einen Zusammenhang zwischen sgp130 im Liquor und dem Alter. Es wurde bei 20 geriatrischen Patienten (m/w = 7/13), die an Major Depression (MD) litten und 20 gesunden Kontrollen (m/w = 12/8) IL-6 und beide Rezeptoren im Liquor gemessen. Eine signifikante Korrelation zwischen sgp130 und dem Alter ( $r=0,563$ ,  $p=0,012$ ) zeigte sich jedoch ausschließlich in der Kontrollgruppe.

Beim Vergleich dieser Studien ist neben inhomogenen Testgruppen auch der bereits oben erwähnte Sensitivitätsunterschied auf experimenteller Ebene zu bedenken. Die zum Zeitpunkt unserer Studie zur Verfügung stehenden ELISA-Kits messen zwar sgp130 genau, die Sensivität für IL-6 und den sIL-6R ist jedoch nicht sehr hoch (siehe 3.3.1). So wurden letztere unter Umständen sowohl alleine als auch im sIL-6\*IL-6R-Komplex gemessen. Darüber hinaus stellt sich die Frage, wie gut sich Plasma- und/oder Liquorwerte von Zytokinrezeptoren als prognostische Marker für ZNS-Erkrankungen eignen.

Positiv wird diese Frage von Pulkki et al. (1996) beantwortet. So gibt es Hinweise dafür, dass sIL-6R im Serum für die Erkrankung des Multiplen Myeloms (MM) als prognostischer Faktor Relevanz haben könnte. Die Autoren zeigen, dass die Dreijahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von Menschen, die an MM erkrankt waren, mit der sIL-6R-Konzentration im Zusammenhang steht. Die Kaplan-Meier-Analyse zeigt, dass erhöhte Serumkonzentrationen mit kürzerer Überlebenszeit assoziiert sind. Interessanterweise zeigte sich keine lineare Korrelation zwischen sIL6R und IL-6, sowie  $\beta$ 2-Makroglobulin ( $\beta$ 2-M), die ebenfalls in der Gruppe von MM-Patienten, die innerhalb von drei Jahren starben, signifikant erhöht waren. Diese Ergebnisse werden durch Studien von Kyrtonis et al. (1996) bestätigt. Darüber hinaus konnten Kyrtonis et al. das Ausmaß des im Plasma zirkulierenden sIL-6R mit Schwere und Stadium der MM korrelieren.

Für die AD liegen bisher nicht so eindeutige und reproduzierbare Studienergebnisse vor. Angelis et al. (1997) weisen bei Alzheimerpatienten signifikant niedrigere sIL-6R-Plasmakonzentrationen als in der Kontrollgruppe nach. Hampel et al. (1998) bestätigen dies für Messungen im Liquor. Darüber hinaus misst dieselbe Arbeitsgruppe bei

Alzheimerpatienten signifikant niedrigere sgp130-Liquorkonzentrationen (Hampel et al., 1999). Richartz et al. (2005) untersuchen neben IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , sIL-2r und sTNF- $\alpha$ r ebenfalls IL-6 und den sIL-6R im Serum und Liquor von 20 Alzheimerpatienten und 21 Kontrollen, die vergleichbar mit unserer Kontrollgruppe sind. Sie finden ebenfalls sämtliche Parameter sowohl im Serum als auch Liquor bei Alzheimerpatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt. Statistisch signifikant ist der Unterschied bei TNF- $\alpha$  im Liquor ( $p < 0.0001$ ) und IL-6 im Serum ( $p < 0.0012$ ). Es zeigte sich keine Abhängigkeit im Hinblick auf Geschlecht, Alter oder Schweregrad der Erkrankung. Über die einfachen Konzentrationsmessungen hinaus wurden o. g. Zytokine und Zytokinrezeptoren auch nach Stimulierung der Blutbestandteile mit LPS (Lipopolysaccharide) und PHA bestimmt. Hier zeigten sich bei Alzheimerpatienten gegenüber Kontrollen ebenfalls teils signifikant (IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-5) niedrigere Konzentrationen. Ein möglicher Einfluss durch das Alter oder Geschlecht wurde ausgeschlossen. Richartz et al. nehmen im Hinblick auf die Genese der AD an, dass eine reduzierte Immunkompetenz vorzuliegen scheint.

Unsere Studie bestätigt die sgp130-Ergebnisse von Hampel et al. nicht. Weder sgp130-Plasma- noch Liquorwerte unserer Patienten und Kontrollen wichen maßgeblich voneinander ab. Anders verhält es sich beim sIL-6R. Alzheimerpatienten hatten im Gegensatz zu den Ergebnissen von Hampel, Angelis und Richartz et al. signifikant höhere sIL-6R-Plasmakonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es liegen also genau umgekehrte Verhältnisse vor. Vergleicht man den Studienaufbau miteinander, so weicht die Zahl der Studienteilnehmer, insbesondere bezogen auf die Kontrollgruppe (in obiger Reihenfolge AD/Kontrolle: 25/19, 41/32, 20/21), nicht wesentlich voneinander ab und die eingesetzten ELISA-Kits waren vom selben Hersteller (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt).

Unter Umständen liegt die Ursache für die divergenten Ergebnisse in Unterschieden bei der Studiendurchführung. Schon ein voneinander abweichender Entnahmezeitpunkt der Serum- bzw. Liquorproben und eine andere Abnahmetechnik könnten insbesondere bei kleiner Fallzahl unterschiedlich Ergebnisse verursachen. Hierbei sei auch an den physiologisch vorhandenen zirkadianen Biorhythmus gedacht, durch den z. Bsp. cortisonabhängig die Konzentration immunologischer und inflammatorischer Parameter im Tagesverlauf schwanken. Vergleichen wir unsere Werte mit der Literatur, so finden sich für die sIL-6R-Liquorwerte unserer Kontrollgruppe ( $0.91 \pm 0.22$  ng/ml) vergleichbare Angaben für gesunde Individuen ( $0.8 - 1.67$  ng/ml) (Frieling et al., 1994; Rose-John und Heinrich, 1994).

Wie einleitend erwähnt, konnten wir keinen Zusammenhang zwischen Schweregrad der AD und den drei IL-6-Parametern messen. Dies geht mit Studien von Angelis et al. (1997), Galimberti et al. (2008), Hampel et al. (1997 und 1998) und Richartz et al. (2005) konform. Gleiches gilt auch für den fehlenden Nachweis einer signifikanten Änderung der IL-6-Konzentration im Plasma oder Liquor je nach Gruppenzugehörigkeit (Alzheimerpatienten oder Kontrollen). Für Plasma- bzw. Serumspiegel wird dies von van Duijn et al. (1989) bestätigt, für Liquorspiegel von Garlind et al. (1999), Hampel et al. (1997), und Lanzrein et al. (1998).

Zu abweichenden Ergebnissen kamen wiederum Martínez et al. (2000). Sie weisen bei Alzheimerpatienten im Vergleich zu altersgleichen Kontrollen signifikant höhere IL-6-Liquorkonzentrationen nach. Dies bestätigen Licastro et al. (2000) für Messungen im Plasma. Patienten hatten wesentlich höhere Werte als Kontrollen ( $p < 0,001$ ). Licastro et al. verwendeten andere ELISA-Kits (Endogen, Italien und PKL, Deutschland), was zu unterschiedlichen Ergebnissen führen könnte. Darüber hinaus könnten diese auch mit der kurzen Halbwertszeit (unter einer Stunde) von IL-6 erklärt werden. Die Stabilität der Proben im Plasma bei einer Temperatur von 2-8 °C wird mit einem Tag, bei -20 °C mit 6 Monaten angegeben (aus: Information zu Laborparametern der Abteilung für Laboratoriumsmedizin des AKH Celle, [www.akh-celle.de/index.php?id=105](http://www.akh-celle.de/index.php?id=105)). Es ist anzunehmen, dass zwischen Abnahme einer Probe und Analyse derselben unterschiedlich viel Zeit verstrich, welche möglicherweise das Ergebnis verfälscht.

Es bleibt zu hoffen, dass eine steigende Zahl von Studien zu dieser Fragestellung und standardisierte Testverfahren langfristig zu homogenen und aussagekräftigen Untersuchungsergebnissen führen wird.

## **5.2 Die IL-6R-Konzentration in Abhängigkeit von IL-6 Polymorphismen**

Wir zeigen, dass Plasma- und Liquorspiegel des sIL-6-Rezeptors mit der genetischen Variabilität des IL-6, also dem VNTR- und G → C-Polymorphismus, zusammenhängen. In Abhängigkeit des IL-6vntr\*C-Allels wurden sowohl im Plasma als auch im Liquor signifikante sIL-6R-Konzentrationsunterschiede bei Alzheimerpatienten und Kontrollen gemessen. Konkret wiesen wir bei IL-6vntr\*C- Nichtträgern in der Gruppe der Alzheimerpatienten signifikant höhere sIL-6R-Plasma- und Liquorkonzentrationen nach als in der Kontrollgruppe. Ein tendenziell umgekehrtes Verhältnis liegt bei IL-6vntr\*C-Trägern vor. Hier waren in der

Kontrollgruppe höhere sIL-6R-Konzentrationen messbar als bei Alzheimerpatienten. Dies traf ebenfalls für Messungen in beiden Medien zu, jedoch wurden keine signifikanten Konzentrationsunterschiede erreicht.

In einer vorangehenden Studie unserer Arbeitsgruppe konnte im Hinblick auf die Alzheimergenese ein protektiver Effekt bei Präsenz des IL-6vntr\*C-Allel gezeigt werden (Papassotiropoulos et al., 1999). Bei Alzheimerpatienten war die Zahl der IL-6vntr\*C-Träger im Gegensatz zu beiden Kontrollgruppen (gesunde Probanden und altersgleiche Patienten mit depressiven Erkrankungen) signifikant erniedrigt. Darüber hinaus wurde die AD bei Trägern des IL-6vntr\*C-Allels um fünf Jahre später manifest als bei Nichtträgern. In Anlehnung an eine Studie von Fishman et al. (1998) zum G → C-Polymorphismus des IL-6 (IL-6prom) nehmen wir an, dass bei Präsenz des IL-6vntr\*C-Allels ein protektiver Effekt vorliegt.

Bei Fishman et al. wurde bei Patienten mit juveniler chronischer Arthritis und gesunden Kontrollen die IL-6-Plasmakonzentration in Abhängigkeit der IL-6prom-Allelverteilung gemessen. Die IL-6-Plasmakonzentration in der Kontrollgruppe war bei Trägern des C-Allels (IL-6prom\*C) signifikant erniedrigt, und da die Häufigkeit dieses Allels bei Erkrankten stark reduziert war, ging man von einem protektiven Effekt bei Präsenz des IL-6prom\*C aus. Der Konzentrationsunterschied wurde interessanterweise bei Stratifizierung nach homozygoten Trägern noch größer (IL-6-Konzentration CC<CG<GG). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Shibata et al. (2002) in einer Studie mit asiatischen Probanden. Bei 128 Alzheimerkranken und 83 gesunden Probanden wurde der IL-6vntr- und IL-6prom-Polymorphismus sowie IL-6 im Plasma bestimmt. Es zeigte sich bei Alzheimerpatienten eine signifikant erhöhte IL-6-Plasmakonzentration, sowie ein erhöhtes IL-6prom\*G-Allel-Vorkommen. Darüber hinaus war die IL-6-Plasmakonzentration unter den Alzheimerpatienten bei IL-6prom\*G-Allele-Trägern tendenziell erhöht.

