

## 5. Diskussion

### 5.1 Optimierung der Methode zur NT-3-Quantifizierung

Ein Teil dieser Studie bestand darin, eine Methode zur NT-3-Quantifizierung zu entwickeln, die ähnlich genau und zuverlässig wie die bereits in unserem Labor etablierte und bewährte Methode zur NGF-Quantifizierung (Hellweg et al. 1989; Hellweg et al. 1992; Hellweg et al. 1996a). Als Grundlage dafür diente ein Kit der Firma Promega (NT-3 Emax™ ImmunoAssay System), der den Angaben des Herstellers zu Folge bereits eine hohe Sensitivität mit einer Nachweisgrenze von 10 pg/ml und eine hohe Spezifität besitzen soll.

Die bisher erreichten Sensitivitäten lagen in anderen Arbeitsgruppen bisher bei unteren Grenzen von 3-10 pg/ml (Katoh-Semba et al. 1996; Narisawa-Saito et al. 1996; Nitta et al. 1999; Durany et al. 2000; Hock et al. 2000a; Katoh-Semba et al. 2000; Shetty et al. 2003; Zhou et al. 2003) oder darüber (Murase et al. 1994; Thome et al. 1997). Wir konnten in unserem Labor die Nachweisgrenze so verbessern, dass wir in der Lage waren, NT-3-Mengen von weniger als 1 pg/ml bzw. pg/mg Feuchtgewicht zu messen. Dabei erreichten wir eine Recovery von durchschnittlich 70-90% und geringen Inter-Assay-Varianzen bezüglich der Standardkurven.

Der Vergleich unserer Messwerte mit denen anderer Arbeitsgruppen wurde durch die nur spärlich gesäten Daten zu NT-3-Konzentrationen an Ratten erschwert. Hier lagen wir aber in einem Bereich, den andere Studien auch erreichten (Murase et al. 1994; Katoh-Semba et al. 1996; Nitta et al. 1999; Shetty et al. 2003). Die Daten von NT-3-Konzentrationen, die an post-mortem Gehirnen von AD-Erkrankten erhoben wurden, lagen auch alle auf einem ähnlichen Niveau. So schwankten die Werte für z.B. den Hippocampus zwischen 111,8 pg/mg (Hock et al. 2000b) und 60 pg/mg (Durany et al. 2000), für den frontalen Cortex waren sie recht konstant um die 30 pg/mg (Thome et al. 1997; Durany et al. 2000; Hock et al. 2000b). Zu einen könnten diese Unterschiede durch verschiedene Methoden bei den Assays zu erklären sein, teilweise aber auch durch die unterschiedliche Art der Gewebeextraktion.

## 5.2 Ergebnisse der NT-3-Quantifizierung

Zusammenfassend lässt sich zu den NT-3-Konzentrationen sagen, dass sich weder im frontalen oder dem occipitalen Cortex noch dem Hippocampus der untersuchten Gewebe der hemizygoten Tiere, die modellhaft die AD widerspiegeln sollen, auffällige oder statistisch signifikante Änderungen der Konzentrationen beobachten ließen; diese Regionen sind im Rahmen der AD früh und regelmäßig geschädigt und zeigen Auffälligkeiten in der Konzentrationen anderer Neurotrophine wie NGF und BDNF (Übersicht bei Siegel und Chauhan 2000).

Der statistisch signifikante Anstieg der Konzentrationen im Septum der Kontrolltiere bei gleichzeitig konstanten Werten bei den transgenen Tieren könnte durch einen im Alter physiologisch bedingten Anstieg der Konzentrationen von NT-3 im Septum im Sinne einer Schutzfunktion für das cholinerge System des basalen Vorderhirns erklärt werden, die im Rahmen der AD ausbleibt. Diese Veränderung ist so vorher noch nicht beobachtet worden (Narisawa-Saito und Nawa 1996).

Auch ist der bei den hemizygoten Tieren beobachtete Abfall der Konzentration im Nervus Ischiadicus bei gleich bleibenden Konzentrationen in der Kontrollgruppe nicht erklärbar und auch so vorher nicht beobachtet worden. Man könnte spekulieren, dass im Rahmen der AD eventuell der retrograde Transport von NT-3 auch im PNS gestört ist. Dies ist bis jetzt aber noch nicht beobachtet worden.

Die relativ konstanten Konzentrationen beim Vergleich der Kontrolltiere mit den transgenen Tieren stimmen mit den Ergebnissen der meisten anderen Arbeitsgruppen überein, die im Tierversuch oder post-mortem an Gehirnen an AD Erkrankter Messungen durchgeführt haben (Phillips et al. 1991; Murase et al. 1994; Durany et al. 2000; Hock et al. 2000a; Übersicht bei Siegel und Chauhan 2000; Shetty et al. 2003). Eine Studie zeigte signifikante Konzentrationsänderungen im Motorcortex, einer Region, die bei der AD in der Regel am besten erhalten ist, in den sonst von der AD betroffenen Regionen des ZNS fanden sich auch hier keine signifikanten Konzentrationsunterschiede (Narisawa-Saito et al. 1996).

