

V. Diskussion

A. *Grundlagen*

Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Prozesse der Neurodegeneration und damit verbunden auch der Neuroinflammation genauer zu analysieren. Dieses sollte durch eine Analyse der veränderten Expression erreicht werden, welche Aufschluss über die beteiligten Gene und deren Funktionen gibt. Da es bei einer Neurodegeneration stets auch zu einer Neuroinflammation kommt, wurde erwartet, dass vor allem Prozesse, die dieser Pathologie angehören, wie z.B. die Aktivierung von Mikroglia, den erhöhten Zelltod oder auch die Invasion von Leukozyten aus dem Blut, in den regulierten Genen wieder zu finden. Allerdings werden auch neuroregenerative Prozesse diskutiert, welche in diesem Zusammenhang ebenfalls untersucht werden sollen. Da die Neurodegeneration ein weites Spektrum an Erkrankungen umfasst, wurden in dieser Arbeit exemplarisch die Indikationen des Schlaganfalls und der Alzheimer Erkrankung (AD) untersucht.

Die Analyse der Gehirn-Ischämie (Schlaganfall s. o.) wurde an einem Mausmodell durchgeführt. In diesem Modell wurden die Veränderungen während eines Zeitrahmens von sechs Stunden bis zu 14 Tagen verfolgt. Dies war nötig, da angenommen wird, dass es zu einer Beteiligung unterschiedlicher funktioneller Prozesse während der frühen und späten Phase nach der Ischämie kommt.

Zur Analyse der Alzheimer Erkrankung wurden humane post-mortem Proben verwendet und diese mittels Genexpressionsanalyse untersucht. Dabei wurden die gewählten Proben mittels verschiedener Methoden neu gruppiert, um sicherzustellen, dass die klinische Diagnose im Einklang mit der biochemischen Charakterisierung stand. Des Weiteren wurde der Qualitätszustand der RNA-Proben berücksichtigt, um den Risiken der Verwendung von humanem post-mortem Material Sorge zu tragen.

Nach abgeschlossener Analyse der einzelnen Krankheiten sollte versucht werden, die beiden neurodegenerativen Erkrankungen zu vergleichen und gleiche sowie verschiedene Expressionsmuster bzw. funktionelle Prozesse zu identifizieren. Dies

sollte vor allem auch zwischen den frühen und späten Prozessen der Ischämie und der AD geschehen. Hier wird erwartet, dass sich eine gewisse Schnittmenge zwischen frühen oder späten Prozessen der Ischämie und der AD ergibt und somit Aussagen über eher generelle neurodegenerative und neuroinflammatorische Prozesse gemacht werden können.

B. Genregulation nach Ischämie

B. 1. Analyse der Genregulation nach Ischämie

Die Untersuchung der Genregulation der Ischämie hatte das Ziel, wichtige Prozesse und falls möglich auch spezielle Gene zu identifizieren, die als Folge einer Neurodegeneration eine veränderte Expression zeigen. Dazu wurde die zeitliche Veränderung der Genregulation nach der Ischämie untersucht und ein Zeitfenster von sechs Stunden bis 14 Tagen nach der Okklusion beobachtet. Von den Tieren wurden jeweils RNA- und Protein-Proben der geschädigten (ipsilateral) und ungeschädigten (contralateralen) Hemisphäre extrahiert und auf ihre unterschiedliche Gen- und Proteinexpression hin untersucht.

1.1. Grundlegende Erkenntnisse der Mikroarrayanalyse

Zur Validierung der Mikroarray-Daten wurden diese mit Ergebnissen quantitativer real-time PCR-Messungen und ELISA verglichen. Da die Validierung erfolgreich war, wurde eine allgemeine Analyse der Mikroarraydaten mittels einer Gruppenanalyse durchgeführt. Diese Analyse ergab, dass eine Einteilung der Proben in transient und permanent, in die Gewebegruppen Cortex und Striatum und auch in die Schädigungsgruppen ipsi- und contralateral möglich war. Dies bestätigt unsere Erwartung, dass sich das transiente und permanente Modell auch in Hinblick auf die involvierten pathologischen Prozesse unterscheiden. Weiterhin bestätigte sich die Annahme, dass es möglich ist, die contra-laterale Seite als Kontrolle zu verwenden, da sich diese von den „schein-operierten“ Tieren nicht wesentlich unterschied.