In einer weiteren Studie, die der vorliegenden vorausging, replizierten wir ebenfalls die Studie von Fishman et al. (1998) mit Alzheimerpatienten und einer gemischten Kontrollgruppe und konnten keinen direkten Zusammenhang zwischen dem IL-6prom und der AD nachweisen (Bagli et al., 2000). Wir stellten jedoch fest, dass der IL-6prom-Polymorphismus im starken Linkage-Disequilibrium mit dem IL-6vntr-Polymorphismus liegt.

Diese und möglicherweise andere, bisher unbekannte AD-relevante Polymorphismen, die unter Umständen im Linkage-Disequilibrium miteinander liegen, könnten solche Phänomene erklären. Konkret wäre davon auszugehen, dass nicht IL-6vntr oder IL-6prom zur AD führende



bzw. beitragende Genorte sind, sondern sie würden mit einem anderen, alzheimerrelevanten Polymorphismus im Linkage-Disequilibrium liegen. Hierzu werden in Zukunft die GWAS wichtige Aufschlüsse geben können.

In der gegenwärtigen Studie zeigte sich, dass die sIL-6R-Plasma- und Liquorkonzentrationen ähnlich genotypabhängig sind wie IL-6-Plasmaspiegel in der Studie von Fishman et al. (1998). In der Gruppe IL-6prom\*C-homozygoter Träger ermittelten wir bei Alzheimerpatienten im Gegensatz zur Kontrollgruppe deutlich erhöhte sIL-6R-Plasma- und Liquorkonzentrationen. Kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen zeigte sich bei heterozygoten und IL-6prom\*G-homozygoten Trägern.

Zu bedenken ist, dass es sich hierbei um den sIL-6-Rezeptor des IL-6 handelt und nicht um IL-6 selber. Es ist jedoch zu vermuten, dass Polymorphismen im IL-6-Gen indirekt die Expression der IL-6-Rezeptoren beeinflussen. Desweiteren sei erwähnt, dass wir einen Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen innerhalb einer genetischen Gruppe feststellen und nicht innerhalb einer Probandengruppe Unterschiede zwischen Trägern und Nichtträgern.

Sämtliche für die Alzheimer Demenz als Risiko definierten Allele kommen mit hoher Häufigkeit in der Allgemeinbevölkerung vor. Die Wahrscheinlichkeit, dass jedes Individuum mehr als eines dieser Risikoallele erbt, ist demnach hoch. Grundsätzlich kann also davon ausgegangen werden, dass das Gesamtrisiko eines Individuums an Alzheimer zu erkranken, durch ein Zusammenspiel geerbter Risikoallele und unterschiedlicher Umwelteinflüssen bestimmt wird. In der vorliegenden Arbeit finden wir Hinweise dafür, dass ein Zusammenhang zwischen IL-6-Genetik und IL-6-Parametern in Serum bzw. Liquor besteht.

### **5.3 Zusammenhänge zentraler und peripherer Prozesse**

Die Pathogenese der AD findet im ZNS statt. Für Diagnose und Verlaufskontrolle stehen kognitive (neurologische / psychiatrische) Tests, aber auch biochemische Parameter zur Verfügung. Bei letzteren handelt es sich vor allem um die Analyse von Serum- bzw. Plasma- und Liquorproben. Die Liquorentnahme ist eine relativ invasive Diagnostik, das heißt aufwändig einerseits, aber auch komplikationsreicher als die Gewinnung von Serum bzw. Plasma. Die Überlegung ist nun, in welchem Maß dieses periphere Kompartiment zentrale Vorgänge repräsentiert, d. h. ob Prozesse auf Ebene des ZNS in der Peripherie messbar werden und damit die Messung peripherer Kompartimente unmittelbare Rückschlüsse zulässt. Genau genommen stellt sich die Frage, ob die Blut-Hirn-Schranke, die physiologisch genau diese beiden

Kompartimente voneinander trennt, im Rahmen der Alzheimerpathogenese durchlässig wird. Sollte dies so sein, wäre natürlich auch denkbar, dass sich umgekehrt periphere Prozesse durch IL-6-, sIL-6R- und sgp130-Liquormessungen widerspiegeln lassen. Nicht zuletzt könnte sich die Frage stellen, ob IL-6-, sIL-6R- und sgp130 möglicherweise die Integrität der BHS beeinflussen.

Bestandteil der AD-Pathologie ist eine zerebrale Angiopathie. Es gibt Hinweise dafür, dass mehr als 30 % aller Alzheimerpatienten zerebrovaskuläre Veränderungen aufweisen, die auch Zellstrukturen der Blut-Hirn-Schranke einschließen. Bestimmte Gefäßveränderungen, wie die mikrovaskuläre Degeneration, welche sich auf das zerebrale Endothel auswirkt, eine zerebrale Amyloidangiopathie, sowie periventrikuläre Läsionen der weißen Substanz, sind in praktisch allen AD-Fällen anzunehmen (Kalaria RN, 1999). In Studien mit transgenen Mäusen führte eine Überexpression von IL-6 zu Neurodegeneration, Einbruch der BHS und zur Angiogenese (Campbell et al., 1993). Oh et al. (1998) zeigten, dass IL-6 und sIL-6R die TNF $\alpha$ -induzierte Expression von VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule, ein Gen welches ein immunassoziiertes Zelloberflächen-Glykoprotein codiert) in Astrozyten erhöht. Darüber hinaus zeigen klinische Studien, dass Alzheimerpatienten, die an peripheren Gefäßveränderungen, einer koronaren Herzkrankheit oder Diabetes mellitus leiden, ebenfalls eine Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke aufweisen (Kalaria RN, 1999). Hier wird auch ApoE, welches als Risikofaktor für die AD bekannt ist (Strittmatter et al., 1993), im Zusammenhang mit Gefäßveränderungen diskutiert. In wie fern diese mit der AD einhergehen oder aber ursächlich an der Alzheimerpathogenese beteiligt sind, ist offen. Es darf jedoch angenommen werden, dass die Integrität der Blut-Hirn-Schranke spätestens im fortgeschrittenen Krankheitsstadium nicht erhalten ist.

Fabry et al. (1993) zeigen, dass IL-1 und IL-6 von zerebralen Endothelzellen exprimiert und ausgeschüttet werden. Es liegt nah, dass diese Moleküle als Konsequenz zentraler Entzündungsprozesse von aktiviertem Endothel der Hirngefäße in erhöhter Konzentration produziert werden. Besonders unter inflammatorischen Bedingungen werden auch aktivierte Makrophagen und T-Zellen des ZNS als Ort zentraler sIL-6R-Produktion gesehen (Banning et al., 1998).

Miachalopoulou et al. (2004) untersuchten den sIL-6R in Plasma und Liquor bei Patienten sowohl mit entzündlichen als auch nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen, zwei unterschiedlichen Formen der Multiplen Sklerose (MS) sowie gesunden Probanden. Sie nahmen unter anderem den Liquor/Serum-Quotienten des Albumin, welcher als Maß für die

BHS-Funktion Verwendung findet, zu Hilfe und beobachteten eine positive Korrelation zwischen diesem Quotienten und der sIL-6R-Liquorkonzentration in der Gruppe der Probanden mit entzündlichen neurologischen Erkrankungen, nicht aber bei MS. Sie leiteten daraus ab, dass in ihrer Patientengruppe die Liquorkonzentrationen des sIL-6R durch Serum-sIL-6R-Konzentrationen und Eigenschaften der BHS beeinflusst sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden IL-6, sIL-6R und sgp130 im Plasma und Liquor gemessen und miteinander korreliert. Wir beobachteten, dass bei Patienten und Kontrollen die Plasma- und Liquorkonzentrationen von sIL-6R positiv miteinander korrelieren, hingegen konnte keine Abhängigkeit zwischen IL-6- sowie sgp130-Konzentrationen im Plasma und Liquor nachgewiesen werden. Bislang liegen noch nicht viele dieser Arbeit vorrangende, wie auch folgende Studien vor, die ebenfalls IL-6, sIL-6R und sgp130 in Plasma und seltener auch im Liquor von Alzheimerpatienten untersuchen (Blum-Degen et al., 1995; Galimberti et al., 2008; Garlind et al., 1999; Gómez-Tortosa et al., 2003; Hampel et al., 1997, 1998 und 1999; Jia et al., 2005; Lanzrein et al., 1998; März et al., 1997; Martínez et al., 2000; Popp et al., 2009; Richartz et al., 2005; Schuitemaker et al., 2009; Sun et al., 2003; Wada-Isoe et al., 2004; Yamada et al., 1995). Darüber hinaus führten lediglich Lanzrein et al. (1998) und Sun et al. (2003) ein Vergleich von IL-6-Serum- und Liquorwerten an, und nur bei Hampel et al. (1999) und März et al. (1997) wurde sgp130 im Liquor bestimmt.

In der Studie von Sun et al. (2003) konnte, vergleichbar mit dem sIL-6R in unserer Studie, eine signifikante Beziehung zwischen Liquor- und Plasmakonzentrationen von IL-6 ( $r = 0.74$ ,  $p < 0.001$ ), aber auch ACT ( $r = 0.4$ ,  $p < 0.001$ ) und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) ( $r = 0.71$ ,  $p < 0.001$ ) gemessen werden. Darüber hinaus wurde eine signifikante Korrelation von ACT- und oxLDL (oxidised low-density lipoprotein)- Liquorspiegeln und des bereits oben erwähnten Liquor/-Serum-Albumin-Quotienten beschrieben. Sun et al. bewerten Ihre Daten als Hinweise dafür, dass ACT-, IL-6-, MCP-1- und oxLDL- Plasma- und Liquormessungen gute Parameter zur Kontrolle inflammatorischer Prozesse in der AD sein könnten. Die Studie wurde ausschließlich an 141 Patienten mit mutmaßlicher AD durchgeführt. Es fehlte also trotz höherer Fallzahl eine Kontrollgruppe. Der sIL-6R war nicht Bestandteil der Studie.