In den unter 5.3.6 genauer erklärten Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Neurotrophinen und A $\beta$ -Amyloid-Ablagerung konnte kein Zusammenhang zwischen NT-3-Konzentration und Plaquebildung gefunden werden.

Wir haben also keine Anhaltspunkte dafür gefunden, dass Konzentrationsveränderungen von NT-3 im Rahmen der Entstehung der AD im Sinne einer Änderung der Funktion des cholinergen Systems eine tragende Rolle spielen. Trotzdem kann dieser Einfluss nicht ausgeschlossen werden, da in anderen Studien Hinweise darauf gefunden, dass NT-3 das Überleben cholinergener Neurone fördert und die Aktivität der ChAT verstärkt (Friedman et al. 1993; Ip et al. 1993a). Allerdings haben wiederum andere Studien diese Effekte nicht bestätigt (Nonomura et al. 1995) und auch keine Schutzwirkung auf Nucleus basalis magnocellularis feststellen können (Skup et al. 1994).

Für NT-3 konnte gezeigt werden, dass es einen protektiven Effekt auf die zentralen noradrenergen Neurone des Locus Coeruleus ausübt. Im Rahmen der AD werden neben den cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns auch Neurone des serotoninergeren und dieses noradrenergen Systems in Mitleidenschaft gezogen (Arenas und Persson 1994).

### 5.3 Ergebnisse der NGF-Quantifizierung

Bei der NGF-Quantifizierung fanden wir statistisch signifikante Erhöhungen der NGF-Konzentration im Laufe des Alterungsprozesses bei den transgenen Tieren, nicht jedoch bei den Tieren der Kontrollgruppe. Dabei stiegen im frontalen Cortex die Konzentrationen von den jungen zu alten Tieren um 72% und von den mittelalten zu den alten Tieren um 98%. Ähnliche Ergebnisse fanden sich im occipitalen Cortex, hier war ein Anstieg von jung zu alt um 66% und von mittelalt zu alt um 94% zu beobachten. In beiden Hirnarealen war auch ein leichter Abfall der Konzentration von jung zu alt bei den transgenen Tieren zu beobachten, dieser erreichte jedoch kein statistisch signifikantes Niveau.

Damit verdeutlichen diese Ergebnisse den Einfluss, den das Alter bei der Entwicklung der AD spielt, da der Alterseffekt gerade bei den von den pathophysiologischen Vorgängen betroffenen transgenen Tieren deutlicher wird als bei der Kontrollgruppe, bei der außer dem Alterungsprozess nicht noch ein zweiter pathophysiologischer Faktor potenzierend hinzukommt. Wir beobachteten keine NGF-Änderung bei den wildtypen Kontrolltieren. Die meisten bisherigen Studien lieferten hier kein einheitliches Bild zu NGF und NGF-mRNA-Änderungen im Rattencortex und -hippocampus im Laufe des Alterungsprozesses: einige zeigten keine Änderungen im Cortex (Hellweg und Raivich 1994; Hellweg et al. 1996b; Narisawa-Saito und Nawa 1996), bei anderen war eher ein Absinken der NGF-Konzentration im Cortex bei konstanten Levels im Hippocampus, Cerebellum und Bulbus Olfactorius zu sehen (Kato-Semba et al. 1998b), wieder andere zeigten gestiegene NGF-Konzentrationen (Hellweg et al. 1990; Hock 1991; Hellweg et al. 1992; Übersicht bei Scott und Crutcher 1994; Hellweg et al. 1997). Dabei können die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Neurotrophin-Konzentrationen bei AD-Patienten auch durch einen variablen zeitlichen Verlauf der Konzentrationen in Abhängigkeit des Krankheitsstadiums der neurodegenerativen Erkrankung und durch die Neurotrophin-Quantifizierungen zu verschiedenen Zeitpunkten während der AD zurückzuführen und erklärbar sein.

Unsere Beobachtungen mit erhöhten Konzentrationen von NGF im frontalen und cerebralen Cortex im Rahmen einer AD decken sich gut mit den meisten, bisher durchgeführten Studien (Hellweg et al. 1988; Hellweg et al. 1990; Crutcher et al. 1993; Scott et al. 1995; Fahnstock

et al. 1996; Narisawa-Saito et al. 1996; Hellweg et al. 1998a; Hock et al. 2000a; Übersicht bei Siegel und Chauhan 2000).

Die statistisch signifikante Erhöhung der NGF-Konzentration im Septum bei den alten Kontrolltieren, die interessanterweise so auch bei der NT-3-Quantifizierung zu beobachten war, spricht eventuell für eine gesteigerte Aktivierung des cholinergen Systems im Laufe des Alterungsprozesses. Zudem ist das Septum auch zu lokaler NGF-Produktion in der Lage, wie Untersuchungen zu NGF-mRNA ergaben (Senut et al. 1990).

