

# I. Einleitung

## A. Neurodegeneration

Der Begriff der Neurodegeneration umfasst eine Gruppe von Prozessen, welche zu einer selektiven Degeneration spezifischer Neuronenpopulationen oder eines Gehirnareals führen. Erkrankungen, bei denen die Neurodegeneration eine wesentliche Rolle spielt, sind die Demenzen, wie z.B. die Alzheimer Erkrankung (AD), aber auch umfassende Verletzungen des Gehirns, wie z.B. die Ischämie oder Traumata. Klinische Zeichen der Neurodegeneration sind, je nach betroffener Nervenzellpopulation, kognitive, motorische oder sensorische Dysfunktionen (*Pal PK et al. 2005*).

Heutzutage leiden ~6% der Menschen über 60 Jahre und ~25% der Menschen über 90 Jahre unter einer dieser Erkrankungen (*Ferri CP et al. 2005*). Aufgrund der verlängerten Lebensspanne wird es zu einer steigenden Anzahl an Fällen von Demenzen kommen.

Eine frühe Erkennung der krankhaften Veränderungen ist besonders wichtig, da eine Therapie bereits vor Auftreten der Symptome einsetzen muss, um bleibende Schäden zu verhindern. Dies ist nur möglich durch die genaue Kenntnis der zugrunde liegenden Prozesse der neurodegenerativen Erkrankungen.

## B. Spezielle Formen der Neurodegeneration

### B. 1. Alzheimer Erkrankung

Die Alzheimer Demenz (AD) ist die häufigste Demenz. Der Anteil der an AD Erkrankten steigt von 1 - 2% bei den zwischen 65 - 69-Jährigen bis zu 30 - 50% bei den über 95-Jährigen (*Ferri CP et al. 2005*). Bei den Erkrankungen unterscheidet man die spontan auftretenden, sporadischen Formen der AD (sAD) (90-95%) und die familiären Formen der AD (fAD).

Der fAD liegen Mutationen dreier Gene zugrunde, welche die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP: Amyloid Precursor Protein) verändern. Die bisher identifizierten genetischen Veränderungen sind Mutationen in den Genen der Preseniline (PS) – welche für Untereinheiten der APP-prozessierenden  $\gamma$ -Sekretase

kodieren – sowie Mutationen in den Sekretaseschnittstellen des APPs selbst (Kowalska A 2004).

Bei der sAD sind die genauen Ursachen meist nicht bekannt. Das Erscheinen der Symptome ist jedoch in der fAD früher (40-60 Jahre) als in der sAD (über 65 Jahre). Hinsichtlich der Verteilungsmuster der charakteristischen Plaques sind die beiden Formen jedoch identisch (Harman D 2006).

Die Krankheit ist charakterisiert durch intrazelluläre fibrilläre Ablagerungen in Neuronen, bestehend aus Tau-Protein und durch extrazelluläre Ablagerungen von Amyloid- $\beta$ -Peptiden, den Amyloid Plaques (Vickers JC et al. 2000).

Die Tau-Ablagerungen entstehen durch Ansammlung von hyper-phosphoryliertem Tau-Protein. Je nach Lokalisation der Ablagerung innerhalb der Neuronen spricht man von neurofibrillären Bündeln (engl: neurofibrillary tangles - NFT), Neuropilen Fäden (NT) oder neuritischen Plaques (NP) (Buee L et al. 2000). Die genaue toxische Wirkung der Tau-Ablagerungen ist noch nicht bekannt. Es scheint jedoch durch die Ablagerungen zu einer Störung der Transport- und Strukturfunktion des Zytoskeletts zu kommen (Iqbal K et al. 2005).

Die Amyloid-Plaques entstehen laut der klassischen Amyloidkaskaden-Theorie durch die zunehmende Aggregation von A $\beta$  über mehrere Zwischenstufen hin zu unlöslichen fibrillären Aggregaten, die letztlich toxisch für die Zellen sind. Neuere Studien deuten darauf hin, dass ein Aggregationsintermediat, die noch löslichen A $\beta$ -Oligomere, auch „amyloid-derived diffusable Ligands“ (ADDLs) genannt, die eigentliche toxische Spezies darstellen (Vickers JC et al. 2000, Koistinaho M & J 2005, Hardy J et al. 1991). Die Entstehung der A $\beta$ -Ablagerungen scheint durch verschiedene Prozesse beeinflusst zu werden, die entweder an der erhöhten Produktion des A $\beta$ -Peptides A $\beta$ 42 oder an dessen Abbau und Entsorgung beteiligt sind (Vickers JC et al. 2000)). Diese Prozesse treten vermutlich bereits sehr viel früher als die entsprechenden Symptome auf, da man bereits in asymptomatischen Probanden im Alter von 20 - 30 Jahren Plaques feststellen konnte (Barnham KJ et al. 2004).