In der Studie von Lanzrein et al. (1998) wurde neben IL 6 und seinen Rezeptoren noch weitere Entzündungsparameter wie ACT, IL-1 $\beta$ , IL1-ra, TNF- $\alpha$  und sTNFR-II untersucht. Bei acht Alzheimerpatienten und neun Probanden, die wie in unserer Kontrollgruppe an anderen

psychiatrischen bzw. neurologischen Erkrankungen litten, wurden über zwei bis fünf Jahre, jeweils bis zum Tod, jährliche Messungen obiger Faktoren im Serum und Liquor vorgenommen. Darüber hinaus wurden CT-Aufnahmen zur Atrophiebestimmung durchgeführt und post mortem IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  im Gewebe unterschiedlicher Hirnregionen bestimmt. Fast alle Parameter variierten über die Zeit, ohne dass signifikante Abweichungen auftraten. Serum- und Liquorwerte korrelierten nicht miteinander. Lediglich TNF- $\alpha$  konnte in allen Hirnregionen bei Alzheimerpatienten in signifikant höherer Konzentration nachgewiesen werden.

Angesichts des unterschiedlichen Studienaufbaus kann kein direkter Vergleich mit unserer Studie angeführt werden. Es handelte sich um eine sehr viel kleinere Fallzahl und es wurden ausschließlich Alzheimerpatienten rekrutiert, die sich in der Endphase ihrer Erkrankung befanden. Darüber hinaus wurden Mehrfachmessungen durchgeführt, während es sich bei uns um Einmalbestimmungen handelte. Im Hinblick auf die Frage, ob zentrale Prozesse in der Peripherie messbar sind, ist ein Vergleich der beiden Studien aber durchaus zulässig, denn auch wir bestätigen, dass IL-6-Plasma- und Liquorkonzentrationen bei Alzheimerpatienten nicht miteinander korrelieren.

Wie einleitend beschrieben kommt gp130 vor allem membrangebunden vor und übermittelt nur so das IL-6-Signal. Dennoch wird gp130 auch spontan als lösliche Form exprimiert und ist, wie wir ebenfalls bestätigen können, als solche sowohl im Plasma als auch im Liquor messbar. Da gp130 für das IL-6-Signal verantwortlich ist, wäre die Kenntnis von gp130-Konzentrationschwankungen von Interesse. In vivo-Bestimmungen von gp130 sind naturgemäß nur erschwert möglich. Somit wären Studien, die untersuchen, ob gp130 und sgp130 grundsätzlich miteinander korrelieren, so dass über sgp130 Plasma- oder Liquormessungen die membrangebundene gp130-Konzentration abgeleitet werden könnte, von Interesse. Desweiteren wird angenommen, dass der sgp130 der natürliche Inhibitor der IL-6-Wirkung ist, also der Antagonist der IL-6-Signaltransduktion (Jostock et al., 2001, Müller-Newen et al., 1998, Murakami-Mori et al., 1996, Salvati et al., 1995, Tenhumberg et al., 2008). Somit sind sgp130-Messungen unabhängig der gp130-Konzentration für viele Fragestellungen sinnvoll.

Wir fanden sowohl bei Patienten als auch Kontrollen eine positive Korrelation der sIL-6R-Plasma- und Liquorkonzentration. Die Tatsache, dass dies für beide Gruppen zutrifft, ist nicht unbedingt ein Widerspruch, denn wir nehmen an, dass unter pathologischen Bedingungen die BHS geschädigt und somit für Moleküle zentralen Ursprungs durchlässig sein könnte. Hier könnte u. U. die Tatsache, dass sich unsere Kontrollgruppe nicht aus gesunden Probanden

zusammensetzt, ein limitierender Faktor für die Bewertung dieser Studie sein. Da Allelverteilung sowie IL-6-, sIL-6R- und sgp130-Plasma- und Liquorkonzentrationen bei den Probanden unserer Kontrollgruppe homogen waren (ANOVA-Test  $p \geq 0,2$ ), konnten diese zu einer Gruppe zusammengefasst werden.

#### 5.4 Interaktion des IL-6-Rezeptorsystem

IL-6 besitzt auf zerebraler Ebene ein vielseitiges Wirkungsspektrum. Hierbei kann es neben seinen physiologischen, protektiven Funktionen auch pathologisch wirken. Dahingehend ist die Komplexität des IL-6-Rezeptorsystems (siehe 1.2.2) noch längst nicht ganz verstanden und es ist nicht bekannt in welchem Maße Prozesse in der Peripherie auch für das ZNS zutreffen. So werden beispielsweise noch andere, bisher unbekannte IL-6-Rezeptoren, für das ZNS in Betracht gezogen (Bauer et al., 1993).

Derzeit liegen wenige Arbeiten zum IL-6-Rezeptorsystem bei Alzheimerpatienten vor. In der vorliegenden Studie untersuchten wir IL-6 und beide Rezeptoren im Plasma sowie im Liquor. Wir verglichen die Werte für IL-6 mit denen jedes Rezeptors, sowie die Rezeptorkonzentrationen untereinander. Ausschließlich bei Alzheimerpatienten konnten wir zwei signifikante Befunde erheben. Im Plasma korrelierte die IL-6- mit der sgp130-Konzentration und im Liquor beide Rezeptoren miteinander.

Auch im ZNS scheint die biologische Wirksamkeit von IL-6 von der Verfügbarkeit seiner Rezeptoren abzuhängen. Die Präsenz von gp130 und IL-6R sowohl in membrangebundener als auch löslicher Form ist Voraussetzung für die Transduktion des IL-6-Signals. Es wird angenommen, dass die lösliche Form des gp130 den IL-6\*IL-6R-Komplex "neutralisiert" (Narazaki et al., 1994), also eine kompetitive Hemmung der Signaltransduktion bewirkt. Darüber hinaus scheint sgp130 auch in Abwesenheit von IL-6 den zirkulierenden sIL-6R direkt zu binden, wonach keine weitere Verbindung zu IL-6 möglich ist (Gaillard et al., 1999). Es wird spekuliert, ob tatsächlich eine direkte Interaktion dieser beiden löslichen Rezeptoren vorliegt oder aber ein weiteres unbekanntes Molekül möglicherweise eine IL-6-antagonistische Wirkung ausübt. Unabhängig davon wird jedoch angenommen, dass der sIL-6R eine IL-6-synergistische Wirkung hat, während der sgp130 als IL-6-Antagonist dieselbe hemmt.

In-vitro-Studien geben Aufschluss über die Wirkung von IL-6 an Zellen des ZNS. So konnte gezeigt werden, dass menschliche Astrozyten nur in geringer Konzentration sIL-6R exprimieren und eine Zugabe von sIL-6R für eine IL-6-induzierte Reaktion benötigten (Oh et al.,

1998). Eine Folgestudie derselben Arbeitsgruppe (van Wagoner et al., 1999) zeigt, dass es bei Astrozyten die mit IL-6 und sIL-6R behandelt wurden, nur zu geringer Erhöhung der IL-6 mRNA kam. Die gleichzeitige Behandlung mit löslichem TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  führt jedoch zu einem starken Anstieg der IL-6-Genexpression. Es wird spekuliert, dass eine TNF- $\alpha$ -Stimulation von Astrozyten die Quelle endogenen IL-6 sei, das wiederum mit sIL-6R reagiere und abermals die IL-6-Expression beeinflusse. Bei Zugabe von TNF- $\alpha$  und sIL-6R zu anderen Zelltypen zentralen Ursprungs, kam es ebenfalls zu einem synergistischem Anstieg der IL-6-Expression.

Weitere Studien zeigen, dass Zellen des ZNS, die nur leicht oder gar nicht auf IL-6 reagieren, in Gegenwart von sIL-6R eine deutliche IL-6-Signaltransduktion entwickeln. Beispielsweise zeigen Kordula et al. (1998) an Zellkulturen von menschlichen Astrozyten, dass IL-6 allein keinen Einfluss auf die ACT-Expression hat, wohl aber in Gegenwart von sIL-6R. Ringheim et al. (1998) untersuchten die Wirkung von IL-6 und sIL-6R auf die APP-Transkription und -Expression in humanen Neuronen. Sie zeigen, dass die APP-Promoteraktivität nicht durch IL-6 allein induziert wird, wohl aber durch IL-6 und sIL-6R gemeinsam. In mRNA-Analysen von adultem Hirngewebe sowie Zellkulturen fetalen Hirngewebes kann anders geschnittene IL-6R-mRNA nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass Zellen zentralen Ursprungs sIL-6R-Proteine mit anderer Konfiguration und damit unter Umständen auch unterschiedlicher Funktion produzieren. Es wird deutlich, dass es sich beim sIL-6R um ein funktionell relevantes ZNS-Molekül handelt und eine bestimmte sIL-6R-Regulation scheint zur Erhaltung seiner physiologischen Eigenschaften und zur Vermeidung IL-6-induzierter Neuropathologie erforderlich zu sein.

Ziel der vorliegenden Studie war es nicht, den Funktionsmechanismus des IL-6-Rezeptorsystem darzustellen, sondern zu untersuchen, ob sich durch Serum- und Liquormessungen eine Beziehung zwischen IL-6 und seinen Rezeptoren darstellen lässt und ob ein Zusammenhang der IL-6-Parameter im ZNS mit den peripher gemessenen Parametern besteht.

Die vorliegende Arbeit ist hinsichtlich der relativ kleinen Stichprobenzahl als Pilotstudie anzusehen. Aus diesem Grund ist es unerlässlich, dass die hier gewonnenen Daten im Rahmen einer prospektiven Studie mit größerer Fallzahl und statistischer a priori Korrektur im Hinblick auf multiples Testen verifiziert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten jedoch wertvolle Trends herausgearbeitet werden, die auch im Hinblick auf die (Patho-) physiologie des IL6-Rezeptorsystems plausibel erscheinen. Bei Alzheimerpatienten wiesen wir in unserer

Testung eine signifikante Korrelation von IL-6 und sgp130 im Plasma nach. Angesichts der Vorstellung, dass der sgp130 ein IL-6-Antagonist ist, wäre eine Schlussfolgerung, dass mit steigender IL-6-Konzentration auch die sgp130-Konzentration proportional dazu ansteigt. Besonders unter pathologischen Bedingungen, in denen erhöhte IL-6-Konzentrationen auftreten, würde der gleichzeitige Anstieg des sgp130 als ein Schutzmechanismus interpretiert werden können. Wir konnten primär keinen IL-6-Konzentrationsunterschied zwischen Patienten und Kontrollen nachweisen. Das bedeutet, dass entweder kein pathologischer Konzentrationsanstieg unter inflammatorischen Bedingungen, wie sie bei der Alzheimerpathogenese vorliegen, stattfindet oder, wie bereits im vorangehenden Kapitel diskutiert, bei unserer Kontrollgruppe, die ebenfalls aus Probanden mit Erkrankungen des ZNS besteht, IL-6 in ähnlicher Konzentration vorliegt. Folgend stellt sich die Frage, warum wir in unserer Kontrollgruppe nicht ebenfalls eine signifikante Korrelation von IL-6 und sgp130 im Plasma fanden. Es bleibt spekulativ, aber es ist vorstellbar, dass sgp130 nicht nur im Zusammenhang mit zunehmenden IL-6-Konzentrationen steigt, sondern eventuell auch mit unterschiedlicher IL-6-Wirksamkeit. Angenommen, bei Alzheimerpatienten würde das IL-6-Signal zu einer größeren oder fehlerhaften Zell-Antwort führen, wäre ein proportionaler sgp130-Anstieg denkbar, der dann in der Kontrollgruppe fehlen würde.