Interessanterweise ergab die Gruppenanalyse, dass es zu einer Bildung von zwei Untergruppen kam, welche die frühe und die späte Phase voneinander trennte. Dies bestätigte die von uns gesetzte Erwartung, dass auch eine Analyse der späten Zeitpunkte, welche bis dahin eher selten gemacht wurde, von besonderem Interesse ist. Dies lässt vermuten, dass wichtige Veränderungen der

Neurodegeneration besonders auch nach längerer Zeit stattfinden. Dieses Ergebnis führte dazu, dass im Folgenden einzelne Phasen nach der Ischämie nochmals getrennt analysiert wurden.

Bei der Analyse der Anzahl regulierter Gene zeigte sich, dass in den Proben des Striatums eine höhere Anzahl an regulierten Genen gemessen werden konnten als in den Proben des Cortex. Auch hier wurde somit unsere Erwartung bestätigt, dass die stärkere Reaktion im ischämischen Kern – also dem Striatum – zu finden ist, und dass die Folgen im Cortex geringer sind.

Bei Betrachtung der einzelnen regulierten Gene fielen entzündungsrelevante Gene wie z.B. TGF α , HSP1a, Cathepsinen oder OSMR und verschiedene Marker von Astrozyten und Mikroglia wie z.B. GFAP, S100 Proteine, CD68 und CD44 (*Bates et al. 2001*) auf. Weiterhin zeigte sich, dass auch einige Gene der Signaltransduktion eine veränderte Expression aufwiesen. Ähnliche Ergebnisse ergaben bereits frühere Analysen (*Lu et al. 2004*). Diese beschrieben ebenfalls die erhöhte Expression von Apoptose, Inflammation und signaltransduktions-relevanten Genen. Die hier durchgeführte Studie ergänzt die publizierten Daten insbesondere durch die Analyse der späten Zeitpunkte nach Okklusion.

1.2. Zeitliche Veränderungen der Prozesse nach der Ischämie

Bei der allgemeinen Betrachtung der Mikroarraydaten zeigte sich bereits, dass es zwischen der frühen und der späten Reaktion auf die MCAO eindeutige Unterschiede gibt. Dies zeigte sich sowohl in der Bildung von frühen und späten Gruppen in der Gruppenanalyse als auch in der erhöhten Zahl an regulierten Genen in den späten Zeitpunkten. Diese Beobachtung wurde genauer analysiert, indem ausgewählte „Prozessgruppen“ bzgl. ihrer erhöhten Expression in den einzelnen Zeitpunkten genauer betrachtet wurden.

Die Betrachtung dieser Prozesse zeigte, dass sich grundlegende Muster sowohl in beiden Modellen als auch in beiden Geweben zeigten. Deswegen werden hier die verschiedenen Muster für beide Modelle und beide Gewebe gemeinsam diskutiert.

Hinsichtlich der zeitlichen Abfolge der involvierten Mechanismen bei der Neurodegeneration konnten im MCAO Modell zwei wesentliche Feststellungen gemacht werden. Zum Einen kommt es zu einer stärkeren Regulation apoptose-relevanter Gene in den ersten 18 Stunden, als in den folgenden beobachteten Zeitpunkten. Dies deutet auf einen Rückgang der Anzahl an sterbenden Zellen nach den ersten 24 Stunden hin.

