

6. Zusammenfassung

Die Proteine *nerve growth factor* (NGF) und *neurotrophin-3* (NT-3) sind als ein Mitglieder der Neurotrophinfamilie neben dem *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und *Neurotrophin-4/5* bis *Neurotrophin-7* bekannt für ihre zahlreichen überlebens- und funktionsstützenden Effekte auf eine Vielzahl von Neuronenpopulationen im zentralen und peripheren Nervensystem. Dabei werden ihre Wirkungen neurotroph vermittelt über Bindung von NGF an seinen hochaffinen Tyrosinkinase-Rezeptor TrkA und den niedrigaffinen p75-Rezeptor, von NT-3 an seinen hochaffinen Tyrosinkinase-Rezeptor TrkC und ebenfalls den niedrigaffinen p75-Rezeptor. Bei der Ätiologieforschung bezüglich der Alzheimer-Demenz (AD) rückten in den letzten Jahren zunehmend auch die Neurotrophine, insbesondere NGF und BDNF, in den Vordergrund, und verschiedene Untersuchungen zeigten anfänglich Neurotrophinreduktionen im zentralen Nervensystem (ZNS) von AD-Patienten. Bezüglich NGF wurde in mehreren Arbeiten über verminderte NGF-Konzentrationen in unterschiedlichen Hirnarealen berichtet, doch beobachtete man in einzelnen Arbeiten auch unveränderte oder sogar erhöhte NGF-Konzentrationen. Es gibt Hinweise darauf, dass die NGF-Konzentration im Rahmen der AD einem zeitlichen Verlauf mit zu Beginn sinkenden und in späteren Stadien der Krankheit steigenden Konzentrationen folgt. Für das wesentlich weniger erforschte NT-3 wurden bis jetzt gleich bleibende oder gesunkene Konzentrationen beobachtet. Den anfänglich beobachteten NGF-Konzentrationsabfall in ZNS-Regionen AD-Erkrankter sah man dabei als Hinweis dafür, die bereits zu Beginn der 1980er Jahre aufgestellte „Neurotrophin-Mangel-Hypothese“ bestätigen zu können. Dieser Hypothese zufolge könnte eine verminderte Neurotrophinkonzentration zu geringeren neurotroph funktionsstützenden Effekten führen. Dies könnte auch bei degenerativen Erkrankungen wie der AD eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentstehung mit negativen Effekten auf cholinerge Neurone des basalen Vorderhirns spielen, wobei gerade dieses Neuronensystem bereits in einem frühen Stadium der AD neurodegenerativen Veränderungen unterworfen ist. Das basale Vorderhirn mit seinen cholinergen Projektionen zum Hippocampus und Cortex wird durch die überlebensstützende neurotrophe Wirkung von NGF beeinflusst. Durch Konzentrationsverminderungen dieses Neurotrophins kommt es zu verringerten neurotroph Effekten mit der möglichen Folge eines Verlustes cholinerg Neurone im basalen

Vorderhirns; daher scheinen die Neurotrophine in neurodegenerative Veränderungen als mögliche Ursache des Beginns der AD involviert zu sein. Dabei wird NGF physiologischerweise im Hippocampus und Cortex synthetisiert und retrograd zu den cholinergen Zellkörpern des basalen Vorderhirns transportiert, NT-3 wird vom Hippocampus zu den cholinergen Zellkörpern des basalen Vorderhirns transportiert. Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Neurotrophin-Konzentrationen bei AD-Patienten erklären sich am ehesten durch einen variablen zeitlichen Verlauf der Konzentrationen in Abhängigkeit vom Stadium der neurodegenerativen Erkrankung und durch die Neurotrophin-Quantifizierungen zu verschiedenen Zeitpunkten während der AD.

Da die Hypothese des Einflusses des Neurotrophindefizits zu Beginn der AD bzw. der Neurotrophin-Konzentrationsveränderungen im Verlauf der AD noch nicht genügend untermauert ist und für NT-3 bisher nur wenige Studien vorliegen, blieb bisher die Frage offen, ob in gleichen Krankheitsstadien gleichsinnige Neurotrophinveränderungen auftreten. Hierfür wünschenswerte longitudinale Studien beim Menschen schließen sich aus ethischen wie aus praktischen Gründen aus. Da bei einer kleinen Untergruppe der AD eine familiäre Häufung mit einer autosomal-dominanten Vererbung auftritt, deren Ursache u.a. in einer Amyloid-Präkursor-Protein (APP)-Gen-Mutation zu suchen ist, wurden dahingehend transgene Tierreihen entwickelt, in die die menschliche APP-Mutation eingeschleust wurde. Diese transgenen Tiere, die lebenslang eine pathologische APP-Überexpression aufzeigen und damit den im Rahmen der „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ vermuteten jahrzehntelangen präklinischen Verlauf der AD modellhaft widerspiegeln und tatsächlich auch Lerndefizite und Verhaltensauffälligkeiten sowie einige neurochemische und morphologische Veränderungen im fortschreitenden Alterungsprozess aufweisen, konnten nun longitudinal zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden.