Jostock et al. (2001) zeigen wie fein das IL-6-Rezeptorsystem aufeinander abgestimmt ist. Sie stellten ein rekombinantes sgp130-Protein her, das den IL-6\*sIL-6RK bindet und damit inhibiert. Interessanterweise findet diese Inhibierung nicht statt, wenn die Zellen der BAF/3-Zellkultur nicht nur membrangebundenes gp130, sondern auch membrangebundenes IL-6R exprimierten. Das heißt, dass sgp130 nicht in der Lage war, mit IL-6 gebunden an den IL-6R, und somit an der Zelloberfläche, eine Bindung einzugehen. Rekombinantes sgp130 konnte dazu verwendet werden, die anti-apoptotische Wirkung des sIL-6R an der Lamina Propria von Patienten die an Morbus Crohn erkrankt sind, zu blockieren. Es wurde gefolgert, dass die natürliche hemmende Wirkung von sgp130 auf IL-6-Signale von der Gegenwart des sIL-6R abhängt. Es besteht die Hoffnung, dass rekombinantes sgp130 unter Umständen ein wertvolles Therapeutikum für solche Erkrankungen sein könnte, in denen pathologische Reaktionen auf IL-6-Signale existieren.

In der Gruppe unserer Alzheimerpatienten korrelierten sIL-6R und sgp130 im Liquor miteinander. Dieses Ergebnis geht mit der Vorstellung konform, dass sgp130 seine antagonistische Wirkung in Abhängigkeit von sIL-6R entfaltet. Zu vergleichbarem Ergebnis kam

Kovacs (2001) in einer Studie mit 76 Krebspatienten und 28 gesunden Kontrollen, in der IL-6, sIL6-R und sgp130 im Serum untersucht wurden. Die Patienten unterschiedlicher Tumortypen wurden in Abhängigkeit ihres Tumorstadiums (I-VI) und erfolgter Therapie (ohne oder mit Chemo-/Radiotherapie) in Gruppen eingeteilt. Ähnlich wie in unserer Studie wich die IL-6-Konzentration unabhängig des Tumorstadiums oder der Therapie nicht maßgeblich von der Kontrollgruppe ab. In Stadium I und II war sIL-6R signifikant erhöht, in Stadium III und IV zeigte sich nur eine Tendenz. In allen Fällen hatte keine Therapie stattgefunden. Der sgp130 war sowohl mit als auch ohne Therapie in allen Tumorstadien signifikant erhöht. In allen Stadien ohne Therapie korrelierten sIL-6R und sgp130 miteinander, vergleichbar wie bei unseren Alzheimerpatienten im Liquor.

Es kann festgehalten werden, dass die vorliegende Arbeit Hinweise dafür liefert, dass es grundsätzlich für das Verständnis der IL-6-Regulation und der Bewertung messbarer IL-6-Parameter sinnvoll ist, nicht nur IL-6, sondern auch sIL-6R und sgp130 zu bestimmen und zu vergleichen.

Ziel der Studie war es festzustellen, ob die Bestimmung immunochemischer Parameter (IL-6, sIL-6R, sgp130) und relevanter Gen-Polymorphismen (ApoE, IL-6vntr, IL-6prom) einen diagnostischen Wert zur (Früh-) Erkennung und ggf. Verlaufskontrolle der AD haben, und ob sie gegebenenfalls eine Aussage über den Schweregrad der Erkrankung zulassen. Darüber hinaus wurde das IL-6-Rezeptorsystem untersucht und nach möglichen Zusammenhängen ausgewertet.

Hinsichtlich des Studiendesigns müssen bezüglich der Auswertung einige limitierende Faktoren bedacht werden. Die Fallzahl war sehr klein, d. h. die Power damit schwach und unsere Kontrollgruppe setzte sich nicht ausschließlich aus gesunden Probanden zusammen, sondern bestand aus Patienten mit anderen psychiatrisch-neurologischen Erkrankungen. Darüber hinaus sind die Meßmethoden aus aktueller Sicht verhältnismäßig grob.

Nichts desto trotz konnten wir zeigen, dass signifikante Zusammenhänge zwischen IL-6-Genetik, Alzheimer und messbaren IL-6-Parametern bestehen und das wir Hinweise dafür finden konnten, dass Messungen inflammatorischer Parameter, wie z. Bsp. das IL-6, als diagnostische Marker für die Alzheimerdemenz herangezogen werden können.

Sicher sind hier weitere Studien mit höherer Probandenzahl und effektiveren laborchemischen Testverfahren, wie beispielsweise dem „Deep sequencing“, erforderlich.



## 6 Zusammenfassung

Interleukin-6 (IL-6) ist ein multifunktionelles Zytokin, das eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Alzheimerdemenz (AD) spielt. Die funktionellen Effekte des IL-6 werden durch einen speziellen Rezeptorkomplex, bestehend aus einem IL-6-bindenden Glykoprotein, dem gp80 beziehungsweise IL-6-Rezeptor (IL-6R), und einem für die Signaltransduktion verantwortlichen Glykoprotein, dem gp130, vermittelt. Studien, welche die löslichen Formen dieser Parameter (IL-6, sIL-6R und sgp130) in Plasma und Liquor bei Alzheimerpatienten untersuchten, kamen bislang zu widersprüchlichen Ergebnissen. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, in wie weit die genetische Heterogenität das Ausmaß der Konzentrationsunterschiede von IL-6, sIL-6R und sgp130 beeinflusst, ob es Unterschiede in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Erkrankungsschwere gibt und ob Zusammenhänge zwischen zentralen und peripheren Prozessen gemessen werden können.

Bei 58 Alzheimerpatienten und 25 Kontrollen, bestehend aus Patienten, die an anderen psychiatrischen Erkrankungen (Depressionen, leichte Gedächtnisstörungen, vaskuläre und alkoholabhängige Demenz) litten, wurden IL-6, sIL-6R und sgp130-Konzentrationen im Plasma und Liquor gemessen und der Polymorphismus Apolipoprotein E (ApoE) und IL-6-Genotyp (IL-6prom und IL-6vntr) genotypisiert.

Wir fanden bei Alzheimerpatienten im Vergleich zu den Probanden der Kontrollgruppe höhere sIL-6R-Konzentrationen im Plasma und in beiden Gruppen korrelierte IL-6 im Plasma mit dem Alter. Außerdem konnten wir bei Alzheimerpatienten eine positive Korrelation von sgp130 im Plasma mit dem Alter darstellen.

Darüber hinaus konnten wir bei Alzheimerpatienten einen Zusammenhang zwischen erhöhten sIL-6R-Spiegeln und der genetischen Variabilität des IL-6-Gens, das heißt mit dem VNTR- und Promoterpolymorphismus, herstellen. Patienten die Nichtträger des IL-6vntr\*C-Allels waren, hatten sowohl im Plasma als auch im Liquor signifikant höhere sIL-6R-Konzentrationen. Eine ähnliche Beobachtung konnte für den IL-6prom\*CC- Genotyp gemacht werden. Bei IL-6prom\*C-homozygoten Trägern hatten Patienten im Plasma und im Liquor höhere sIL-6R-Konzentrationen als Kontrollen.

Des Weiteren gibt es Hinweise dafür, dass sich zentrale Prozesse in der Peripherie messen lassen und auch Zusammenhänge des IL-6-Signaltransduktionssystems darstellbar sind. In beiden Gruppen korrelierte der sIL-6R im Plasma mit dem sIL-6R im Liquor. Bei Alzheimerpatienten

war eine signifikante Beziehung von IL-6 und sgp130 im Plasma, sowie von sIL-6R und sgp130 im Liquor nachweisbar.

Obwohl die Studie durch ihre kleine Fallzahl und die Tatsache, dass es sich bei der Kontrollgruppe nicht um ausschließlich gesunde Probanden handelt, limitiert ist, liefert sie wertvolle Hinweise dafür, dass Messungen von IL-6 und seinen Rezeptoren sinnvoll sind, um die Bedeutung inflammatorischer Prozesse für die Pathogenese der AD zu verstehen und zu bewerten und dass möglicherweise genetische Veränderungen des IL-6 zu messbaren Veränderungen des IL-6-Signaltransduktionssystems führen.

## 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 7.1 Abbildungen

Abb. 1:	Einfluss von Entzündungsfaktoren auf die Neurodegeneration nach Eikelenboom und Veerhuis (1996)	13
Abb. 2:	Zytokin-Akutphase-Protein-Kaskade nach Wood et al. (1993)	14
Abb. 3:	Interleukin-6-vermittelte Signaltransduktion	22
Abb. 4:	Apolipoprotein E	47
Abb. 5:	Interleukin-6-VNTR	48
Abb. 6:	Interleukin-6-Promoter	49
Abb. 7:	Korrelation des Alters mit der IL-6-Plasmakonzentration bei Patienten ( $r = 0,302$ ; $p = 0,021$ ; $n = 58$ ) und Kontrollen ( $r = 0,453$ ; $p = 0,026$ ; $n = 24$ )	53
Abb. 8:	Korrelation des Alters mit der IL-6-Liquorkonzentration bei Patienten ( $r = 0,211$ ; $p = 0,115$ ; $n = 57$ ) und Kontrollen ( $r = -0,158$ ; $p = 0,460$ ; $n = 24$ )	53
Abb. 9:	Korrelation des Alters mit der sIL-6R-Plasmakonzentration bei Patienten ( $r = 0,059$ ; $p = 0,664$ ; $n = 57$ ) und Kontrollen ( $r = -0,162$ ; $p = 0,438$ ; $n = 25$ )	54
Abb. 10:	Korrelation des Alters mit der sIL-6R-Liquorkonzentration bei Patienten ( $r = 0,117$ ; $p = 0,390$ ; $n = 56$ ) und Kontrollen ( $r = 0,312$ ; $p = 0,129$ ; $n = 25$ )	54
Abb. 11:	Korrelation des Alters mit der sgp130-Plasmakonzentration bei Patienten ( $r = 0,368$ ; $p = 0,005$ ; $n = 58$ ) und Kontrollen ( $r = 0,024$ ; $p = 0,908$ ; $n = 25$ )	55
Abb. 12:	Korrelation des Alters mit der sgp130-Liquorkonzentration bei Patienten ( $r = 0,139$ ; $p = 0,307$ ; $n = 56$ ) und Kontrollen ( $r = 0,127$ ; $p = 0,545$ ; $n = 25$ )	55
Abb. 13:	sIL-6R-Plasmakonzentration bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit des Geschlechts	57
Abb. 14:	sIL-6R-Liquorkonzentration bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit des Geschlechts	57
Abb. 15:	sIL-6R-Plasmakonzentration bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit des Apo E* $\epsilon$ 4-Allels	58
Abb. 16:	sIL-6R-Liquorkonzentration bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit des Apo E* $\epsilon$ 4-Allels	59
Abb. 17:	sIL-6R-Plasmakonzentrationen bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit des IL-6vntr*C-Allels	60