Auch bei der AD kommt es zur Neuroinflammation, welche bereits einen frühen Prozess in der Erkrankung darstellt. Dies konnte sowohl mittels Positronen-Emissions-Tomography (PET) als auch mittels Immunhistochemie (ICH) mit Antikörpern gegen CD68 gezeigt werden (Eikelenboom P et al. 2002). Weiterhin konnte

gezeigt werden, dass es in einem Zellkulturmodell nach Stimulierung von Mikroglia-Zellen mit A $\beta$ 1-42 zu einer erhöhten Freisetzung von Cyto- und Chemokinen kommt.

Die direkte Beteiligung der Mikroglia-Zellen an der AD zeigt sich dadurch, dass diese sich an die Plaques anlagern und A $\beta$  in endozytotischen Vesikeln aufnehmen können. (Frautschy SA et al. 1992, Weldon DT et al. 1998, Rogers J et al. 2002).

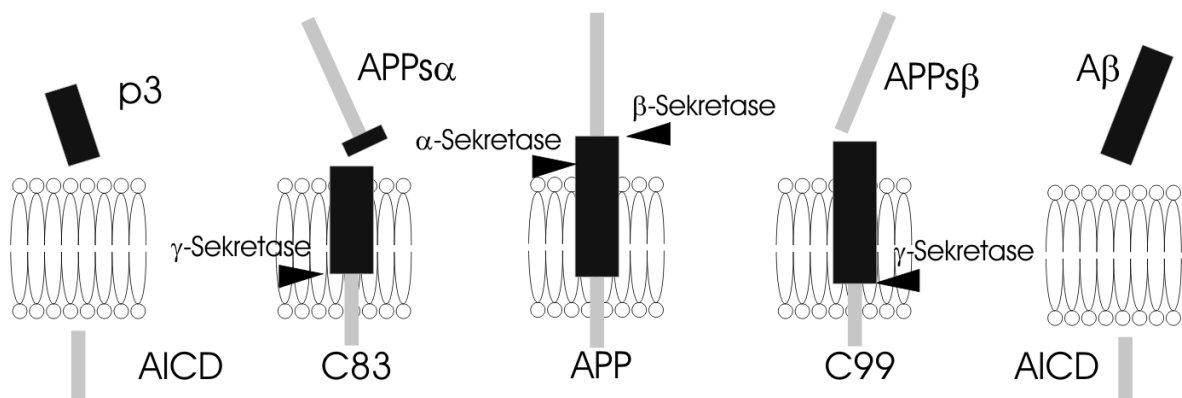
An Schnitten von humanem Hirngewebe konnte eine Anreicherung von Mikroglia in der Nähe der A $\beta$ -Plaques mit verschiedenen Mikroglia-Markern gezeigt werden (Eikelenboom P et al. 2002, Minghetti L 2005).

Für die AD existiert bislang keine kausale Therapie. Darüber hinaus ist die Diagnose bis heute schwierig, da sie auf psychologischen Tests und dem Ausschluss anderer Erkrankungen beruht (Morris JC et al. 1989, Giordani B et al. 1990). Dies erschwert insbesondere eine frühe Diagnose der Erkrankung. Somit kann letztendlich nur post mortem, durch die neuropathologische Identifizierung der charakteristischen Ablagerungen, eine sichere Diagnose gestellt werden (Thal DR, Braak H 2005).

## 1.1. Wichtige Prozesse der Alzheimer Erkrankung

### a. A $\beta$ -Prozessierung

Bei der sekretorischen Prozessierung des APPs sind im Wesentlichen zwei Wege zu unterscheiden, die entweder in den physiologisch sekretierten Produkten des APPs enden oder zur Bildung der A $\beta$ -Peptide und den Amyloid Plaques führen.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Prozessierungswege des APP.**

Rechts: Entstehung der pathologischen A $\beta$ -Fragmente nach der Spaltung durch die  $\beta$ -Sekretase. Links: Die nicht pathogene Prozessierung durch die  $\alpha$ -Sekretase.