Im Nervus Ischiadicus wurde ein statistisch signifikanter Abfall der NGF-Konzentrationen sowohl bei den transgenen als auch bei den Kontrolltieren gefunden. In gesunden Nerven wurden solche sinkenden Konzentrationen bisher noch nicht beobachtet, aber in Versuchen mit diabetischen Ratten und konsekutiver diabetischer Neuropathie wurde ein Abfall der NGF-Konzentration im Nervus Ischiadicus erstmals nach drei Wochen beobachtet, nach 6 Monaten lag die Konzentration bei 55% der Kontrollen (Hellweg und Hartung 1990). Ähnliche Ergebnisse erbrachten auch andere Studien (Hellweg et al. 1991; Hanaoka et al. 1992; 1994; Hellweg et al. 1994; Garrett et al. 1996; Garrett et al. 1997).

### **5.3.1 NGF-Erhöhung durch gestörten retrograden Transport?**

Wie bereits oben erwähnt, beobachteten wir, dass im frontalen Cortex die Konzentrationen von jungen zu alten Tieren um 72% und von mittelalten zu alten Tieren um 98% stiegen. Ähnliche Ergebnisse fanden sich im occipitalen Cortex, hier war ein Anstieg von jung zu alt um 66% und von mittelalt zu alt um 94% zu beobachten. Bei Betrachtung der Werte der Kontrollgruppe waren keine statistisch signifikanten Konzentrationsänderungen festzustellen. Auch im Vergleich der Genotypen waren dabei die im Bereich des frontalen und occipitalen Cortex der transgenen Tiere verzeichneten NGF-Konzentrationen bei den Alttieren signifikant höher.

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der frontale Cortex bezüglich des cholinergen Systems eine Hauptzielregion darstellt und im Rahmen der Krankheitsentwicklung bei den transgenen Tieren, die den Verlauf einer AD modellhaft widerspiegeln, hauptsächlich in Mitleidenschaft gezogen wird. Weiterhin könnte auch ein gestörter Abtransport von NGF im

Sinne eines verminderten retrograden axonalen Transportes eine Ursache der NGF-Konzentrationserhöhung darstellen. So stellt der frontale Cortex ein Zielgewebe der cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns dar und ist Ursprung des retrograden Neurotrophintransportes von NGF zu den cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns. Er interagiert darüber mit dem parietalen, cingularen, infralimbischen, orbitalen, perilimbischen und occipitalen Cortexbereich sowie dem kontralateralen frontalen Cortex, diagonalen Band von Broca, Thalamus, Nucleus basalis, Hypothalamus und Locus coeruleus (Übersichten bei Altar und DiStefano 1998; Mufson et al. 1999; Siegel und Chauhan 2000). Bei Störungen des Abtransportes von NGF im Sinne einer gestörten Interaktion würde sich somit eine Erhöhung der Neurotrophinkonzentration im cholinergen Zielgebiet ergeben.

Für die Konzentrationserhöhungen im Bereich des occipitalen Cortex gilt das gleiche wie für den frontalen Cortex, der occipitale Cortex stellt dabei aber beispielsweise ein Zielgebiet der neurotrophen Effekte ausgehend von den temporalen, entorhinalen und frontalen corticalen Arealen dar, ebenso wie vom Thalamus und Hypothalamus (Übersichten bei Altar und DiStefano 1998; Mufson et al. 1999; Siegel und Chauhan 2000).

Beim Vergleich der jungen transgenen Tiere mit den mittelalten ließ sich ein leichter Abfall der Konzentrationen im frontalen und occipitalen Cortex erkennen, der jedoch nicht statistisch signifikant war. Somit ließen sich keine Anhaltspunkte für einen zu Beginn der AD auftretenden Mangel im Sinne der Neurotrophin-Mangel-Hypothese an NGF finden, wie er nach anderen Studien hypothetisiert worden war (Hellweg et al. 1998a; Hellweg et al. 1998b; Übersicht bei Siegel und Chauhan 2000).

Darüber hinaus wurde in einer Studie gezeigt, dass die Konzentration von (pro-)NGF im parietalen Cortex verstorbener Menschen sowohl bereits in frühen Stadien einer Demenz (MCI und milde Form der AD) erhöht ist (Peng et al. 2004) als auch im Endstadium der AD (Fahnestock et al. 2001). Dies spricht ebenfalls gegen die oben erwähnte Neurotrophin-Mangel-Hypothese.

Für gesteigerte NGF-Konzentrationen durch gestörten retrograden Transport spricht auch, dass für die NGF-mRNA übereinstimmend normale Werte im Alzheimer-Gehirn beschrieben wurden (Goedert et al. 1986; Phillips et al. 1991; Jette et al. 1994; Fahnestock et al. 1996).