Zum Anderen zeigt sich eine Erhöhung der Anzahl an Genen der Neuroinflammation über den analysierten Zeitraum. Diese Gruppe umfasst Chemokine und Cytokine, aber auch Gene der Komplement-Faktoren oder Integrin-Rezeptoren. Somit zeigt dies eine Verschiebung der Beteiligung der Prozesse von den apoptotischen in den frühen Phasen nach der MCAO, zu den Entzündungsprozessen in den späteren Phasen.

Ein weiterer Punkt, welcher in der Analyse der Prozesse auffällt, ist eine Zunahme der neuroregenerativen Prozesse hin zu den späten Zeitpunkten. Dies fällt insbesondere im Striatum und weniger im Cortex auf.

Diese Zunahme deutet möglicherweise auf den Beginn einer Regeneration des Gewebes hin, welche durch eine zunehmende Neubildung und Differenzierung der verbleibenden Zellen bewirkt wird. Dieser Prozess erfordert wesentliche Umstrukturierungen und würde dadurch zu starken Veränderungen der Genexpression führen.

Die fehlende Zunahme im Cortex kann dadurch erklärt werden, dass der wesentliche Schaden der Ischämie im Striatum zu finden ist, und dass aus diesem Grund dort die meisten neuen Strukturen (Zellen, Zell-Zellkontakte) entstehen.

Die Signaltransduktion zeigt keine wesentliche Veränderung ihrer Beteiligung über den betrachteten Zeitraum. Es lässt sich lediglich eine leichte Zunahme in den späten Phasen nach der Ischämie vermuten. Dies kann daraufhin deuten, dass die Signaltransduktion sowohl die Inflammation als auch die Regeneration unterstützt.

Bei Betrachtung der Zelladhäsion zeigt sich in allen Ergebnissen eine Zunahme des Prozesses bis hin zu sieben Tagen nach der Okklusion. Da diese Gruppe eine wesentliche Bedeutung in der Leukozyteninvasion hat, und bereits eine Zunahme der Neuroinflammation gemessen wurde, kann dies ein zusätzlicher Hinweis auf die

Einwanderung von Leukozyten sein, welche die Entzündung unterstützen. Diese Annahme stützt auch die Ergebnisse der Messungen der verschiedenen Marker von Leukozyten, welche zeigten, dass es in den späten Zeitpunkten zur teilweise starken Zunahme dieser Gene in den analysierten Modellen kam.

Zum anderen ist die Gruppe der Zelladhäsionsgene auch wichtig in Hinsicht auf eine mögliche Neuroregeneration. Dort müssen während des Prozesses neue Zell-Zellkontakte hergestellt werden, weshalb der Anstieg dieses Prozesses zum ähnlichen Verlauf des Prozesses der Neuroregeneration passt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwei Phasen identifiziert werden konnten. Zum Einen eine frühe Phase, welche eine stärkere Beteiligung von apoptotischen Prozessen zeigte, und zum Anderen eine späte Phase, in der es zu einer Zunahme an entzündungsrelevanten Genen, aber auch zu einer Zunahme an Genen kam, welche die mögliche Zelldifferenzierung und Neubildung von neuronalen Systemen fördern.

Beides unterstützt die momentan diskutierte Hypothese, dass es nach einer Ischämie zu einer lang anhaltenden Neuroinflammation, gefolgt von einer gewissen Neuroregeneration kommt. Auf dieser Annahme beruhen einige Therapieansätze, die versuchen die Neuroinflammation zu kontrollieren bzw. die Neuroregeneration zu unterstützen, und somit eine Verbesserung des Zustandes der geschädigten Areale zu erreichen. Unsere Ergebnisse können somit, sowohl durch die Liste an neuroregenerativen Genen, als auch durch die Liste an Genen der Zelladhäsion, weitere Ziele für diese Therapie-Ansätze darstellen.