Das APP besitzt verschiedene Schnittstellen, welche von unterschiedlichen Peptidasen erkannt werden können. Zwei der Sequenzen liegen außerhalb der Membran. Durch einen Schnitt der  $\alpha$ -Schnittstelle durch die  $\alpha$ -Sekretase TACE (engl.: TNFa cleaving enzyme) wird extrazellulär das Fragment  $\beta$ APP freigesetzt, während das Fragment C83 in der Membran verbleibt. Erfolgt hingegen der Schnitt der  $\beta$ -Schnittstelle durch die  $\beta$ -Sekretase BACE (engl.: beta-site APP cleaving enzyme) wird ebenfalls ein  $\beta$ APP-Fragment extrazellulär freigesetzt und das Fragment C99 verbleibt in der Membran.

Die membranständigen c-terminalen Fragmente, C83 und C99, besitzen weitere Schnittstellen, wovon eine durch die  $\gamma$ -Sekretase erkannt und gespalten werden kann (Czech C et al. 2000, Zhao G et al 2005). Die  $\gamma$ -Sekretase scheint dabei die Fragmente sequentiell zu schneiden, wodurch verschiedene A $\beta$ -Fragmente entstehen (Zhao G et al 2005).

Durch diese Spaltung entsteht zum Einen die APP-intrazelluläre Domäne (AICD), und je nach der vorhergehenden Spaltung das Fragment P3 oder die A $\beta$ -Fragmente. Das AICD dient der Signaltransduktion und migriert zum Zellkern (Südhof TC et al. 2001). Die anderen beiden Fragmente, P3 und die A $\beta$ -Peptide, verbleiben im Lumen.

Die Fragmente A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 bilden im Verlauf der AD die Amyloid-Plaques, welche sich extrazellulär im Gewebe ablagern. Die A $\beta$ 42-Peptide können weiterhin lösliche Oligomere bilden, so genannte amyloid-derived diffusable Ligands (ADDLs) – welche eng mit der Erkrankung korrelieren und neurotoxisch zu sein scheinen (Koistinaho M & J 2005).

### **b. A $\beta$ -Beseitigung**

Die entstandenen A $\beta$ -Fragmente können innerhalb des Liquors (Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit) frei diffundieren, wobei sie meist an ApoJ,  $\alpha$ -2 Macroglobulin (Vickers JC et al. 2000) oder ähnliche Trägermoleküle gebunden sind. Es scheint ebenfalls möglich zu sein, dass die A $\beta$ -Fragmente durch Transporter über die Blut-Hirn-Schranke migrieren können und dadurch ins Blut gelangen. In diesem Zusammenhang sind verschiedene Rezeptoren (LRP: LDL-rezeptor related Protein (Deane R et al. 2004), RAGE: Rezeptor für advanced glycoylation end products (Deane R et al. 2003), Megalin (Zlokovic BV et al. 1996) genauer untersucht worden, und es konnte gezeigt werden, dass diese Membranproteine A $\beta$  binden.

Dieses könnte darauf hindeuten, dass eine Fehlfunktion der Rezeptoren zu einer mangelnden Beseitigung der A $\beta$ -Peptide führt, welches in der Folge die Bildung von Plaques begünstigen könnte (*Vickers JC et al. 2000*).

### **B. 2. Ischämie des Gehirns**

Die zerebrale Ischämie ist die dritthäufigste Todesursache im europäischen und amerikanischen Raum (*Laterzza OF et al. 2006*). Normalerweise wird der Schlaganfall durch das Auftreten von plötzlichen Lähmungen oder Sprachstörungen erkannt. Es gibt jedoch auch einen gewissen Anteil, der keine klar erkennbaren Anzeichen aufweist.

Bei der zerebralen Ischämie kommt es zu einem transienten oder permanenten Mangel an Sauerstoff und Glucose im Gehirn. Dies wird meistens durch einen Verschluss der Blutgefäße (Thrombose) hervorgerufen. Als Folge der mangelnden Versorgung kommt es zu oxidativem Stress, welcher zum Zelltod führt. Bei diesem Prozess kommt es zu verringerten Mengen an ATP, gefolgt von einem Zusammenbruch verschiedener Ionengradienten und der oxidativen Phosphorylierung (*Lipton P et al. 1999*). Dies wiederum führt zur Depolarisierung der Zellen, zur Ausschüttung exzitatorischer Aminosäuren und schlussendlich zu oxidativem Stress (*Koistinaho M & J 2005*).

Man unterscheidet bei den möglichen Modellen jene der globalen und der fokalen Ischämie. Bei der fokalen Ischämie, bei der nur eine der beiden mittleren Zerebralenarterien verschlossen wird, kommt es zu geringeren Schäden als bei einer globalen Ischämie, bei der beide Gefäße verschlossen werden (*Lipton P et al. 1999*).