Grundlage unserer Studie bildete dabei ein von der Firma Novartis zur Verfügung gestellter Versuchsaufbau mit 42 Tieren, bei denen die NGF- und NT-3-Konzentrationen in sieben Regionen des ZNS (Hippocampus, Bulbus olfactorius, Cerebellum, Striatum, frontaler Cortex, occipitaler Cortex, Septum) und im Nervus ischiadicus untersucht wurden. Hierbei handelte es sich um transgene Mäuse der APP-23-Linie, eines der im internationalen Vergleich elaboriertesten transgenen Tiermodelle der AD. Die untersuchten Tiere waren je vierzehn hemizygot, weibliche APP23-Tiere jungen (ca. 5 Monate), mittleren (ca. 10,5 Monate) und hohen Alters (ca. 20 Monate), die mit gleichaltrigen, nicht APP exprimierenden

Wildtypen als entsprechende Kontrolle verglichen wurden.

Für die Messungen der NGF-Konzentrationen benutzten wir eine in unserem Labor etablierte *Enzyme-linked-immunosorbent-assay* (ELISA)-Methode. Zur NT-3-Bestimmung mittels ELISA entwickelten wir auf der Basis eines Kits der Firma Promega (NT-3 Emax™ ImmunoAssay System) eine optimierte Methode und erreichten mit einer Nachweisgrenze bezüglich des NT-3-Proteins von weniger als 1 pg/ml bzw. 1 pg/mg Feuchtgewicht bei einer *Recovery* von durchschnittlich 70-90% eine sehr empfindliche Methode zur Quantifizierung von NT-3.

So waren wir nun in der Lage, die NGF- und NT-3-Konzentrationen in verschiedenen ZNS-Regionen der transgenen APP-überexprimierenden Mäuse zu verschiedenen Lebenszeitpunkten zu bestimmen. Bei den wildtypen Kontrolltieren erreichten wir insgesamt Messergebnisse, die auch im Bereich der zuvor anderenorts berichteten NGF- und NT-3-Konzentrationen im Mäuse-ZNS lagen. Bei den NT-3-Konzentrationen ergaben sich keine im Rahmen des hier untersuchten Tiermodells der AD signifikanten Ergebnisse. Bei der NGF-Quantifizierung beobachteten wir bei den transgenen Tieren einen NGF-Anstieg im Laufe des Alterungsprozesses im Gegensatz zur gesunden Kontrollgruppe mit einer maximalen, signifikanten Zunahme im frontalen Cortex von den jungen zu alten Tieren um 72% und im occipitalen Cortex von jung zu alt um 66%. Diese Ergebnisse deckten sich gut mit bisher publizierten Zahlen. Damit verdeutlichen die bei den seneszenten hemizygoten Tieren beobachteten stärkeren NGF-Konzentrationsanstiege noch einmal den Einfluss, den das Alter bei der Entwicklung der AD spielt. So tritt der Alterseffekt im Sinne einer erhöhten Vulnerabilität gerade bei den transgenen Tieren deutlicher hervor als bei der „gesunden“ Kontrollgruppe, bei der außer dem Alterungsprozess nicht noch ein zweiter pathophysiologischer Faktor potenzierend hinzukommt.

Wir fanden 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 den 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. Da der Cortex bezüglich des

cholinergen Systems eine Hauptzielregion darstellt, könnte ein gestörter retrograder Abtransport von NGF dabei eine Hauptursache der Konzentrationserhöhung darstellen. Auch im Vergleich der Genotypen waren dabei die im Bereich des frontalen (47%) und occipitalen (37%) Cortex der transgenen Tiere verzeichneten NGF-Konzentrationen bei den Alttieren signifikant höher.

Im Septum war eine statistisch signifikante Erhöhung der NGF-Konzentration bei den alten im Vergleich zu den mittelalten Kontrolltieren zu beobachten. Die erhöhten Werte der transgenen alten Tiere zu den alten Kontrolltieren waren ebenfalls statistisch signifikant.

Im Hippocampus, dem Cerebellum, dem Bulbus Olfactorius und dem Striatum ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der NGF-Konzentration.

Die signifikanten Konzentrationsabfälle von NGF im Nervus ischiadicus der transgenen Tiere und der Kontrollgruppe sind vielleicht durch altersbedingte Vorgänge erklärbar.