B. 2. Genregulation der Entzündungsmediatoren – Chemo- und Cytokine

2.1. Detaillierte Analyse der Chemo- und Cytokine Liganden und Rezeptoren

Ähnlich wie bereits in anderen Studien beschrieben wurde, zeigte diese Mikroarray-Analyse nur geringe Expressionsänderungen bzgl. der Chemo- und Cytokine. Daher wurden in dieser Studie eine große Anzahl dieser Botenstoffe zusätzlich mittels qRT-PCR analysiert und somit dieser Bereich um weitere Daten ergänzt. Die genauere Untersuchung der Regulation der Cyto- und Chemokine zeigte, dass

man Zusammenhänge zwischen den Aufgaben und den zeitlichen Profilen einiger Liganden identifizieren konnte.

So wurde für verschiedene Chemokine bereits 12 h nach der Okklusion eine stark erhöhte Expression gemessen, welche meist über den analysierten Zeitraum aufrechterhalten wird. Dies deutet auf eine wichtige Rolle in der Steuerung der Entzündungsreaktion hin, welche auf der Beteiligung der Liganden an der Chemotaxis von Leukozyten beruhen kann (Olsen *et al.* 2002). Dieser Zusammenhang ist sowohl für die Liganden CXCL 9, 10 und 11, welche an CXCR3 binden, als auch für CCL 2, 3, 4 und 7 (Lu *et al.* 2004) beschrieben.

Beim Vergleich der Expressionen der Liganden und ihrer jeweiligen Rezeptoren fiel auf, dass es meist zuerst zu einer erhöhten Expression der Liganden und anschließend zu einer Erhöhung der Expression der Rezeptoren kam. Da die Rezeptoren zu einem großen Teil auf Leukozyten exprimiert werden, deutet dieses Ergebnis auf die Einwanderung von Leukozyten hin. Diese These wird auch durch die Analyse verschiedener Leukozyten-Marker unterstützt, welche zeigte, dass meist in der frühen Phase eine geringe und im späteren Verlauf eine stärkere Erhöhung der Expression dieser zellspezifischen „Marker-Gene“ gemessen wurde.

Ein anderer Teil der untersuchten Liganden zeigt in den ersten 48h nach der Okklusion eine geringe Expressionserhöhung, die nach sieben Tagen oft dramatisch stieg. Diese Chemokine können u. U. an den Prozessen der Reduzierung der Entzündungsreaktion oder auch der Neuroregeneration beteiligt sein. Da dies für einige der Liganden noch nicht beschrieben ist, kann diese Studie ein guter Ausgangspunkt für weitere Studien bezüglich der Chemokine-Beteiligung an der Neuroregeneration darstellen.

2.2. Kontralaterale Genexpression

Ein sehr interessantes Ergebnis ist die kontralateral erhöhte Expression einiger Gene. Es zeigte sich bei einigen Genen, dass es nach zwei Tagen zu einem scheinbaren Rückgang der relativen Expression kam, wobei nach sieben Tagen erneut eine erhöhte Expression gemessen wurde. Bei der genaueren Betrachtung stellte sich heraus, dass dies durch eine Erhöhung der Expression in der kontralateralen Seite verursacht wurde. Nach Betrachtung aller von uns mit qRT-PCR

analysierter Gene stand fest, dass dieser Effekt nur bei CCL3, CCL4 und TNF- α zu messen war.

Dieses Muster der Gegenregulation in der kontralateralen Seite wurde erst kürzlich in einem ähnlichen Ischämie-Modell genauer untersucht (Abo *et al.* 2006). Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Anzahl an Genen sowohl in der ipsi- als auch der kontralateralen Seite eine erhöhte Genexpression im Vergleich zu Kontrolltieren zeigen. In dieser Publikation wurden die Tiere jedoch nur zwei Tage nach fokaler Ischämie untersucht. Somit ergeben unsere Daten die zusätzliche Aussage, dass die kontralaterale Expression in unserem Fall nur nach zwei Tagen zu messen war, danach jedoch wieder zurückging.