Die mittlere zerebrale Arterie dient mit ihren weiten Verzweigungen der Versorgung der lateralen Anteile jeder Hemisphäre. Damit stellt diese Arterie das hauptsächliche Versorgungsgefäß der kortikalen Bereiche und des Striatums dar. Durch Verschluss einer dieser Arterien kommt es zur Schädigung durch Hypoxie in der jeweilig versorgten Hemisphäre (ipsilateral), wobei die andere Hemisphäre (kontralateral) ungeschädigt bleibt. Dies ermöglicht die Analyse einer geschädigten und einer ungeschädigten Hemisphere innerhalb eines Tieres.

Zur Induktion der Ischämie wurde das weit verbreitete Modell des Verschlusses der mittleren Zerebralarterien (engl.: middle cerebral artery occlusion - MCAO)

verwendet, welches bereits in vielen Arbeitsgruppen erfolgreich für Untersuchungen der Diagnose und Therapie der zerebralen Ischämie etabliert ist. (Nagasawa H, Kogure K. 1998).

In dem von uns verwendeten Modell, kommt es zu zwei verschiedenen Arten des Zelltods, der Nekrose und der Apoptose. Die Nekrose dominiert im ischämisch geschädigten Areal. Hier bildet sich ein ischämischer Kern, der im Striatum des Tieres liegt.

Um diesen Kern herum kommt es zu geringeren Schäden, welche nicht ausreichen eine Nekrose zu induzieren, jedoch oftmals ausreichen ein Apoptose einzuleiten (Lipton P et al. 1999). Dieser Bereich um den ischämischen Kern wird Penumbra genannt und liegt bei dem von uns verwendeten Modell hauptsächlich im Cortex. Innerhalb der Penumbra werden durch die Ischämie viele Prozesse wie Apoptose, Neuroinflammation und Neuroregeneration initiiert.

### C. Wichtige Mechanismen der Neurodegeneration

Die den neurodegenerativen Erkrankungen zugrunde liegenden biologischen Prozesse sind vielfältig. Neben den Prozessen der Neuroinflammation und Apoptose spielt auch die Neuroregeneration eine wesentliche Rolle. Diese Vorgänge werden wiederum durch die Signaltransduktion und die Zelladhäsion beeinflusst.

Diese biologischen Prozesse sind durch die in Tabelle 1 gezeigten GO-Prozesse des Gene Ontology (GO) Consortium (<http://www.geneontology.org/GO.consortiumlist.shtml>) in einer Genexpressionsanalyse zu beschreiben. Die GO-Datenbank ordnet Gene einer bekannten Funktion in einzelne GO-Prozesse, die deren gemeinsame Funktion umfasst.

**Tabelle 1: Zuordnung biologischer Prozesse zu GO-Prozessen.**

Biologischer Prozess	Gene Ontology-Prozess	Beispiel Gene	Gene pro Chip (maus / human)
Neuroinflammation	Immunantwort (GO:0006955)	Semaphorin 4D CXCL13 TNF- $\alpha$	573 / 1477
Zelltod/ Apoptose	Apoptose (GO:0006915)	Caspasen IL2	541 / 1085

Signaltransduktion	Signaltransduktion (GO:0007165) Ionen transport (GO:0006811)	Transglutaminase 2 GABA/ AMPA Rezeptoren ATP Transporter Kalium Kanäle	2424/ 5876 722/ 1529
Zelladhäsion	Zelladhäsion (GO:0007255)	Cadherine Integrine	628 / 1420
Neuro- regeneration	Zellproliferation (GO:0008283) Zelldifferenzierung (GO:0030154)	Cyklin abhängige Kinasen Annexin A1 IGF-1 TGF-β Rezeptor II	330 / 1100 512 / 530

## C. 1. Neuroinflammation

Als Neuroinflammation bezeichnet man die entzündlichen Prozesse innerhalb des Gehirns, die in Folge neuronaler Schädigung auftreten und zur Aktivierung der intrinsischen Immunabwehr des Gehirns führen. Diese Schädigung kann durch mechanische Verletzung oder, wie in vielen neurodegenerativen Erkrankungen, durch oxidativen Stress hervorgerufen sein. Die Neuroinflammation dient dabei der Eindämmung der Schäden durch Beseitigung geschädigter Zellen und, falls möglich, der Entfernung des zugrunde liegenden Stimulus bzw. der Verletzung.