Abb. 18:	sIL-6R-Liquorkonzentration bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit des IL-6vnr*C-Allels	60
Abb. 19:	sIL-6R-Plasmakonzentration bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit des IL-6prom-Genotyps	61
Abb. 20:	sIL-6R-Liquorkonzentration bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit des IL-6prom-Genotyps	61
Abb. 21:	Korrelation der sIL-6R-Konzentration im Plasma und Liquor bei Patienten ( $r = 0,426$ ; $p < 0,001$ ; $n = 55$ ) und Kontrollen ( $r = 0,620$ ; $p < 0,001$ ; $n = 25$ )	62
Abb. 22:	Korrelation der IL-6-Konzentration im Plasma und Liquor bei Patienten ( $r = 0,1$ ; $p = 0,457$ ; $n = 57$ ) und Kontrollen ( $r = -0,027$ ; $p = 0,904$ ; $n = 23$ )	63
Abb. 23:	Korrelation der sgp130-Konzentration im Plasma und Liquor bei Patienten ( $r = 0,106$ ; $p = 0,438$ ; $n = 56$ ) und Kontrollen ( $r = 0,053$ ; $p = 0,803$ ; $n = 25$ )	63
Abb. 24:	Korrelation der IL-6- mit der sgp130-Plasmakonzentration bei Patienten ( $r = 0,348$ ; $p = 0,007$ ; $n = 58$ ) und Kontrollen ( $r = 0,034$ ; $p = 0,875$ ; $n = 24$ )	64
Abb. 25:	Korrelation der sIL-6R- mit der sgp130-Liquorkonzentration bei Patienten ( $r = 0,457$ ; $p = 0,000$ ; $n = 56$ ) und Kontrollen ( $r = 0,257$ ; $p = 0,215$ ; $n = 25$ )	64

## 7.2 Tabellen

Tab. 1:	Demographische und klinische Daten der Alzheimerpatienten und Kontrollen	28
Tab. 2:	Verdünnung der ELISA-Proben	36
Tab. 3:	Genspezifische PCR-Zyklen und Auswertung	40
Tab. 4:	Genspezifischer PCR-Ansatz	40
Tab. 5:	Verwendete Primer und ihre Schmelztemperaturen	42
Tab. 6:	Restriktionsenzyme und Schnittprodukte	43
Tab. 7:	Enzymsystem und Inkubationsbedingungen	43
Tab. 8:	Plasma- und Liquorspiegel von IL-6, sIL-6R und sgp130 bei Patienten und Kontrollen	51
Tab. 9:	Plasma- und Liquorspiegel von IL-6, sIL-6R und sgp130 bei Männern und Frauen	51
Tab. 10:	Korrelation des MMSE mit der IL-6-, sIL-6R- und gp130-Konzentration im Plasma und Liquor bei Patienten und Kontrollen	52
Tab. 11:	Allelverteilung	56
Tab. 12:	Korrelation der Parameter des IL-6-Rezeptorsystems im Plasma und Liquor bei Patienten und Kontrollen	65

## 8 Literaturverzeichnis

- Adolfsson R, Bucht G, Lithner F, Winblad B.** Hypoglycemia in Alzheimer's disease. *Acta Med Scand* 1980; 208: 387-388
- Aisen PS.** Inflammation and Alzheimer's disease: mechanisms and therapeutic strategies. *Gerontology* 1997; 43: 143-149
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 3389-3402
- Altstiel LD, Sperber K.** Cytokines in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1991; 15: 481-495
- Alzheimer A.** Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin* 1907; 64: 146-148
- Angelis P, Scharf S, Christophidis N.** Effects of age on neutrophil function and its relevance to bacterial infections in the elderly. *J Clin Lab Immunol* 1997; 49: 33-40
- Arosio B, Trabattoni D, Galimberti L, Bucciarelli P, Fasano F, Calabresi C, Cazzullo CL, Vergani C, Annoni G, Clerici M.** Interleukin-10 and interleukin-6 gene polymorphisms as risk factors for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2004; 25: 1009-1015
- Bagli M, Papassotiropoulos A, Knapp M, Jessen F, Luise Rao M, Maier W, Heun R.** Association between an interleukin-6 promoter and 3' flanking region haplotype and reduced Alzheimer's disease risk in a German population. *Neurosci Lett* 2000; 283: 109-112
- Bagli M, Papassotiropoulos A, Hampel H, Becker K, Jessen F, Bürger K, Ptok U, Rao ML, Möller HJ, Maier W, Heun R.** Polymorphisms of the gene encoding the inflammatory cytokine interleukin-6 determine the magnitude of the increase in soluble interleukin-6 receptor levels in Alzheimer's disease. Results of a pilot study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2003; 253: 44-48
- Ban EM.** Interleukin-1 receptors in the brain: characterization by quantitative in situ autoradiography. *Immunomethods* 1994; 5: 31-40
- Banning U, Bonig H, Pafferath B, Klein-Vehne A, Burdach S, Korholz D.** Release of the soluble interleukin-6 receptor from human T-cells. *Immunol Invest* 1998; 27: 47-55
- Bauer J, Strauss S, Schreiter-Gasser U, Ganter U, Schlegel P, Witt I, Volk B, Berger M.** Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices. *FEBS Lett* 1991; 285: 111-114
- Bauer J, Ganter U, Strauss S, Stadtmüller G, Frommberger U, Bauer H, Volk B, Berger M.** The participation of interleukin-6 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Res Immunol* 1992; 143: 650-657
- Bauer J, Ganter U, Abel J, Strauss S, Jonas U, Weiss R, Gebicke-Haerter P, Volk B, Berger M.** Effects of interleukin-1 and interleukin-6 on metallothionein and amyloid precursor protein expression in human neuroblastoma cells. Evidence that interleukin-6 possibly acts via a receptor different from the 80-kDa interleukin-6 receptor. *J Neuroimmunol* 1993; 45: 163-173
- Beard CM, Waring SC, O'Brien PC, Kurland LT, Kokmen E.** Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer's disease: a case-control study in Rochester, Minnesota, 1980 through 1984. *Mayo Clin Proc* 1998; 73: 951-955

- Bennett DA, Wilson RS, Schneider JA, Evans DA, MD, Mendes de Leon CF, PhD, Arnold SE, Barnes LL, Bienias JL.** Education modifies the relation of AD pathology to level of cognitive function in older persons *Neurology* 2003; 60: 1909-1915
- Benveniste EN, Tang LP, Law RM.** Differential regulation of astrocyte TNF-alpha expression by the cytokines TGF-beta, IL-6 and IL-10. *Int J Dev Neurosci* 1995; 13: 341-349
- Berlit P.** Basiswissen Neurologie. Berlin: Springer, 2000
- Bickel H, Cooper B.** Incidence and relative risk of dementia in an urban elderly population: findings of a prospective field study. *Psychol Med* 1994; 24: 179-192
- Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P.** Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 1995; 202: 17-20
- Bonaccorso S, Lin A, Song C, Verkerk R, Kenis G, Bosmans E, Scharpe S, Vandewoude M, Dossche A, Maes M.** Serotonin-immune interactions in elderly volunteers and in patients with Alzheimer's disease (DAT): lower plasma tryptophan availability to the brain in the elderly and increased serum interleukin-6 in DAT. *Aging (Milano)*. 1998; 10: 316-323
- Borgaonkar DS, Schmidt LC, Martin SE, Kanzer MD, Edelsohn L, Growdon J, Farrer LA.** Linkage of late-onset Alzheimer's disease with apolipoprotein E type 4 on chromosome 19. *Lancet* 1993; 342: 625
- Bowcock AM, Ray A, Erlich H, Sehgal PB.** Rapid detection and sequencing of alleles in the 3' flanking region of the interleukin-6 gene. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 6855-6864
- Breitner JC.** Inflammatory processes and antiinflammatory drugs in Alzheimer's disease: a current appraisal. *Neurobiol Aging* 1996a; 17: 789-794
- Breteler MM, van Duijn CM, Chandra V, Fratiglioni L, Graves AB, Heyman A, Jorm AF, Kokmen E, Kondo K, Mortimer JA.** Medical history and the risk of Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Int J Epidemiol* 1991; 20 Suppl 2: 36-42
- Brookmeyer R, Johnsona E, Ziegler-Grahamb K, Arrighic HM.** Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia* 2007, 3: 186-191
- Calero M, Rostagno A, Matsubara E, Zlokovic B, Frangione B, Ghiso J.** Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech*. 2000; 50: 305-315
- Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MB, Mucke L.** Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 10061-10065
- Campbell IL.** Neuropathogenic actions of cytokines assessed in transgenic mice. *Int J Dev Neurosci* 1995; 13: 275-284
- Capurso C, Solfrizzi V, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso SA, Capurso A, Panza F.** Interleukin 6-174 G/C promoter gene polymorphism and sporadic Alzheimer's disease: geographic allele and genotype variations in Europe. *Exp Gerontol*. 2004; 39: 1567-1573
- Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J.** Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 1991; 353: 844-846
- Chobor KL, Brown JW.** Semantic deterioration in Alzheimer's: the patterns to expect. *Geriatrics* 1990; 45: 68-70, 75

- Colton CA, Gilbert DL.** Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett* 1987; 223: 284-288
- Critchley M.** Discussion on the mental and physical symptoms of the presenile dementias. *Proc Roy Soc Med* 1933; 26: 1077-1091
- D'Alessandro F, Colamonici OR, Nordan RP.** Direct association of interleukin-6 with a 130-kDa component of the interleukin-6 receptor system. *J Biol Chem* 1993; 268: 2149-2153
- De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F.** Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998; 391: 387-390
- De Strooper B.** Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 2003; 38: 9-12
- Depboylu C, Lohmüller F, Gocke P, Du Y, Zimmer R, Gasser T, Klockgether T, Dodel RC.** An interleukin-6 promoter variant is not associated with an increased risk for Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2004; 17: 170-173
- Duff K.** Alzheimer transgenic mouse models come of age. *Trends Neurosci* 1997; 20: 279-280
- Eikelenboom P, Stam FC.** Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. An immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol (Berl)* 1982; 57: 239-242
- Eikelenboom P, Veerhuis R.** The role of complement and activated microglia in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1996; 17: 673-680
- Ershler WB.** Interleukin-6: a cytokine for gerontologists. *J Am Geriatr Soc* 1993; 41: 176-181
- Ershler WB, Sun WH, Binkley N, Gravenstein S, Volk MJ, Kamoske G, Klopp RG, Roecker EB, Daynes RA, Weindruch R.** Interleukin-6 and aging: blood levels and mononuclear cell production increase with advancing age and in vitro production is modifiable by dietary restriction. *Lymphokine Cytokine Res* 1993; 12: 225-230
- Fabry Z, Fitzsimmons KM, Herlein JA, Moninger TO, Dobbs MB, Hart MN.** Production of the cytokines interleukin 1 and 6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes. *J Neuroimmunol* 1993; 47: 23-34
- Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, Runz H, Kuhl S, Bertsch T, von Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T.** Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 5856-5861
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM.** Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 1997; 278: 1349-1356
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M; Alzheimer's Disease International.** Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005; 366: 2112-2117
- Fillit H, Ding WH, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, Wolf-Klein G.** Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1991; 129: 318-320



- Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P.** The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102: 1369-1376
- Frederickson RC.** Astroglia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1992; 13: 239-253
- Frieling JT, Sauerwein RW, Wijdenes J, Hendriks T, van der Linden CJ.** Soluble interleukin 6 receptor in biological fluids from human origin. *Cytokine*. 1994; 6: 376-381
- Gadient RA, Otten UH.** Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol* 1997; 52: 379-390
- Gaillard JP, Mani JC, Liautard J, Klein B, Brochier J.** Interleukin-6 receptor signaling. I. gp80 and gp130 receptor interaction in the absence of interleukin-6. *Eur Cytokine Netw* 1999; 10: 43-48
- Galimberti D, Venturelli E, Fenoglio C, Guidi I, Villa C, Bergamaschini L, Cortini F, Scalabrini D, Baron P, Vergani C, Bresolin N, Scarpini E.** Intrathecal levels of IL-6, IL-11 and LIF in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *J Neurol* 2008; 255: 539-544
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F.** Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 1995; 373: 523-527
- Garlind A, Brauner A, Hojeberg B, Basun H, Schultzberg M.** Soluble interleukin-1 receptor type II levels are elevated in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease patients. *Brain Res* 1999; 826: 112-116
- Glenner GG, Wong CW.** Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 120: 885-890
- Goldgaber D, Harris HW, Hla T, Maciag T, Donnelly RJ, Jacobsen JS, Vitek MP, Gajdusek DC.** Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 7606-7610
- Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT.** Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1997; 41: 17-24
- Gómez-Tortosa E, Gonzalo I, Fanjul S, Sainz MJ, Cantarero S, Cemillán C, Yébenes JG, del Ser T.** Cerebrospinal fluid markers in dementia with lewy bodies compared with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2003; 60: 1218-1222
- Gottschall PE, Tatsuno I, Arimura A.** Regulation of interleukin-6 (IL-6) secretion in primary cultured rat astrocytes: synergism of interleukin-1 (IL-1) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Brain Res* 1994; 637: 197-203
- Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL 3d, Araoz C.** Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 7611-7615
- Gruol DL, Nelson TE.** Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Mol Neurobiol* 1997; 15: 307-339

- Giunta B, Fernandez F, Nikolic WV, Obregon D, Rrapo E, Town T, Tan J.** Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2008; 5: 51
- Giuliani N, Sansoni P, Girasole G, Vescovini R, Passeri G, Passeri M, Pedrazzoni M.** Serum interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and soluble gp130 exhibit different patterns of age- and menopause-related changes. *Exp Gerontol* 2001; 36: 547-557
- Haga S, Ikeda K, Sato M, Ishii T.** Synthetic Alzheimer amyloid beta/A4 peptides enhance production of complement C3 component by cultured microglial cells. *Brain Res* 1993; 601: 88-94
- Hama T, Miyamoto M, Tsukui H, Nishio C, Hatanaka H.** Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. *Neurosci Lett* 1989; 104: 340-344
- Hempel H, Schoen D, Schwarz MJ, Kotter HU, Schneider C, Sunderland T, Dukoff R, Levy J, Padberg F, Stubner S, Buch K, Muller N, Moller HJ.** Interleukin-6 is not altered in cerebrospinal fluid of first-degree relatives and patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1997; 228: 143-146
- Hempel H, Sunderland T, Kotter HU, Schneider C, Teipel SJ, Padberg F, Dukoff R, Levy J, Moller HJ.** Decreased soluble interleukin-6 receptor in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res* 1998; 780: 356-359
- Hempel H, Teipel SJ, Padberg F, Haslinger A, Riemenschneider M, Schwarz MJ, Kotter HU, Scheloske M, Buch K, Stubner S, Dukoff R, Lasser R, Muller N, Sunderland T, Rapoport SI, Moller HJ.** Discriminant power of combined cerebrospinal fluid tau protein and of the soluble interleukin-6 receptor complex in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1999; 823: 104-112
- Harel A, Wu F, Mattson MP, Morris CM, Yao PJ.** Evidence for CALM in directing VAMP2 trafficking. *Traffic*. 2008; 9: 417-429
- Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskva V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Kehoe PG, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schürmann B, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hempel H, Hüll M, Rujescu D, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Holmans PA, O'Donovan M, Owen MJ, Williams J.** Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2009; 41: 1088-1093
- Haupt M, Kurz A, Pollmann S, Romero B.** Psychopathologic disorders at the onset of Alzheimer's disease. *Fortschr Neurol Psychiatr* 1992; 60: 3-7
- Herreman A, Serneels L, Annaert W, Collen D, Schoonjans L, De Strooper B.** Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2000, 2: 461-462

- Heyman A, Wilkinson WE, Stafford JA, Helms MJ, Sigmon AH, Weinberg T.** Alzheimer's disease: a study of epidemiological aspects. *Ann Neurol* 1984; 15: 335-341
- Heyser CJ, Masliah E, Samimi A, Campbell IL, Gold LH.** Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 18; 94: 1500-1505
- Hixson JE, Vernier DT.** Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990; 31: 545-548
- Holland AJ, Oliver C.** Down's syndrome and the links with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; 59: 111-114
- Holtzman DM, Pitas RE, Kilbridge J, Nathan B, Mahley RW, Bu G, Schwartz AL.** Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system-derived neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 9480-9484
- Honda M, Yamamoto S, Cheng M, Yasukawa K, Suzuki H, Saito T, Osugi Y, Tokunaga T, Kishimoto T.** Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *J Immunol* 1992; 148: 2175-2180
- Huberman M, Sredni B, Stern L, Kott E, Shalit F.** IL-2 and IL-6 secretion in dementia: correlation with type and severity of disease. *J Neurol Sci* 1995; 130: 161-164
- Hüll M, Strauss S, Volk B, Berger M, Bauer J.** Interleukin-6 is present in early stages of plaque formation and is restricted to the brains of Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol (Berl)* 1995; 89: 544-551
- Hüll M, Berger M, Volk B, Bauer J.** Occurrence of interleukin-6 in cortical plaques of Alzheimer's disease patients may precede transformation of diffuse into neuritic plaques. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 777: 205-212
- Hutton M, Busfield F, Wragg M, Crook R, Perez-Tur J, Clark RF, Prihar G, Talbot C, Phillips H, Wright K, Baker M, Lendon C, Duff K, Martinez A, Houlden H, Nichols A, Karran E, Roberts G, Roques P, Rossor M, Venter JC, Adams MD, Cline RT, Phillips CA, Goate A.** Complete analysis of the presenilin 1 gene in early onset Alzheimer's disease. *Neuroreport* 1996; 7: 801-805
- Jia JP, Meng R, Sun YX, Sun WJ, Ji XM, Jia LF.** Cerebrospinal fluid tau, Abeta1-42 and inflammatory cytokines in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurosci Lett* 2005; 383: 12-16
- Ilveskoski E, Perola M, Lehtimäki T, Laippala P, Savolainen V, Pajarinen J, Penttilä A, Lulu KH, Mannikko A, Liesto KK, Koivula T, Karhunen PJ.** Age-dependent association of apolipoprotein E genotype with coronary and aortic atherosclerosis in middle-aged men: an autopsy study. *Circulation* 1999; 100: 608-613
- Jenkinson ML, Bliss MR, Brain AT, Scott DL.** Rheumatoid arthritis and senile dementia of the Alzheimer's type. *Br J Rheumatol* 1989; 28: 86-88
- Jenne DE, Tschopp J.** Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. *Trends Biochem Sci.* 1992; 17:154-159
- Jones SE, Jomary C.** Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34: 427-431

**Jostock T, Mullberg J, Ozbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, Fischer M, Neurath MF, Rose-John S.** Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem* 2001; 268: 160-167

**Kähler WM.** SPSS für Windows: Datenanalyse unter Windows. Braunschweig-Wiesbaden: Vieweg, 1994

**Kalaria RN.** The blood-brain barrier and cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 893: 113-125

**Kálmán J, Juhász A, Laird G, Dickens P, Járdánházy T, Rimanóczy A, Boncz I, Parry-Jones WL, Janka Z.** Serum interleukin-6 levels correlate with the severity of dementia in Down syndrome and in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.* 1997; 96: 236-240

**Kordula T, Rydel RE, Brigham EF, Horn F, Heinrich PC, Travis J.** Oncostatin M and the interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor complex regulate alpha1-antichymotrypsin expression in human cortical astrocytes. *J Biol Chem* 1998; 273: 4112-4118

**Kovacs E.** Investigation of interleukin-6 (IL-6), soluble IL-6 receptor (sIL-6R) and soluble gp130 (sgp130) in sera of cancer patients. *Biomed Pharmacother* 2001; 55: 391-396

**Kurz A und Müller U.** Apolipoprotein E und Alzheimer-Krankheit. In: Rösler M et al., Hrsg. Alzheimer Krankheit. Weinheim: Belz, 1997: 144-151

**Kyrtonis MC, Dedoussis G, Zervas C, Perifanis V, Bax-evanis C, Stamatelou M, Maniatis A.** Soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R), a new prognostic factor in multiple myeloma. *Br. J. Haematol* 1996; 93: 398-400

**Lannfelt L, Johnston J, Bogdanovich N, Cowburn R.** Amyloid precursor protein gene mutation at codon 670/671 in familial Alzheimer's disease in Sweden. *Biochem Soc Trans* 1994; 22: 176-179

**Lanzrein AS, Johnston CM, Perry VH, Jobst KA, King EM, Smith AD.** Longitudinal study of inflammatory factors in serum, cerebrospinal fluid, and brain tissue in Alzheimer disease: interleukin-1beta, interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist, tumor necrosis factor-alpha, the soluble tumor necrosis factor receptors I and II, and alpha1-antichymotrypsin. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1998; 12: 215-227

**Lautenschlager NT, Cupples LA, Rao VS, Auerbach SA, Becker R, Burke J, Chui H, Duara R, Foley EJ, Glatt SL, Green RC, Jones R, Karlinsky H, Kukull WA, Kurz A, Larson EB, Martelli K, Sadovnick AD, Volicer L, Waring SC, Growdon JH, Farrer LA.** Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old? *Neurology* 1996; 46: 641-650

**Leibson CL, Rocca WA, Hanson VA, Cha R, Kokmen E, O'Brien PC, Palumbo PJ.**

The risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 826: 422-427

**Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Martinez A, Madrigal L, Hincapie L, Arango JC, Anthony DC, Koo EH, Goate AM, Selkoe DJ, Arango JC.** The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med.* 1996; 2: 1146-1150