Die Autoren konnten keine Chemo- oder Cytokine als differential exprimiert identifizieren. Dies beruht wahrscheinlich auf den bereits beschriebenen Nachteilen einer Mikroarrayanalyse, welche die Messung gering exprimierter Gene erschwert. Als Ursache der kontralateral erhöhten Expression postulierten die Autoren eine mögliche Funktion der Gene in der Reorganisation neuronaler Netzwerke. Da CCL3 und CCL4 (Karpus 2001; Cowell *et al.* 2002) auch eine wichtige Funktion in der Regeneration zugeschrieben wird, scheinen unsere Daten diese Hypothese zu unterstützen.

C. Genregulation in der Alzheimer Erkrankung

C. 1. Genexpressionsveränderung im Temporallappen in der Alzheimer Erkrankung

Zur Untersuchung der veränderten Genexpression in der Alzheimer Erkrankung wurden Gewebeproben des Frontal- und Temporallappens von erkrankten und gesunden Individuen untersucht, und es wurde versucht, charakteristische Veränderungen zu identifizieren. Da es sich bei den gewählten Proben um humanes post-mortem Material handelt, musste die Qualität der RNA-Proben geprüft werden. Aus diesen Analysen folgte, dass nur ein Teil ausgewählt werden konnte, welcher für die Mikroarrayanalyse eine ausreichende Qualität aufwies. Weiterhin mussten die Gruppen der Erkrankten und nicht Erkrankten möglichst genau definiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Parameter A β 40, A β 42 und phospho-tau der Gewebe biochemisch gemessen. Durch Neuberechnung der

Affymetrixdaten unter Verwendung der biochemischen Marker stellte sich heraus, dass bei den hier verwendeten Gewebeproben die Einordnung mittels A β 40 zu den signifikantesten Ergebnissen betreffs Differenzierung von Alzheimer-Erkrankten und Kontroll-Probanden führt. Diese Auswahl führte zu jeweils sechs Proben für jede Gruppe, welche dann für die Mikroarrayanalyse und die Bestimmung differentiell exprimierter Gene verwendet wurden.

1.1. Validierung der Genexpressionsdaten

Die ermittelten Ergebnisse der qRT-PCR und der verschiedenen proteinchemischen Analysen ergaben meist die gleiche Tendenz der Expressionsänderung, zeigten jedoch oft nur geringe Signifikanz. Diese geringe Signifikanz lässt sich durch die hohen Schwankungen erklären, die durch die unterschiedliche Qualität des post-mortem Materials bedingt waren.

Diese wurden wahrscheinlich durch die teils sehr hohen post-mortem Verzögerungen verursacht. Dabei kann es zu Degradation der Proben durch die längere Lagerung bei Raumtemperatur kommen. Es kann aber auch zu einer Induktion biologischer Prozesse kommen, welche nach dem Tod eintreten und somit nicht mit der eigentlichen Pathologie assoziiert sind. Es ist weiterhin auch beschrieben, dass die Art des Versterbens einen wesentlichen Einfluss auf die aus der Genexpression gewonnenen Daten haben kann (*Tomita et al. 2004*).

Eine weitere Fehlerquelle kann auch die veränderte Methode der RNA-Extraktion sein. Diese erfolgte aus Gründen der limitierten Gewebemenge nur aus wenigen Cryoschnitten, was den Nachteil eines erhöhten Kontaminationsrisikos mit sich bringt.

Trotz der teilweise geringen Signifikanzen bestätigte die Validierung mittels verschiedener Methoden (PCR, Western Blot, ELISA) die mittels Mikroarray gefundenen Tendenzen der Expressionsregulation.

Die grundlegende Analyse mittels einer Gruppenanalyse bestätigte für die Proben des Temporallappens unsere Erwartungen, die an die Gruppen gestellt wurde. Es zeigte sich eine Auftrennung der Proben in zwei Gruppen, welche unsere vorherige Gruppierung in erkrankte und gesunde Individuen widerspiegelt.