Der signifikante Anstieg der NT-3 Konzentrationen im Septum der Kontrolltiere bei gleichzeitig konstanten Werten bei den transgenen Tieren könnte durch im Alter auf physiologische Weise ansteigende 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.

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 höchstens 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.

Eine mögliche Erklärung für die signifikant ansteigenden Werte im frontalen und occipitalen Cortex der transgenen Tiere ist, dass diese Regionen bezüglich des cholinergen Systems eine Hauptzielregion darstellten und im Rahmen der Krankheitsentwicklung bei den transgenen Tieren, die den Verlauf einer AD modellhaft widerspiegeln, hauptsächlich in Mitleidenschaft gezogen werden.

Diese NGF-Steigerung ist so vorher auch schon andernorts in post-mortem Gehirnen von AD-Patienten beobachtet worden, allerdings kamen Überlegungen auf, ob zu Beginn der Krankheit eventuell ein NGF-Defizit vorliegen könnte, welches dann später im Sinne eines Kompensationsversuches in einen Überschuss umschlägt. Für diese Hypothese fanden wir

jedoch keine Anhaltspunkte.

Prinzipiell wäre es dabei durchaus denkbar, dass unser Tiermodell zwar lebenslang eine pathologische APP-Überexpression aufweist, aber andere Faktoren, die bei der AD-Entstehung eine Rolle spielen, außer acht gelassen werden, so dass sich hierüber die im Vergleich zu AD-Patienten anderen Ergebnisse erklären ließen.

Mögliche Ursachen für den NGF-Konzentrationsanstieg sahen wir neben dem beschriebenen gestörten retrograden Transport möglicherweise auch in aktivierten Gliazellen, die mit einer Zunahme von NGF und NGF-Rezeptoren assoziiert sind. Auch könnten β -Amyloid-Ablagerungen die NGF-Expression erhöhen, wie in jüngsten Studien anderenorts nachgewiesen wurde. So zeigte eine Paralleluntersuchung bezüglich der Amyloid-Plaquedichte unserer Tiere eine positive Korrelation zwischen Amyloid-Plaques im Cortex und NGF-Konzentrationserhöhungen, die auch die umgekehrte Überlegung bezüglich einer der Amyloidplaquebildung vorausgehende NGF-Erhöhung zuließen. Allerdings wird NGF auch ein neuroprotektiver Effekt nachgesagt, so dass die NGF-Erhöhung im Sinne eines Kompensations- bzw. Rettungsversuches des geschädigten Gewebes gesehen werden könnte, um die neuronalen Strukturen zu schützen und das durch die neurodegenerativen Vorgänge ausgelöste relative Defizit auszugleichen. Hierbei wäre es durchaus denkbar, dass auch eine Überversorgung mit NGF zu einer gestörten neuronalen Plastizität führen könnte, und statt eines Rettungsversuches die Krankheit durch eine NGF-Hochregulierung eventuell noch weiter vorangetrieben wird.

In Folgeuntersuchungen könnten die noch offenen Fragen geklärt werden. So sollten größere Populationen untersucht werden, um die bisherigen signifikanten Ergebnisse zu bestätigen und bei erneuter histologischer Paralleluntersuchung bezüglich der Plaqueeentwicklung die mögliche Korrelation zwischen Plaquedichte und NGF-Anstieg zu verifizieren. Ebenso könnte ein gleichzeitiger Nachweis der Rezeptordichte und -produktion (TrkA/TrkC und p75) wichtige Hinweise auf Verteilung und Funktion der Neurotrophine liefern. Schließlich sollten dann mögliche Konzepte bezüglich einer therapeutischen Intervention, eventuell sogar einer Prävention dieser Erkrankung diskutiert werden.

Durch diese Studie ist es uns gelungen, Neurotrophinveränderungen im ZNS transgener Tiermodelle der AD nachzuweisen, um damit dem Verständnis der Pathogenese der ätiologisch bisher größtenteils unverstandenen AD einen Schritt näher zu kommen. So

könnten vor allem die beobachteten NGF-Veränderungen über ihren Einfluss auf das Überleben und die Differenzierung krankheitsspezifischer entweder noch gesunder oder auch schon geschädigter Neuronenpopulationen Konsequenzen für die weitere synaptische Funktion, die neuronale Genexpression und das allgemeine Verhalten des Individuums haben. Außerdem sind wir nun auch in unserem Labor in der Lage, routinemäßig NT-3 in verschiedenen Geweben und Flüssigkeiten nachzuweisen, um gerade in diesem noch sehr jungen Bereich der biologischen Psychiatrie in Zukunft weitere Fragestellungen zu untersuchen.