Diese Entzündungsreaktion wird primär nicht - wie in der Peripherie – durch Makrophagen und T-Zellen getragen, sondern von Mikroglia (MG) und Astrozyten (*Streit WJ et al. 2004*). Die Mikroglia sind wie ihre Verwandten, die Makrophagen, in der Lage, pathologische Veränderungen wahrzunehmen, Botenstoffe wie z. B. Chemokine und Cytokine, zu sezernieren, und unter bestimmten Umständen Zellbestandteile zu phagozytieren (*Streit WJ et al. 2004, Block ML et al. 2005*).

Bei Verlauf der Neuroinflammation unterscheidet man zwei wesentliche Formen:

- a. **Akute Neuroinflammation:** Als akute Neuroinflammation werden jene Formen der Entzündung bezeichnet, welche als direkte Reaktion auf eine neuronale Schädigung hervorgerufen werden. Diese Entzündungsreaktion wird entweder von den Mikrogliazellen getragen oder – wie im Falle einer Öffnung der Bluthirnschranke – durch einwandernde Leukozyten zusätzlich unterstützt (*Streit WJ et al. 2004*).
- b. **Chronische Neuroinflammation:** Als chronische Neuroinflammation bezeichnet man jene Formen der entzündliche Reaktion im Gehirn, welche durch einen chronischen Stimulus aufrechterhalten werden, der nicht beseitigt werden kann. Dieser Stimulus kann z. B. das Vorhandensein schädlicher Proteinablagerungen sein. Das wiederum führt zu einer anhaltenden

Aktivierung der Mikrogliazellen, die dadurch die Entzündungsreaktion regulieren und u. a. Botenstoffe wie z. B. Chemokine sezernieren (*Streit WJ et al. 2004*).

Verschiedene Daten deuten darauf hin, dass es neben den primären Schäden durch die zugrunde liegende Erkrankung zu zusätzlichen Schäden kommt, welche durch die verschiedenen zytotoxischen Faktoren entstehen, die von den aktivierten Mikrogliazellen ausgeschüttet werden (*Block ML et al. 2005*). Diese sind verschiedene proinflammatorische Botenstoffe wie z.B. TNF- $\alpha$  und IL1, aber auch verschiedene reaktive Sauerstoff-Moleküle, welche direkt Schäden in den Zellen verursachen.

Die Untersuchung der Neuroinflammation, mittels Genexpressionsanalyse, ist durch Analyse der Veränderung der Gene der Cyto- und Chemokinen, aber auch durch Marker von Leukozyten oder Gliazellen möglich.

### 1.1. Oxidativer Stress

Eine wichtige Ursache der Neuroinflammation ist oxidativer Stress. Dieser Stress wird durch reaktive Sauerstoff-Moleküle (engl.: reactive oxygen species - ROS) verursacht, welche durch zelluläre Dysfunktionen, wie z. B. der Fehlfunktion der Atmungskette oder einem Ungleichgewicht der Metallhomöostase entstehen (*Barnham KJ et al. 2004*). Dieser oxidative Stress führt in der Folge zu Modifizierungen von DNA, Proteinen sowie Lipiden, welche die Entzündung des Gewebes (Neuroinflammation) und im Weiteren den Zelltod (Apoptose) der betroffenen Zellen einleiten.

Im Falle einer Ischämie wird der oxidative Stress direkt durch die kurzzeitige Unterbindung der Sauerstoffzufuhr verursacht, welche zu einer Fehlregulation in der oxidativen Phosphorylierung oder anderen Sauerstoff benötigenden Prozessen führt (*Barnham KJ et al. 2004*).

In manchen Demenzen wie der AD wird vermutet, dass es durch eine veränderte Metallhomöostase zu einer Veränderung der Mengen an reduzierten Metallionen wie z. B. Kupfer und Eisen kommt, welche die Generierung von ROS fördern (*Moreira PI et al. 2005*).



## **1.2. Chemokine – Mediatoren der Neuroinflammation**

Die Neuroinflammation wird von Mikrogliazellen reguliert, die als Botenstoffe und Mediatoren oft Chemokine verwenden (*Cartier L et al. 2005*). Chemokine sind 8 -10 kDa große Proteine, welche in vier Gruppen eingeteilt werden Sie lassen sich aufgrund ihrer Sequenz der ersten beiden Cysteine und durch die Anzahl der dazwischen liegenden Aminosäuren unterscheiden (s. Abbildung 2). Jedes der Chemokine wirkt – alleine oder mit anderen – auf verschiedene Leukozyten-Typen und steuert so die Immunantwort (*Luster AD 1998*).