Die Analyse der Proben des Frontallappens ergab diese Auftrennung leider nicht, weshalb davon Abstand genommen wurde, diese weiter zu analysieren, da nicht

eindeutig zu bestimmen war, worauf die ermittelten Unterschiede in den einzelnen Proben des Frontallappens beruhen, womit eine Korrelation zu den Gruppen der erkrankten und gesunden Individuen nicht möglich ist.

1.2. Veränderung der betrachteten Prozesse

Die Analyse der in der Alzheimer-Erkrankung wichtigen Prozesse ergab, dass der am stärksten beteiligte Prozess nicht die Neuroinflammation sondern die Signaltransduktion war. Dies weist darauf hin, dass es zu einer wesentlichen Umstrukturierung der Signalvermittlung und somit auch zu strukturellen Veränderungen der Neuronen im Falle der Alzheimer-Erkrankung kommt.

Die Gruppe der Neuroregeneration gehörte zur zweitstärksten betroffenen Gruppe der untersuchten Prozesse. Dies stützt das Konzept einer Neuroregeneration in der Alzheimer-Erkrankung, welche teilweise den degenerativen Prozessen entgegenwirkt (*Hoozemans et al. 2005*).

Die Zelladhäsion zeigt ebenfalls eine starke Beteiligung an der Alzheimer-Erkrankung. Da der Zelladhäsion eine wesentliche Funktion an der Neustrukturierung von Zellen zukommt, und der starke Anteil am Prozess der Neuroregeneration bereits auf die Neubildung von Zellen hindeutet, könnte dieses Ergebnis ein weiterer Beleg für die vorhandene Neuroregeneration sein.

Was jedoch im Fall der AD zusätzlich in Betracht gezogen werden muss, ist, dass die AD auf der fehlerhaften Prozessierung des Zelladhäsions-Moleküls APP beruht. Dies könnte bedeuten, dass die veränderte Prozessierung auch andere Zelladhäsionsmoleküle betrifft, weshalb eine erhöhte Expression dieser Proteine eine Kompensationsreaktion widerspiegeln könnte.

Die am geringsten veränderten Prozesse sind jene, die zur Gruppe der Neuroinflammation und Apoptose gehören. Dies bestätigt, dass es in der AD wohl zu einer Entzündungsreaktion kommt, diese aber nur eine untergeordnete Rolle spielt. Vielmehr scheinen andere Prozesse einen wesentlicheren Einfluss auf die Entwicklung und Symptome der Alzheimer-Erkrankung zu haben.

Diese Beteiligung der verschiedenen Prozesse zeigt, dass sowohl die Gruppe der Zelladhäsions-Moleküle als auch die Rezeptoren der Signaltransduktion wesentliche Zielstrukturen für mögliche therapeutische oder diagnostische Ansätze darstellen könnten.

Es muss jedoch erwähnt werden, dass dies eine Untersuchung an postmortem Material von fortgeschrittenen AD-Patienten ist. Zeitlich frühe Ereignisse innerhalb der Pathophysiologie lassen sich somit nicht ermitteln. Sollte die Neuroinflammation ein primäres pathologisches Ereignis sein, so würde es in dieser Analyse nicht erfasst werden.

Im Falle der Rezeptoren sind bereits andere neurologische Erkrankungen bekannt, bei denen bereits die unterschiedliche Expression neuronaler Rezeptoren und Transporter, wie z. B. dem Dopamin Transporter (*Marshall et al. 2003*) verwendet werden, um die Erkrankung zu diagnostizieren.

Eine Identifizierung von Molekülen, welche ähnlich prozessiert werden, wie das APP, könnte für die Beschreibung der Krankheit von großem Nutzen sein.