Im Rahmen der Hypothese, dass gestörter retrograder Transport von NGF für steigende Konzentrationen im Cortex verantwortlich sein könnte, muss auch der Hippocampus betrachtet werden. Der Hippocampus stellt hinsichtlich des retrograden Transports eine

Zielregion mit Interaktion zu ipsi- und contralateralen hippocampalen Bereichen, dem medialen Septum, Teilen des diagonalen Bandes von Broca und dem Nucleus supramammillaris dar. Allerdings waren hier in unseren Messungen keine statistisch signifikanten Unterschiede in den NGF-Konzentrationen festzustellen, wie sie vielleicht bei einem gestörten retrograden Transport zu erwarten gewesen wären. Andere Arbeitsgruppen hatten hier bei Alzheimer-Patienten ebenfalls keine veränderten (Allen et al. 1991; Murase et al. 1993b) oder signifikant erhöhte NGF-Konzentrationen festgestellt (Crutcher et al. 1993; Scott et al. 1995; Narisawa-Saito et al. 1996; Hock et al. 2000a). In anderen Studien mit Ratten ergaben sich ebenfalls keine Konzentrationsänderungen (Hellweg et al. 1988; Hellweg et al. 1990; Hock 1991; Lindner et al. 1994) oder erhöhte Konzentrationen im Hippocampus (Cooper et al. 2001).

Wie bereit oben erwähnt, wurde auch im Nervus Ischiadicus ein statistisch signifikanter Abfall der NGF-Konzentrationen bei simultaner Betrachtung der drei Altersgruppen sowohl bei den transgenen als auch bei den Kontrolltieren gefunden. Beim paarweisen Vergleich der der jungen mit den alten Tieren war der Abfall bei den transgenen Tieren statistisch signifikant, bei den Kontrolltieren gerade nicht mehr. Hier scheint eher ein altersabhängiger Effekt als ein durch die AD ausgelöster Effekt vorzuliegen, zumal im Rahmen der AD keine Schädigung peripherer Nerven beschrieben ist.

### **5.3.2 NGF-Erhöhung durch Gliazellen?**

Statistisch signifikante Erhöhungen der NGF-Konzentration der transgenen Tiere im frontalen und occipitalen Cortex ergaben sich bei simultaner Betrachtung der drei Altersgruppen, bei paarweisen Vergleich der Alttiere und beim Vergleich der transgenen jungen bzw. mittelalten Tiere mit den Alttieren.

Eine interessante Erklärungsmöglichkeit liefert die Beobachtung, dass aktivierte Gliazellen dazu in der Lage sind, neben TrkA-Rezeptoren auch NGF auszuschütten (Furukawa und Furukawa 1990; Bacia et al. 1992; Oderfeld-Nowak et al. 1992; Murase et al. 1993a; Oderfeld-Nowak und Bacia 1994; Strauss et al. 1994; Arendt et al. 1995). Auch konnten Astrozytome und Glioblastome so stimuliert werden, dass sie große Mengen an NGF

ausschütteten (Emmett et al. 1997). So könnten die erhöhten NGF-Konzentrationen im Cortex zum einen durch gesteigerte Produktion in Gliazellen im Rahmen einer reaktiven Gliose auf die neuropathologischen Veränderungen zustande kommen (Übersicht bei Scott und Crutcher 1994).

Außerdem induzieren inflammatorische Signale wie Zytokine und Komplementfaktoren und A $\beta$ 25-35 die mikrogliale NGF-Produktion (Kossmann et al. 1996; Heese et al. 1998), und es wurden NGF und TrkA in reaktiven Astrozyten bei einigen Gehirnerkrankungen und Entzündungen gefunden (Connor et al. 1996; Aguado et al. 1998; Wang et al. 1998). Da Gliazellen dazu in der Lage sind, NGF zu produzieren, scheint es denkbar, dass NGF als auto- oder parakriner Faktor an TrkA-exprimierenden Gliazellen wirkt (Aguado et al. 1998). Im Rahmen der bei der AD zunehmenden Plaquedichte und damit Zunahme von aktivierten Gliazellen könnte eine Kumulation von NGF auftreten, die unsere erhöhten Konzentrationen von NGF im Cortex erklären könnte.

Man geht davon aus, dass die Akkumulation von A $\beta$ -Peptiden im Rahmen der AD zur Aktivierung von Gliazellen im ZNS führt, wobei diese Aktivierung eine neurotoxische Wirkung zu haben scheint (Yankner et al. 1990; Fusco et al. 1993; Smits et al. 2000; Minagar et al. 2002). Chronische Aktivierung von Gliazellen könnte über auto- und parakrine Effekte und über Mediatoren die Neurodegeneration weiter vorantreiben; hierbei könnte die NGF-Ausschüttung der Gliazellen eine Rolle spielen.

Allerdings wurden in den meisten Studien im Rahmen der AD erniedrigte TrkA-Konzentrationen gemessen wurden (Mufson et al. 1996; Boissiere et al. 1997b; Mufson et al. 1997; Hock et al. 2000b; Salehi et al. 2004), folglich scheint der die Konzentration der TrkA-Rezeptoren nicht durch Ausschüttung aus Gliazellen beeinflusst zu werden.