Die Rezeptoren der verschiedenen Liganden sind in die vier Gruppen ihrer Liganden eingeteilt und dementsprechend benannt. Es sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR), welche auf den verschiedenen Leukozyten - T-Zellen, Monozyten, Eosinophilen, Basophilen, Neutrophilen, natürliche Killer-Zellen und auf dendritischen Zellen - lokalisiert sind (s. Abbildung 2). Teilweise wurde auch eine Expression der Chemokin-Rezeptoren auf anderen Zellen wie z. B. Astrozyten, Neuronen, Epithel- und Endothelzellen nachgewiesen. Dies lässt vermuten, dass das Chemokin-System neben der Koordinierung der Leukozytenmigration auch weitere Aufgaben in der Neuroinflammation erfüllt (*Cartier L et al. 2005*).

Ein Teil der Rezeptoren ist konstitutiv in der Plasmamembran exprimiert, wobei ein anderer Teil nur durch gewisse Stimulationen exprimiert wird. Die Rezeptoren erkennen verschiedene Liganden und können somit unterschiedliche Signale weiterleiten (*Luster AD 1998*).




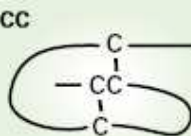


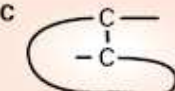

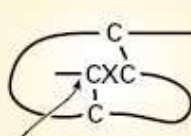


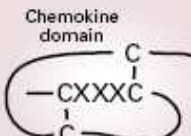

Chemokine	Receptor	Cell Type
 MCP-3, -4; MIP-1 $\alpha$ ; RANTES MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES	CCR1 CCR3	Eosinophil 
MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES	CCR2 CCR3	Basophil 
<b>CC</b>  MCP-3, -4; MIP-1 $\alpha$ ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES I-309 MDC, HCC-1, TECK	CCR1 CCR2 CCR5 CCR8 ?	Monocyte 
Fractalkine	CX <sub>3</sub> CR1	
SDF-1	CXCR4	
MCP-3, -4; MIP-1 $\alpha$ ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 TARC MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES MIP-3 $\beta$ (ELC) PARC, SLC, 6CKine (Exodus-2)	CCR1 CCR2 CCR4 CCR5 CCR7 ?	Activated T cell 
Fractalkine	CX <sub>3</sub> CR1	
IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	
<b>C</b>  PARC, DC-CK1 Lymphotactin	? ?	Resting T cell 
SDF-1	CXCR4	
<b>CXC</b>  MCP-3, -4; MIP-1 $\alpha$ ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES TARC MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES MIP-3 $\alpha$ (LARC, Exodus-1) MDC, TECK	CCR1 CCR2 CCR3 CCR4 CCR5 CCR6 ?	Dendritic cell 
SDF-1	CXCR4	
Interleukin-8, GCP-2 Interleukin-8, GCP-2; GRO- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ; ENA-78; NAP-2; LIX	CXCR1 CXCR2	Neutrophil 
<b>CXXXC</b>  MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES	CCR2 CCR5	Natural killer cell 
Fractalkine	CX <sub>3</sub> CR1	
IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	

Abbildung 2: Die vier Gruppen der Chemokine sowie deren Rezeptoren und die von ihnen stimulierten Zelltypen. Die linke Spalte zeigt die verschiedenen bekannten Muster der Chemokin-Liganden. Die mittlere Spalte benennt die Rezeptoren der einzelnen Liganden. Die rechte Spalte zeigt die verschiedenen Zelltypen, die durch die Chemokine stimuliert werden können. (aus Luster AD 1998).

## C. 2. Zelltod/ Apoptose

Da während einer Neurodegeneration ein gewisser Teil der Zellen stirbt, ist der Zelltod ein wichtiger Prozess bei der Betrachtung dieser Erkrankungen. Dieser Prozess kann entweder nekrotischer oder apoptotischer (gerichteter) Natur sein.

Die Nekrose beschreibt die Art des Zelltods, welcher bei gravierenden Schäden der Zellen direkt einsetzt. Diesen Prozess findet man z. B. in den frühen Zeiten nach der Ischämie im ischämischen Kern (s. B. 2). Dort kommt es zum Zelltod aufgrund des akuten Sauerstoffmangels und den daraus resultierenden gravierenden Schäden. Da dieses kein durch die Signale der Zelle eingeleiteter Vorgang ist, kann die Nekrose nicht durch die Veränderungen von Genen beschrieben werden.