**Licastro F, Grimaldi LM, Bonafè M, Martina C, Olivieri F, Cavallone L, Giovanietti S, Masliah E, Franceschi C** Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain. *Neurobiol Aging.* 2003; 24: 921-926

- Licastro F, Pedrini S, Caputo L, Annoni G, Davis LJ, Ferri C, Casadei V, Grimaldi LM.** Increased plasma levels of interleukin-1, interleukin-6 and alpha-1-antichymotrypsin in patients with Alzheimer's disease: peripheral inflammation or signals from the brain? *J Neuroimmunol* 2000; 103: 97-102
- Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ.** Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18(2):176-179
- Luterman JD, Haroutunian V, Yemul S, Ho L, Purohit D, Aisen PS, Mohs R, Pasinetti GM.** Cytokine gene expression as a function of the clinical progression of Alzheimer disease dementia. *Arch Neurol* 2000; 57: 1153-1160
- Maes M, DeVos N, Wauters A, Demedts P, Maurits VW, Neels H, Bosmans E, Altamura C, Lin A, Song C, Vandenbroucke M, Scharpe S.** Inflammatory markers in younger vs elderly normal volunteers and in patients with Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res.* 1999a; 33: 397-405
- Maes M, Lin AH, Delmeire L, Van Gastel A, Kenis G, De Jongh R, Bosmans E.** Elevated serum interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor concentrations in posttraumatic stress disorder following accidental man-made traumatic events. *Biol Psychiatry* 1999b; 45: 833-839
- März W, Scharnagl H, Kirca M, Bohl J, Gross W, Ohm TG.** Apolipoprotein E polymorphism is associated with both senile plaque load and Alzheimer-type neurofibrillary tangle formation. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 777: 276-280
- März P, Heese K, Hock C, Golombowski S, Muller-Spahn F, Rose-John S, Otten U.** Interleukin-6 (IL-6) and soluble forms of IL-6 receptors are not altered in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 1997; 239: 29-32
- März P, Cheng JG, Gadiant RA, Patterson PH, Stoyan T, Otten U, Rose-John S.** Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3251-3256
- Mandelkow EM, Schweers O, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E.** Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 777: 96-106
- Mann DM, Esiri MM.** The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. *J Neurol Sci* 1989; 89: 169-179
- Martínéz M, Fernandez-Vivancos E, Frank A, De la Fuente M, Hernanz A.** Increased cerebrospinal fluid fas (Apo-1) levels in Alzheimer's disease. Relationship with IL-6 concentrations. *Brain Res* 2000; 869: 216-219
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K.** Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 4245-4249
- Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE.** Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 1993; 10: 243-254
- McDonald DR, Brunden KR, Landreth GE.** Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide production in microglia. *J Neurosci* 1997; 17: 2284-2294
- McGeer PL, Kawamata T, Walker DG, Akiyama H, Tooyama I, McGeer EG.** Microglia in degenerative neurological disease. *Glia* 1993; 7: 84-92

- McGeer PL, McGeer E, Rogers J, Sibley J.** Anti-inflammatory drugs and Alzheimer disease. *Lancet* 1990; 335: 1037
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM.** 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* 1984; 34: 939-944
- Mendez MF, Martin RJ, Smyth KA, Whitehouse PJ.** Psychiatric symptoms associated with Alzheimer's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1990; 2: 28-33
- Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP, Falkow S.** Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 1976; 127: 1529-1537
- Michalopoulou M, Nikolaou C, Tavernarakis A, Alexandri NM, Rentzos M, Chatzipanagiotou S, Cambouri C, Vassilopoulos D.** Soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R) in cerebrospinal fluid of patients with inflammatory and non inflammatory neurological diseases. *Immunol Lett* 2005; 98: 171
- Mohs RC, Breitner JC, Silverman JM, Davis KL.** Alzheimer's disease. Morbid risk among first-degree relatives approximates 50% by 90 years of age. *Arch Gen Psychiatry.* 1987; 44: 405-408
- Morrone G, Ciliberto G, Oliviero S, Arcone R, Dente L, Content J, Cortese R.** Recombinant interleukin 6 regulates the transcriptional activation of a set of human acute phase genes. *J Biol Chem* 1988; 263: 12554-12558
- Mortimer JA, French LR, Hutton JT, Schuman LM.** Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease. *Neurology* 1985; 35: 264-267
- Mrak RE, Sheng JG, Griffin WS.** Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications. *Hum Pathol* 1995; 26: 816-823
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L.** A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1992; 1: 345-347
- Müllberg J, Schooltink H, Stoyan T, Günther M, Graeve L, Buse G, Mackiewicz A, Heinrich PC, Rose-John S.** The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol.* 1993a; 23: 473-480
- Müllberg J, Dittrich E, Graeve L, Gerhartz C, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T, Heinrich PC, Rose-John S.** Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor. *FEBS Lett* 1993b; 332: 174-178
- Müller-Newen G, Küster A, Hemmann U, Keul R, Horsten U, Martens A, Graeve L, Wijdenes J, Heinrich PC.** Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses. *J Immunol.* 1998; 161: 6347-6355
- Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, Taga T, Kishimoto T.** IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 1993; 260: 1808-1810
- Murakami-Mori K, Taga T, Kishimoto T, Nakamura S.** The soluble form of the IL-6 receptor (sIL-6R alpha) is a potent growth factor for AIDS-associated Kaposi's sarcoma (KS) cells; the soluble form of gp130 is antagonistic for sIL-6R alpha-induced AIDS-KS cell growth. *Int Immunol.* 1996; 8: 595-602

- Murray RE, McGuigan F, Grant SF, Reid DM, Ralston SH.** Polymorphisms of the interleukin-6 gene are associated with bone mineral density. *Bone* 1997; 21: 89-92
- Nakafuku M, Satoh T, Kaziro Y.** Differentiation factors, including nerve growth factor, fibroblast growth factor, and interleukin-6, induce an accumulation of an active ras. GTP complex in rat pheochromocytoma PC12 cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 19448-19454
- Narazaki M, Witthuhn BA, Yoshida K, Silvennoinen O, Yasukawa K, Ihle JN, Kishimoto T, Taga T.** Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2285-2289
- Nieto-Sampedro M.** Astrocyte mitogenic activity in aged normal and Alzheimer's human brain. *Neurobiol Aging* 1987; 8: 249-252
- Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Takahashi S, Okamoto T, Murayama Y, Ogata E.** Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G. *Nature* 1993; 362: 75-79
- Norris JG, Benveniste EN.** Interleukin-6 production by astrocytes: induction by the neurotransmitter norepinephrine. *J Neuroimmunol* 1993; 45: 137-145
- Oh JW, Van Wagoner NJ, Rose-John S, Benveniste EN.** Role of IL-6 and the soluble IL-6 receptor in inhibition of VCAM-1 gene expression. *J Immunol* 1998; 161: 4992-4999
- Oddo S, Caccamo A, Green KN, Liang K, Tran L, Chen Y, Leslie FM, LaFerla FM.** Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 3046-3051
- Paonessa G, Graziani R, De Serio A, Savino R, Ciapponi L, Lahm A, Salvati AL, Toniatti C, Ciliberto G.** Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling. *EMBO J* 1995; 14: 1942-1951
- Papassotiropoulos A, Bagli M, Jessen F, Bayer TA, Maier W, Rao ML, Heun R.** A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999; 45: 666-668
- Pappolla MA, Chyan YJ, Omar RA, Hsiao K, Perry G, Smith MA, Bozner P.** Evidence of oxidative stress and in vivo neurotoxicity of beta-amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies in vivo. *Am J Pathol* 1998; 152: 871-877
- Paradowski B, Celczyńska D, Dobosz T, Noga L.** Polymorphism 174 G/C of interleukin 6 gene in Alzheimer's disease--preliminary report. *Neurol Neurochir Pol* 2008; 42(4): 312-315
- Parihar MS, Hemnani T.** Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *J Clin Neurosci.* 2004; 11: 456-467
- Patterson MB, Schnell AH, Martin RJ, Mendez MF, Smyth KA, Whitehouse PJ.** Assessment of behavioral and affective symptoms in Alzheimer's disease. *Geriatr Psychiatry Neurol* 1990; 3: 21-30
- Poirier J.** Apolipoprotein E in the brain and its role in Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci* 1996; 21: 128-134
- Ponte P, Gonzalez-DeWhitt P, Schilling J, Miller J, Hsu D, Greenberg B, Davis K, Wallace W, Lieberburg I, Fuller F.** A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* 1988; 331: 525-527

- Popp J, Bacher M, Kölsch H, Noelker C, Deuster O, Dodel R, Jessen F.** Macrophage migration inhibitory factor in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res* 2009; 43: 749-753
- Premkumar DR, Cohen DL, Hedera P, Friedland RP, Kalaria RN.** Apolipoprotein E-epsilon4 alleles in cerebral amyloid angiopathy and cerebrovascular pathology associated with Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1996; 148: 2083-2095
- Price DL, Sisodia SS, Gandy SE.** Amyloid beta amyloidosis in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurol* 1995; 8: 268-274
- Pulkki K, Pelliniemi TT, Rajamaki A, Tienhaara A, Laakso M, Lahtinen R.** Soluble interleukin-6 receptor as a prognostic factor in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1996; 92: 370-374
- Ravaglia G, Paola F, Maioli F, Martelli M, Montesi F, Bastagli L, Bianchin M, Chiappelli M, Tumini E, Bolondi L, Licastro F.** Interleukin-1beta and interleukin-6 gene polymorphisms as risk factors for AD: a prospective study. *Exp Gerontol.* 2006; 41: 85-92
- Rebeck GW, Perls TT, West HL, Sodhi P, Lipsitz LA, Hyman BT.** Reduced apolipoprotein epsilon 4 allele frequency in the oldest old Alzheimer's patients and cognitively normal individuals. *Neurology* 1994; 44: 1513-1516
- Richartz E, Stransky E, Batra A, Simon P, Lewczuk P, Buchkremer G, Bartels M, Schott K.** Decline of immune responsiveness: a pathogenetic factor in Alzheimer's disease? *J Psychiatr Res* 2005; 39: 535-543
- Ringheim GE, Szczepanik AM, Petko W, Burgher KL, Zhu SZ, Chao CC.** Enhancement of beta-amyloid precursor protein transcription and expression by the soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 complex. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 55: 35-44
- Rocca WA, van Duijn CM, Clayton D, Chandra V, Fratiglioni L, Graves AB, Heyman A, Jorm AF, Kokmen E, Kondo K.** Maternal age and Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Int J Epidemiol* 1991; 20: 21-27
- Rocca WA, Hofman A, Brayne C, Breteler MM, Clarke M, Copeland JR, Dartigues JF, Engedal K, Hagnell O, Heeren TJ, Jonker C, Lindesay J, Lobo A, Mann AH, Mölsä PK, Morgan K, O'Connor DW, da Silva Droux A, Sulkava R, Kay DWK, Amaducci L.** Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group. *Ann Neurol* 1991; 30: 381-390
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T.** Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 1995; 376: 775-778
- Rogers JT, Leiter LM, McPhee J, Cahill CM, Zhan SS, Potter H, Nilsson LN.** Translation of the alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences. *J Biol Chem* 1999; 274: 6421-6431
- Rose-John S, Heinrich PC.** Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J* 1994; 300: 281-290
- Roses AD.** Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A rapidly expanding field with medical and epidemiological consequences. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 802: 50-57