### **5.3.3 NGF-Erhöhung als Rettungsversuch?**

Die in dieser wie auch in anderen Studien gefundenen erhöhten Konzentrationen von NGF im Cortex von AD-Erkrankten (Crutcher et al. 1993; Scott et al. 1995; Fahnstock et al. 1996; Narisawa-Saito et al. 1996; Hellweg et al. 1998a; Hock et al. 2000a; Übersicht bei Siegel und Chauhan 2000) lassen auch die Überlegung zu, ob diese Konzentrationserhöhungen im Sinne



eines Kompensations- bzw. Rettungsversuches zum Erhalt der Hirnfunktion, besonders des bei der AD betroffenen cholinergen Systems, zu sehen sind.

So fand man, dass sich nach Läsion der septo-hippocampalen Bahn und nachfolgender Beeinträchtigung des cholinergen Systems mit ansteigender NGF- und NGF-mRNA-Konzentration das cholinerge Defizit verbesserte (Hellweg et al. 1997). Dies lässt vermuten, dass die traumatisch induzierte Steigerung der NGF-Konzentration ein Versuch ist, den Defekt im cholinergen basalen Vorderhirn zu reparieren (Gwag et al. 1994; Shaughnessy und Barone 1997). Wie unter 1.6 ausführlich erläutert, ist NGF in der Lage, die cholinergen Neurone des basalen Vorderhirns zu schützen.

#### **5.3.4 Negative Effekte der NGF-Erhöhung?**

Mittlerweile gibt es Hinweise, dass die Erhöhung von NGF-Konzentrationen im ZNS auch zum Fortschreiten der AD beitragen oder sogar beschleunigen kann (Hellweg et al. 1998b).

Als zentrales Geschehen der AD wird von vielen Autoren die „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ angesehen, der zufolge die APP- und Präsenilin-Mutationen zu molekularen Effekten führen, die wiederum zu einer zerebralen Akkumulation von unlöslichen A $\beta$ -Proteinen führen und so neuronale Dysfunktionen und schließlich Zelluntergänge zur Folge haben (Hardy 1997).

In *in-vitro* Studien wurde gezeigt, dass NGF die Neurotoxizität von A $\beta$ -Amyloid um den Faktor  $10^5$  in hippocampalen Neuronen erhöht (Yankner et al. 1990), allerdings wurden hier nicht-physiologische Konzentrationen von NGF appliziert.

Weitere Studien zeigen den Einfluss von NGF auf die Amyloid-Verstoffwechslung. So stimuliert NGF in neuronalen Zellkulturen (PC12-Zellen) die basale Promotor-Aktivität des  $\beta$ -APP-Genes (Lahiri und Nall 1995) sowie die Sekretion von Proteinaseinhibitor-haltigen APP-Subtypen (Robakis et al. 1991). Ebenfalls wurde entdeckt, dass NGF in hippocampalen Explantaten aus Mausembryonen eine Sekretion von APP bewirkt (Clarris et al. 1994). Zu einer vermehrten NGF-Produktion kann auch die Tatsache beitragen, dass nach neuronalem Zelltod eine reaktive Gliose folgt und im Hippocampus die APP-Expression stimuliert wird (Palacios et al. 1995), ähnliches wurde nach Läsion des Nucleus basalis Meynert beobachtet,

hier folgte auf erhöhte NGF-Konzentrationen in cholinergen Zielregionen eine vermehrte APP-Synthese im Cortex der Ratte (Wallace et al. 1991).

Des Weiteren führt *in vitro* die Zugabe von A $\beta$  bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen zu einer ausgeprägten Expression von p75-Rezeptoren auf hippocampalen Neuronen (Yankner et al. 1990), dies potenziert wiederum die Toxizität von A $\beta$  auf neuronale Zellkulturen (PC12-Zellen) in Abwesenheit von NGF (Rabizadeh et al. 1994). Durch Zugabe von NGF kann dieser Effekt einerseits abgeschwächt werden, andererseits führt die Zugabe von NGF auf den TrkA-Rezeptor exprimierenden PC12-Zellmutanten zu einer Verstärkung der Amyloidtoxizität (Rabizadeh et al. 1994).

Neben cholinergen Neuronen im Striatum und einigen meist nicht-cholinergen Neuronen des Thalamus und Hirnstamms exprimieren die cholinergen Neurone des basalen Vorderhirns als einzige im ZNS den TrkA-Rezeptor, außerdem haben sie die im ZNS höchste Dichte an p75-Rezeptoren. Auch exprimieren die anderen cholinergen Systeme des ZNS weder den p75-Rezeptor noch degenerieren sie bei der AD (Woolf et al. 1989a; Woolf et al. 1989b). Bei der AD ist die p75-Expression im ZNS selektiv erhöht, während die Produktion des für die neurotrophe Wirkung von NGF wichtigen TrkA-Rezeptors in cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns offenbar erniedrigt ist (Hellweg et al. 1998a; Hellweg et al. 1998b). Man kann also vermuten, dass die erhöhten NGF-Konzentrationen im Cortex mit fortschreitender  $\beta$ -Amyloid-Ablagerung über den p75-Rezeptor den degenerativen Prozess stützt.