1.3. Detaillierte Analyse der differenziell regulierten Gene

Die detaillierte Betrachtung der regulierten Gene ergab eine große Anzahl an Genen, welche im Zusammenhang zur AD bereits bekannt sind. Einige dieser Mikroarraydaten konnten mittels Western Blot oder ELISA auf Proteinebene bestätigt werden und zeigten dort dieselbe Tendenz der Expression.

So konnte eine breite Gruppe an Zelloberflächen-Proteinen identifiziert werden. Darunter waren u. a. das neurale Zelladhäsions-Molekül NCAM1, der low density lipoprotein Rezeptor 2 (LRP2), Sortilin 1, CD44 und CD47. Die meisten dieser Moleküle scheinen ähnlich prozessiert zu werden wie das APP, und bei einigen dieser Proteine, wie CD44, CD47 und LRP2, steht bereits fest, dass diese ebenfalls durch die γ -Sekretase gespalten werden.

Außerdem ist bekannt, dass einige der Proteine ebenfalls in Korrelation zu APP eine intrazelluläre Domäne besitzen, welche der Signaltransduktion dienen kann, wie z.B. CD44 (*Lammich et al. 2002*). Außerdem zeigen manche dieser Proteine eine Korrelation zur Alzheimer-Erkrankung wie im Falle des NCAMs, für welches bereits veränderte Proteinlevel bei AD-Patienten gezeigt wurden (*Debeuckelaere et al. 1992, Kalus et al. 2006, Polo-Parada et al. 2004*). Die erhöhte Expression der meisten dieser

Proteine kann u. U. auf eine Feedback-Regulation dieser Gene hindeuten, welche aufgrund der erhöhten Prozessierung nötig ist, um die Funktion aufrechtzuerhalten. Eine weitere Gruppe an regulierten Genen sind Gene, welche an den Funktionen der Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten beteiligt sind. Diese Zellen dienen der Kontrolle und Reorganisation der neuronalen Netzwerke. So sind z.B. die Gene des MOBP (*Yoshikawa H 2001*), der CNPase, des PLP sowie verschiedene Myelin-Proteine im Vergleich zu den Kontrollen erhöht exprimiert. Dies deutet auf eine verstärkte Aktivität dieser Zellen hin, was wiederum die These der gesteigerten Neuroregeneration unterstreicht.

Da die wesentliche Grundlage der Alzheimer-Erkrankung die veränderte Prozessierung des APPs ist, wurde eine Anzahl von Genen, welche an diesen Prozessen beteiligt sind, bzgl. ihrer Genexpression nochmals genauer betrachtet. Dabei zeigte sich, dass zwei Untereinheiten der γ -Sekretase, das Presenilin 1 und die Aph-1a, auf Gen-Ebene eine erhöhte Expression zeigen. Dies würde zur Theorie der Bildung der Amyloid-Plaques passen, wonach die γ -Sekretase die Bildung der A β -Fragmente ermöglicht. Leider zeigen die Ergebnisse nur eine gering gesteigerte Expression und haben nur eine sehr geringe Signifikanz, weshalb weitere Analysen dieser Gene nötig sind, um definitive Aussagen machen zu können.

Da eine Ablagerung der A β -Fragmente auch durch eine mangelhafte Beseitigung der Peptide verursacht werden könnte, wurden Gene verschiedener Transporter und Rezeptoren betrachtet. Diese Analyse ergab, die verringerte Expression des LRP2 Rezeptors, dessen Ligand, das APOE, bereits deutliche Korrelationen zur Alzheimer-Erkrankung gezeigt hat. Die weiteren betrachteten Gene zeigten keine veränderte Expression.

All dieser Ergebnisse deuten auf eine Veränderung der APP-Prozessierung und Amyloid A β -Beseitigung auf Genexpressions-Ebene hin. Leider wurde bisher noch keine genaue Analyse der Veränderungen publiziert. Dies mag daran liegen, dass genaue Analysen dieser Gene, aufgrund der fehlenden Möglichkeit einer Biopsie von Gehirn-Material, schwierig sind.