- Roush W.** Protein studies try to puzzle out Alzheimer's tangles. *Science* 1995; 267: 793-794
- Rubio N.** Demonstration of the presence of an interleukin-1 receptor on the surface of murine astrocytes and its regulation by cytokines and Theiler's virus. *Immunology* 1994; 82: 178-183
- Sala G, Galimberti G, Canevari C, Raggi ME, Isella V, Facheris M, Appollonio I, Ferrarese C.** Peripheral cytokine release in Alzheimer patients: correlation with disease severity. *Neurobiol Aging*. 2003; 24: 909-914
- Salbaum JM, Weidemann A, Lemaire HG, Masters CL, Beyreuther K.** The promoter of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor gene. *EMBO J* 1988; 7: 2807-2813
- Salvati AL, Lahm A, Paonessa G, Ciliberto G, Toniatti C.** Interleukin-6 (IL-6) antagonism by soluble IL-6 receptor alpha mutated in the predicted gp130-binding interface. *J Biol Chem*. 1995; 270: 12242-12249
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DANN polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491
- Satoh T, Nakamura S, Taga T, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Kaziro Y.** Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 3546-3549
- Satoh T, Nakafuku M, Kaziro Y.** Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. *J Biol Chem* 1992; 267: 24149-24152
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ.** Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 1993; 43: 1467-1472
- Schellenberg GD.** Progress in Alzheimer's disease genetics. *Curr Opin Neurol* 1995; 8: 262-267
- Schneider JA, Gearing M, Robbins RS, de l'Aune W, Mirra SS.** Apolipoprotein E genotype in diverse neurodegenerative disorders. *Ann Neurol* 1995; 38: 131-135
- Schottky J.** Über präsenile Verblödungen. *Z Ges Neurol Psychiatr* 1932; 140: 373-395
- Schuitmaker A, Dik MG, Veerhuis R, Scheltens P, Schoonenboom NS, Hack CE, Blankenstein MA, Jonker C.** Inflammatory markers in AD and MCI patients with different biomarker profiles. *Neurobiol Aging*; 30: 1885-1889
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K.** Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*; 1995; 375: 754-760
- Shi J, Perry G, Smith MA, Friedland RP.** Vascular abnormalities: the insidious pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000; 21: 357-361
- Shibata N, Ohnuma T, Takahashi T, Baba H, Ishizuka T, Ohtsuka M, Ueki A, Nagao M, Arai H.** Effect of IL-6 polymorphism on risk of Alzheimer disease: genotype-phenotype association study in Japanese cases. *Am J Med Genet* 2002; 114: 436-439
- Shrikant P, Weber E, Jilling T, Benveniste EN.** Intercellular adhesion molecule-1 gene expression by glial cells. Differential mechanisms of inhibition by IL-10 and IL-6. *J Immunol* 1995; 155: 1489-1501

- St George-Hyslop PH.** Molecular genetics of Alzheimer disease. *Semin Neurol* 1999; 19: 371-383
- Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Barbieri G, Pellegrini S.** Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 1994; 263: 92-95
- Strauss S, Bauer J, Ganter U, Jonas U, Berger M, Volk B.** Detection of interleukin-6 and alpha 2-macroglobulin immunoreactivity in cortex and hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Lab Invest* 1992; 66: 223-230
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD.** Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 1977-1981
- Struble RG, Cork LC, Whitehouse PJ, Price DL.** Cholinergic innervation in neuritic plaques. *Science* 1982; 216: 413-415
- Stübner S, Schon T, Padberg F, Teipel SJ, Schwarz MJ, Haslinger A, Buch K, Dukoff R, Lasser R, Muller N, Sunderland T, Rapoport SI, Moller HJ, Hampel H.** Interleukin-6 and the soluble IL-6 receptor are decreased in cerebrospinal fluid of geriatric patients with major depression: no alteration of soluble gp130. *Neurosci Lett* 1999; 259: 145-148
- Sun YX, Minthon L, Wallmark A, Warkentin S, Blennow K, Janciauskiene S.** Inflammatory markers in matched plasma and cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2003; 16: 136-44
- Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T.** Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 1989; 58: 573-581
- Tanzi RE, McClatchey AI, Lamperti ED, Villa-Komaroff L, Gusella JF, Neve RL.** Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 1988; 331: 528-530
- Tedde A, Nacmias B, Ciantelli M, Forleo P, Cellini E, Bagnoli S, Piccini C, Caffarra P, Ghidoni E, Paganini M, Bracco L, Sorbi S.** Identification of new presenilin gene mutations in early-onset familial Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2003; 60: 1541-1544
- Tenhumberg S, Waetzig GH, Chalaris A, Rabe B, Seegert D, Scheller J, Rose-John S, Grötzinger J.** Structure-guided optimization of the interleukin-6 trans-signaling antagonist sgp130. *J Biol Chem.* 2008; 283: 27200-17207
- Trautwein C, Caelles C, van der Geer P, Hunter T, Karin M, Chojkier M.** Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. *Nature* 1993; 364: 544-547
- Tsuchiya Y, Hattori M, Hayashida K, Ishibashi H, Okubo H, Sakaki Y.** Sequence analysis of the putative regulatory region of rat alpha 2-macroglobulin gene. *Gene* 1987; 57: 73-80
- van Duijn CM, Hofman A, Nagelkerken L.** Serum levels of interleukin-6 are not elevated in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1990; 108: 350-354
- van Oijen M, Arp PP, de Jong FJ, Hofman A, Koudstaal PJ, Uitterlinden AG, Breteler MM.** Polymorphisms in the interleukin 6 and transforming growth factor beta1 gene and risk of dementia. The Rotterdam Study. *Neurosci Lett.* 2006; 402: 113-117

**van Wagoner NJ, Oh JW, Repovic P, Benveniste EN.** Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor. *J Neurosci* 1999; 19: 5236-5244

**Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M.** Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. 1999; 286: 735-741

**Vural P, Değirmencioğlu S, Parildar-Karpuzoğlu H, Doğru-Abbasoğlu S, Hanagasi HA, Karadağ B, Gürvit H, Emre M, Uysal M.** The combinations of TNFalpha-308 and IL-6 -174 or IL-10 -1082 genes polymorphisms suggest an association with susceptibility to sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 2009; 120: 396-401

**Wada-Isoe K, Wakutani Y, Urakami K, Nakashima K.** Elevated interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid of vascular dementia patients. *Acta Neurol Scand* 2004; 110: 124-127

**Ward LD, Howlett GJ, Discolo G, Yasukawa K, Hammacher A, Moritz RL, Simpson RJ.** High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *J Biol Chem* 1994; 269: 23286-23289

**Wei J, Xu H, Davies JL, Hemmings GP.** Increase of plasma IL-6 concentration with age in healthy subjects. *Life Sci* 1992; 51: 1953-1956

**Wood JA, Wood PL, Ryan R, Graff-Radford NR, Pilapil C, Robitaille Y, Quirion R.** Cytokine indices in Alzheimer's temporal cortex: no changes in mature IL-1 beta or IL-1RA but increases in the associated acute phase proteins IL-6, alpha 2-macroglobulin and C-reactive protein. *Brain Res* 1993; 629: 245-252

**Yamada K, Kono K, Umegaki H, Yamada K, Iguchi A, Fukatsu T, Nakashima N, Nishiwaki H, Shimada Y, Sugita Y.** Decreased interleukin-6 level in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer-type dementia. *Neurosci Lett* 1995; 186: 219-221

**Yamada M.** Cerebral amyloid angiopathy: an overview. *Neuropathology* 2000; 20: 8-22

**Zhang Y, Hayes A, Pritchard A, Thaker U, Haque MS, Lemmon H, Harris J, Cumming A, Lambert JC, Chartier-Harlin MC, St Clair D, Iwatsubo T, Mann DM, Lendon CL.** Interleukin-6 promoter polymorphism: risk and pathology of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2004; 362: 99-102

**Zhang Z, Nadeau P, Song W, Donoviel D, Yuan M, Bernstein A, Yankner BA.** Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat Cell Biol*. 2000; 2: 463-465

**Zlokovic BV, Martel CL, Mackic JB, Matsubara E, Wisniewski T, McComb JG, Frangione B, Ghiso J.** Brain uptake of circulating apolipoproteins J and E complexed to Alzheimer's amyloid beta. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 205: 1431-1437

## 9 Publikationen

**Bagli M, Papassotiropoulos A, Hampel H, Becker K, Jessen F, Bürger K, Ptok U, Rao ML, Möller HJ, Maier W, Heun R.** Polymorphisms of the gene encoding the inflammatory cytokine interleukin-6 determine the magnitude of the increase in soluble interleukin-6 receptor levels in Alzheimer's disease. Results of a pilot study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2003; 253: 44-48

**Majores M, Kölsch H, Bagli M, Ptok U, Kockler M, Becker K, Rao ML, Maier W, Heun R.** The insulin gene VNTR polymorphism in Alzheimer's disease: results of a pilot study. *J Neural Transm.* 2002; 109: 1029-1034

**Papassotiropoulos A, Bagli M, Becker K, Jessen F, Maier W, Rao ML, Ludwig M, Heun R.** No association between an intronic biallelic polymorphism of the FE65 gene and Alzheimer's disease. *Int J Mol Med.* 2000; 6: 587-589

## **10 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. F. Jessen, Herrn Prof. Dr. med. R. Heun und Frau Prof. Dr. rer. nat. M. L. Rao danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der notwendigen Arbeitsmittel und die Betreuung der Arbeit.

Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. M. Bagli und Herrn Dr. A. Papassotiropoulos für ihre Unterstützung und die vielen technischen und freundschaftlichen Ratschläge.

Des Weiteren danke ich den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Neurochemie Christine Frahnert, Katja Grasmäder, Heike Kölsch, Petra Lohmann, Michael Majores und Sandra Schmitz, die mir während der experimentellen Phase bei theoretischen Fragen sowie der praktischen Durchführung stets hilfreich und motiviert zur Seite standen.

Herrn Lorenzen vom Institut für Medizinische Statistik, Dokumentation und Datenverarbeitung danke ich sehr für die Überprüfung und Diskussion der statistischen Testverfahren.

Für die wertvollen Hinweise und aufmunternden Ratschläge insbesondere im Rahmen der Korrekturarbeiten danke ich ganz besonders Herrn Dr. med. S. Theurich.

Der Psychiatrischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die Rekrutierung von 27 Alzheimerpatienten und der großzügigen Bereitstellung der Proben.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen, dass sie mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und vertrauensvoll begleiteten.