Zusätzlich fand man heraus, dass Verlust von Trk-Rezeptoren, wie sie im Rahmen der AD vorzukommen scheint (Mufson et al. 1996; Salehi et al. 1996; Boissiere et al. 1997a; Boissiere et al. 1997b; Mufson et al. 1997; Hock et al. 1998), und konsekutives Überwiegen der vermehrt gebildeten p75-Rezeptoren pro-apoptisch wirken (Bredesen und Rabizadeh 1997). So bleibt die normalerweise Apoptose-verhindernde Wirkung der Costimulation von p75- und TrkA-Rezeptor durch NGF an den degenerierenden Neuronen aus, stattdessen kommt es zur Apoptose.

### **5.3.5 Erniedrigte NGF-Konzentrationen zu Beginn der AD?**

Unter anderem fragten wir uns, ob für den Funktionsverlust der Neurone des basalen Vorderhirns im Laufe der AD ein zumindest temporärer Neurotrophinmangel ursächlich sein könnte. Diese Frage kam auf, als man in einer Studie feststellte, dass im Cortex nicht-dementer Patienten mit Plaque-Bildung eine niedrigere NGF-Konzentration gefunden wurde als bei Patienten ohne Plaque-Bildung. Unter der Annahme, dass diese Plaques präklinische Fälle einer AD darstellen, könnte ein NGF-Mangel auch an der Entstehung einer AD beteiligt sein (so genannte Neurotrophin-Mangel-Hypothese) (Hellweg et al. 1998a; Hellweg et al. 1998b). Diese Beobachtungen konnten wir in unserem Tiermodell zur AD nicht machen, die geringen Abfälle der Konzentrationen im Cortex von den jungen zu den mittelalten Tieren erreichten kein statistisch signifikantes Niveau. Die oben gemachten Beobachtungen erfolgten an post-mortem untersuchten Gehirnen, allerdings kann man nicht mit Sicherheit sagen, dass diese nicht-dementen Patienten mit  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen später wirklich einmal eine AD entwickelt hätten. Auch spiegelt auch das von uns verwendete Modell zur AD mit APP23-Mäusen nicht vollständig eine AD wieder. Es ist zwar ein sehr gutes Modell, deckt aber auch nur einen Teil der Pathophysiologie der AD ab (Übersicht bei Hsiao 1998a).

Auch zeigen neuere Studien an post-mortem Gehirnen von Menschen bereits in frühen Phasen (MCI und milde Form der AD) einer Demenz gestiegene Konzentrationen von (pro-)NGF im Cortex (Peng et al. 2004).

### **5.3.6 Korrelation zwischen Plaqueentwicklung und NGF-Erhöhung?**

Die in unserer Studie untersuchten Gehirnregionen weisen zu einem unterschiedlichen Grad histopathologische Veränderungen bei der AD auf. So entwickelt gerade der hippocampale Bereich neben dem entorhinalen Cortex schon im Frühstadium der AD neurofibrilläre Tangles, und im corticalen Bereich können der frontale und der parietale Cortex frühzeitige Amyloidablagerungen verzeichnen. Das Cerebellum ist normalerweise nicht betroffen und kann als Kontrollregion, d.h. als Hirnregion ohne AD-typische neuropathologische

Veränderungen, gewertet werden (Abramowski und Staufenbiel, Novartis Pharma AG 2000, Ergebnisse für NGF und NT-3 bisher unveröffentlicht, für BDNF siehe Burbach et al. 2004). Entsprechend zeigte das Cerebellum bei unseren Untersuchungen auch keine wesentlichen Unterschiede in den Neurotrophin-Konzentrationen, während gerade im Bereich des frontalen und occipitalen Cortex bei den transgenen Tieren deutliche NGF-Konzentrationsanstiege im Vergleich mit den Kontrolltieren zu beobachten waren. Dies deutet erneut darauf hin, dass es sich um krankheitsspezifische Veränderungen in diesen bestimmten Regionen handelt, die zu den beobachteten NGF-Konzentrationsveränderungen führen bzw. diese Veränderungen in den Krankheitsprozess involviert sind. Es handelt sich bei den gemachten Beobachtungen eben nicht um eine unspezifische das gesamte ZNS uniform betreffende Reaktion. In diesem Zusammenhang untersuchte die Arbeitsgruppe um Abramowski und Staufenbiel die möglichen Korrelationen zwischen Plaque-Entwicklung und NGF-Konzentrationserhöhungen. Im Western-Blot erfolgte der Nachweis von A $\beta$ -Amyloid (A $\beta$ 1-40 und A $\beta$ 1-42) in den Hirnarealen unserer transgenen Tiere. Die Plaques bildeten sich zunächst im fronto-parietalen Cortex, dann im parietalen und olfaktorischen Cortexbereich. Später zeigten sich auch Plaquesbildung im Subiculum und Hippocampus, dem occipitalen Cortex und dem Bulbus olfactorius, während das Septum und das Striatum zu den am letzten betroffenen Regionen zählten. Mittels Systat-Software und der Pearson-Korrelationsanalyse wurden dann die Daten analysiert. Bei gemeinsamer Betrachtung der 10,5 und 20 Monate alten Tiere fanden sich signifikante positive Korrelationen zwischen A $\beta$ 1-40- sowie A $\beta$ 1-42-Amyloid und NGF im Bereich des frontalen und occipitalen Cortex. Diese positiven Korrelationen zwischen A $\beta$ -Protein und NGF könnten als erste Hinweise gedeutet werden, dass die A $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen zu höheren NGF-Konzentrationen führen oder aber umgekehrt eine NGF-Erhöhung die Plaquesbildung begünstigen könnte.