Der Vorgang der Apoptose wird durch innere oder äußere Signale gesteuert und führt zum Zelltod von geschädigten Zellen, welche aus dem Organismus entfernt werden müssen. Im Falle des Schlaganfalles geschieht dies hauptsächlich in der Penumbra (s. B. 2), wo die Hypoxie nur zu geringen Schäden führt. Bei der AD tritt die Apoptose dort auf, wo einzelne Zellpopulationen selektiv entfernt werden (*Lipton P 1999*). Hierbei ist die Ursache der Induktion des Zelltods noch nicht verstanden.

Durch Analyse der veränderten Genexpression kann nur die Apoptose, aber nicht die Nekrose betrachtet werden.

## C. 3. Neuroregeneration

Die oben genannten Mechanismen beschreiben die biologischen Prozesse, welche zum Zelltod bei einer Neurodegeneration führen. Verschiedene Publikationen beschreiben jedoch die Reduzierung dieser Prozesse und auch die Neubildung von Zellen durch Proliferation und Differenzierung vorhandener Zellen. Diese biologischen Prozesse werden als Neuroregeneration bezeichnet.

Dieser Vorgang ist sowohl nach der Ischämie (*Kokaia Z et al. 1003, Darsalia V et al. 2005*), als auch bei der Alzheimer-Erkrankung (*Hoozemans JJ et al. 2005*) beschrieben. Beide Erkrankungen zeigen Veränderungen der geschädigten Zellpopulationen, welche auf eine Neuroregeneration hindeuten. Es ist jedoch nicht sicher, ob und in welchem Umfang diese Vorgänge einer Regeneration der Gewebe dienen.

Auf der Basis einer Genexpressionsanalyse können diese Vorgänge insbesondere durch die Betrachtung der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung beschrieben werden.

### **C. 4. Zelladhäsion**

Die Zelladhäsion umfasst verschiedene Prozesse, die sowohl an Zell-Zell-Kontakten als auch an Zell-Matrix-Kontakten beteiligt sind. Somit können diese Gene sowohl der Signaltransduktion als auch der Proliferation von Zellen dienen. Eine weitere Funktion der Zelladhäsion ist die wesentliche Beteiligung an der Leukozytenadhäsion und -invasion. Daher können Veränderungen dieses biologischen Prozesses sowohl zur Inflammation als auch zur Regeneration beitragen.

Die Gene, die diesen biologischen Prozess beschreiben, werden im GO-Prozess „Zelladhäsion“ zusammengefasst und können somit mittels einer Genexpressionsanalyse betrachtet werden.

### **C. 5. Signaltransduktion**

Die Vermittlung und Speicherung von Informationen und Signalen ist eine der Hauptaufgaben des Gehirns. Diese Funktion erfüllt das Gehirn durch die Neuronen und deren Synapsen, welche mittels Botenstoffen und den verschiedenen Rezeptoren Signale verarbeiten können. Innerhalb der Zellen werden die Signale durch verschiedene Enzyme wie z. B. Kinasen und Phosphatasen weitergeleitet, indem diese, aufgrund eines Signals, Botenstoffe modifizieren, welche dann wiederum von anderen Bausteinen der Zelle erkannt werden können.

Bei den verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen kommt es zur Schädigung und zum Zelltod vieler Neuronen. Eine Analyse der Veränderung der Genexpression verschiedener Rezeptoren und Botenstoffe, sowie verschiedener katalytischen Enzyme, ermöglicht somit die Betrachtung der Signaltransduktion.

## ***D. Zusammenhänge der analysierten neurodegenerativen Erkrankungen***

Die neurodegenerativen Erkrankungen, Schlaganfall und Alzheimer-Erkrankung, wurden gewählt, um die Analyse einer akuten sowie einer chronischen

neurodegenerativen Erkrankung zu ermöglichen. Dies erlaubt einen Vergleich und somit die Identifizierung sowohl unterschiedlicher als auch gemeinsamer Prozesse. Beide Arten von Prozessen sind interessant, da sie viel versprechende Ziele für die Diagnose- und Therapieentwicklung für neurodegenerative Erkrankungen darstellen. Eine detaillierte und vergleichende Expressionsanalyse inklusive der beiden hier gewählten Erkrankungen ist aus folgenden Gründen von Interesse:

- Die cerebrale Ischämie erlaubt besonders in der frühen Phase die Betrachtung der akuten Prozesse, wohingegen die AD durch ihren Verlauf über einen langen Zeitraum ein hervorragendes Modell der chronischen Prozesse darstellt.
- Die Verwendung eines Tiermodelles zur Analyse der zerebralen Ischämie ermöglichte die Untersuchung der frühen Zeitpunkte und somit der akuten Ischämie, was mit Patienten-Material nicht möglich ist.
- Die Häufigkeit der AD ermöglichte die Verwendung einer statistisch signifikanten Anzahl von Proben.
- Die Prozesse, die bei AD und nach cerebraler Ischämie ablaufen, zeigen Ähnlichkeiten, da es in beiden Erkrankungen zum neuronalen Zelltod und zu einer Stimulation von Mikrogliazellen und Astrozyten kommt, welche Chemokine sezernieren und somit die entzündliche Reaktion in beiden Erkrankungen unterstützen (*Cacquevel M et al. 2004, Tuppo EE, Arias HR 2005*).
- Diese Aktivierung von Mikrogliazellen erfolgt im Falle der Alzheimer-Erkrankung durch die Amyloidplaques oder deren Vorläufer, die A $\beta$ -Oligomere (*Wisniewski HM et al. 1989*). Bei der Ischämie erfolgt die Aktivierung durch die Schäden, welche durch Hypoxie verursacht wurden.
- Es konnte gezeigt werden, dass bei 60 – 90 % der an AD erkrankten Patienten auch cerebrovaskuläre Pathologien gefunden wurden, was einen Zusammenhang von AD und Schlaganfall nahe legt (*Koistinaho M & J 2005*).
- Weitere Studien zeigten, dass die Veränderungen der AD ein erhöhtes Risiko für einen späteren Schlaganfall darstellen: z. B. bilden sich in APP-transgenen Tieren größere Infarkte aus als in Kontrollmäusen (*Hsiao KK et al. 1995*). Außerdem findet man in APP-transgenen Tieren sehr viele Mikroblutungen im Gehirn.

## **E. Aufgabenstellung**

Das Ziel dieser Arbeit war es, durch Analyse der Genexpression die Grundlagen neurodegenerativer Prozesse genauer zu analysieren und dabei besonders die einzelnen biologischen Prozesse des oxidativen Stresses, der Apoptose, der Neuroinflammation und der Regeneration genauer zu verstehen. Veränderte Genexpressionen innerhalb dieser Prozesse können dann als mögliche Zielstruktur weiterer Analysen dienen. Diese Zielstrukturen können im Weiteren dazu dienen, sowohl neue Möglichkeiten in der Diagnose, als auch der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen zu entwickeln.

Zum allgemeinen Verständnis der Genexpressions-Veränderungen neurodegenerativer Erkrankungen wurden die Alzheimer-Erkrankung und die Ischämie einzeln analysiert. Anschließend sollten die Ergebnisse beider Erkrankungen miteinander verglichen werden, um Ähnlichkeiten und Unterschiede beider zu ermitteln. Zusätzlich sollte ein Vergleich zeigen, ob eine Unterscheidung der Krankheiten in eine akute und eine chronische Phase möglich ist.

Zu diesem Zweck wurde das mittel-zerebrale Arterienverschluss-Tiermodell der zerebralen Ischämie und Hirngewebe von Alzheimer-erkrankten Patienten untersucht. Somit wurden sowohl zwei der am weitesten verbreiteten neurodegenerativen Erkrankungen untersucht und gleichzeitig die Analyse akuter als auch chronischer Prozesse ermöglicht.

Die Analyse der Genexpressionsveränderungen wurde mittels Mikroarray durchgeführt, welche die Analyse einer hohen Anzahl an Genen ermöglicht. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden sowohl mittels qRT-PCR, als auch mittels proteinchemischer Analysen der Gewebe validiert. Aufgrund der starken Beteiligung neuroinflammatorischer Prozesse wurden die darin involvierten Mechanismen und Gene, wie z. B. Chemo- und Cytokine, genauer analysiert. Da diese die Entzündungsreaktionen des Körpers steuern, kommt ihnen eine wichtige Bedeutung in der Charakterisierung der Neuroinflammation zu.

Weiterhin wurde beschlossen, eine zusätzliche Analyse der Veränderungen der Blutgefäße der AD-Proben durchzuführen, da diesen, im Zusammenhang mit der AD, eine Rolle bei der Zunahme pathologie-relevanter A $\beta$ -Peptide zugeschrieben wird. Dies scheint durch die Veränderung des Abtransportes dieser Fragmente ins Blut verursacht zu werden, weshalb daher die Gruppe der Rezeptoren und Transporter dieses Gewebes genauer untersucht wurden.