### **5.3.7 Therapeutischer Einsatz der Neurotrophine im Rahmen der AD?**

Erste Behandlungsversuche der AD erfolgten mit nicht-steroidalen Antiphlogistika (McGeer et al. 1996; Stewart et al. 1997), da im Rahmen der Krankheitsentwicklung Amyloid-Plaques und Mikroglia im Bereich der Plaques (Phinney et al. 1999) beschrieben wurden, die über

Entzündungsprozesse die Neurodegeneration vorantreiben könnten (Stalder et al. 1999). Aber auch bei dieser Behandlung der AD wollte sich ein Erfolg nicht einstellen.

Da im Rahmen der AD die cholinergen Neurone des basalen Vorderhirns früh und regelmäßig degenerieren und es so zu den bekannten kognitiven Ausfällen kommt (Coyle et al. 1983), ist die Korrigierung der Defizite des cholinergen Systems einer der Behandlungsschwerpunkte (Nabeshima und Yamada 2000).

Dabei sind besonders die Neurotrophine, hier vor allem NGF, in den Vordergrund gerückt, da vermutet wird, dass ein Mangel an NGF für das Versagen der cholinergen Neurone des basalen Vorderhirns ursächlich sein könnte (Appel 1981; Hefti 1983). Folglich werden die Neurotrophine als mögliche Therapeutika in Betracht gezogen (Dragunow et al. 1997; Hefti 1997).

So ließen sich im Läsions-Tiermodell durch therapeutische Gabe von NGF die Atrophie bzw. der Untergang NGF-sensitiver Neurone verhindern. Neben anderen neurodegenerativen Erkrankungen hofft man, so eventuell auch die AD therapeutisch beeinflussen zu können (Tuszynski und Gage 1990; Hellweg 1992; Vantini 1992; Lindsay et al. 1993; Barinaga 1994; Hefti 1994; Lindsay 1994; Ibanez 1995; Yuen und Mobley 1995; Koliatsos 1996).

Die retrograde Degeneration des Nucleus septi medialis im ZNS nach Durchtrennung der septo-hippocampalen cholinergen Fasern kann durch gleichzeitige NGF-Behandlung verhindert werden (Hefti 1986; Williams et al. 1986; Williams et al. 1989; Hagg und Varon 1993; Emmett et al. 1995; Williams et al. 1996). Auch kann sowohl bei alten Ratten (Fischer et al. 1987; Fischer et al. 1991) als auch bei experimentell lädierten Primaten (Koliatsos et al. 1990; Tuszynski et al. 1990; Koliatsos et al. 1991) eine Atrophie cholinergischer Neurone im basalen Vorderhirn durch intracerebroventrikulär NGF-Infusion gebessert werden. Die cholinergen Neurone des basalen Vorderhirns scheinen auch noch im Alter durch NGF beeinflussbar zu sein; dafür sprechen mehrere Studien (Übersichten bei Vantini 1992; Scott und Crutcher 1994).

Ebenfalls interessant ist, dass *in-vitro*-Untersuchungen für Neurotrophine stimulierende Wirkungen auf den Energiestoffwechsel cerebraler Neurone zeigten (Knusel und Gao 1996). Dieses zusätzliche Potential von Neurotrophinen könnte ebenfalls für die Therapie der AD von großem Interesse sein, da eine Reihe von experimentellen und klinischen Befunden auf hypometabolische Prozesse bei der AD hinweisen (Landin et al. 1993).

In Tierversuchen hat sich gezeigt, dass NGF insbesondere bei Läsionen des septo-hippocampalen Systems sehr gut wirksam ist (Emmett et al. 1995; Janis et al. 1995; Williams et al. 1996). Somit ist NGF weiterhin der vielversprechendste neurotrophe Therapieansatz bei der AD (Olson 1993; Hefti 1994).

Probleme hierbei sind unter anderem, dass alterbedingte Unterschiede im Ansprechen auf NGF bestehen können (Rylett und Williams 1994), die Besserung nur vorübergehend ist (Santucci et al. 1995) oder nur unter ganz bestimmten Bedingungen Effekte auftraten (Lapchak et al. 1992).

Auch ist die Applikationsform der Neurotrophine schwierig, eine orale Einnahme ist aufgrund der schlechten Passierbarkeit der Blut-Hirn-Schranke nicht möglich; so bleibt nur die direkte intracerebrale Infusion (Übersicht bei Kordower et al. 1993), neuerdings die Neurotrophinbindung an Carrier-Partikel oder neurotrophinenthaltende und diese langsam freisetzende Implantate aus Polymeren (Übersicht bei Nabeshima und Yamada 2000).

Auch könnten eine Gentherapie (Übersicht bei Blesch et al. 1998) oder der Versuch der Neurotrophinsyntheseregulation über Interleukine (Lapchak 1993) oder Hormone (Katoh-Semba et al. 1998a) erfolgversprechendere Behandlungswege der Zukunft darstellen, ebenso wie der Neurotrophinersatz durch an Neurotrophinrezeptoren bindende Peptide oder Regulationen des Neurotrophinsignalweges über Stimulierung der Tyrosinkinase durch Liganden ohne direktes Angreifen an den Neurotrophinrezeptor (Übersicht bei Nabeshima und Yamada 2000).

Eine auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit interessante Behandlungsstrategie ist die Immunisation von APP-überexprimierenden Mäusen mit Amyloid- $\beta$ 42-Peptid. Hier wurde im Alter von 6 Wochen, noch bevor diese Tiere typische Veränderungen der AD wie Amyloid-Plaques aufwiesen, sowie im Alter von 11 Monaten, einem Zeitpunkt bei dem bei dieser Mausreihe bereits histopathologische Veränderungen beobachtet wurden, mit Amyloid- $\beta$ 42-Peptid geimpft. Tatsächlich zeigten sich bei den frühzeitig geimpften Tieren im Vergleich zur Kontrollpopulation eine deutlich geringere Bildung von Amyloid-Plaques, weniger neuritische Dystrophien und geringere Astrogliosebildung, bei den zu einem späteren Zeitpunkt geimpften Tieren zumindest eine geringere Ausdehnung und ein langsames Fortschreiten der neuropathologischen Veränderungen (Schenk et al. 1999). Spätere Untersuchungen im cerebralen Bereich zeigten um ca. 50% reduzierte Amyloidplaquesablagerungen vom kompakten Typ und geringere kognitive

Beeinträchtigungen bzw. Verhaltensauffälligkeiten (Janus et al. 2000). Eine Abnahme der Lern- und Erinnerungsfähigkeit bei transgenen APP-Mäusen durch mehrfache Amyloid- $\beta$ -Immunisierung konnte in einer weiteren Studie verhindert werden (Morgan et al. 2000), ähnliche Therapieerfolge zeigten Behandlungsversuche mit peripher verabreichten und die Blut-Hirn-Schranke überwindenden Antikörpern gegenüber Amyloid- $\beta$ -Peptid, bei denen sogar eine Reduktion existierender Amyloid-Plaques beobachtet werden konnte (Bard et al. 2000). Nach diesen und weiteren Studien ergaben sich nun mehrere Vermutungen, wie der Abbau der Plaques zu erklären ist: eine Möglichkeit ist die Aktivierung von Mikroglia und dadurch erfolgende Reduktion der Plaques (Bard et al. 2000), eine weitere direkter, antikörpervermittelter Abbau (Solomon et al. 1997; Bacskai et al. 2002; Das et al. 2003) und eine dritte schließlich die periphere Elimination von löslichem Amyloid und daraus dem Konzentrationsgradienten folgender Abzug von Amyloid aus dem ZNS (DeMattos et al. 2001; Sigurdsson et al. 2001; Lemere et al. 2003). In einer klinischen Studie am Menschen, in der A $\beta$ 1-42 gegeben wurde, fand man Anzeichen für eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten der Patienten. Allerdings wurde die Studie vorzeitig abgebrochen, da schwere toxische Nebenwirkungen, vermutlich durch zytotoxische T-Zell-Reaktion, bei einem kleinen Teil der Patienten auftraten (Schenk 2002). Anschließend wurden in einer weiteren Studie an Mäusen mit zwei A $\beta$ 1-42-Derivaten, die nicht toxisch sein und eine viel geringere T-Zell-Antwort hervorrufen sollten, ermutigende Ergebnisse gefunden. Die behandelten Tiere zeigten im Vergleich mit der Kontrollgruppe weniger kognitive Defizite und bei einem der beiden A $\beta$ 1-42-Derivate deutlich weniger Amyloid-Plaques. Die hier ebenfalls festgestellten erhöhten IgM-Plasma-Konzentrationen sind ein Hinweis darauf, dass der Amyloid-Abbau auf periphere Elimination und anschließenden, dem Konzentrationsgradienten folgenden Abzug von Amyloid aus dem ZNS zurückzuführen ist, da IgM die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann (Sigurdsson et al. 2004).

Diese Immunisierungsverfahren könnten daher ebenfalls zukünftige Möglichkeiten einer Prävention oder Therapie der AD darstellen.