C. 2. Genexpressionanalyse von Endothel-Zellen in Alzheimer Erkrankung

Da es im Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung oft zu Ablagerung von A β -Peptiden in den Gehirngefäßen kommt, was als Amyloid-Angiopathie beschrieben wird, und es beschrieben ist, dass Veränderungen der Gefäße einen wesentlichen Einfluss auf die Erkrankung haben können, wurde versucht, die Genexpression der Gefäße genauer zu analysieren. Dazu wurden Endothelzellen der humanen Proben mittels LCM angereichert und von diesen die Genexpression für die Gruppen AD und Kontrolle analysiert.

Die Analyse der Proben des Frontallappens mittels Gruppenanalyse zeigte, dass zwei Proben der AD-Gruppe nicht in die anderen Gruppen mit eingegliedert wurden, weshalb sie aus der Analyse heraus genommen werden mussten. Aus den verbleibenden Gruppen wurden 154 Gene identifiziert, welche eine differentielle Genregulation zeigten.

Diese Liste enthielt verschiedene Gene, welche bereits eine Korrelation mit AD gezeigt hatten. Darunter waren verschiedene proliferatorische Faktoren wie FGF2, aber auch verschiedene Gene, welche an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind wie z.B. TNF-Rezeptoren oder CXCL9. Der Grossteil der Ergebnisse beschreibt jedoch bisher nicht publizierte Gene, deren Korrelation zu AD noch nicht diskutiert wurde.

In Hinsicht auf die Arbeitshypothese, dass Transporter, welche an der Beseitigung der Amyloid-Plaques beteiligt sind, erwartet wurden, wurde die Liste in Hinblick auf Transporter/Rezeptoren weiter analysiert. Es wurden 26 Gene identifiziert, welche der funktionellen Gruppe der Transporter und Rezeptoren zugewiesen werden können. Diese Gene zeigten zu 75% eine erniedrigte Genexpression in der Alzheimer-Erkrankung. Dies könnte einen verringerten Transport verschiedener Moleküle und Proteine zwischen Parenchym und Blut begründen und somit auch einen verringerten Abtransport der A β -Fragmente erklären. So gibt es Hinweise, dass der Low density lipoprotein Rezeptor genauso an der Beseitigung beteiligt ist (*Abdulkarim Y, Hameed Z. 2006*) wie auch Integrin Beta 1 (*Bozzo C et al. 2004*).

Viele der Ergebnisse waren Gene, welche bis jetzt noch keine Korrelation zu AD gezeigt haben. Deshalb erscheint eine genauere Analyse der einzelnen Gene viel versprechend, um bisher nicht betrachtete Prozesse der Alzheimer Erkrankung zu identifizieren.

D. Vergleich der Genexpressionsveränderungen verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen

Der Vergleich der Prozesse zwischen den beiden analysierten Erkrankungen zeigte, dass die Alzheimer-Erkrankung in ihrer Regulation teilweise den frühen und teilweise den späten Phasen nach der Ischämie ähnelt.

So zeigte sich für den Prozess der Apoptose, dass in der AD eine ähnliche schwache Beteiligung des Prozesses vorliegt, wie in den späten Phasen nach der Ischämie. Gleichzeitig zeigt die Betrachtung der Prozesse der Neuroinflammation, dass in der AD eine wesentlich geringere Beteiligung dieses Prozesses zu finden ist als nach der Ischämie.

Der Vergleich der Neuroregeneration zeigt, dass es in der AD zu einer ähnlich starken Regulation dieses Prozesses kommt wie nach der Ischämie. Diese liegt im Mittelwert der Regulationsunterschiede, welche in der MCAO ermittelt wurden. Dies deutet darauf hin, dass es auch in der AD zu Prozessen kommt, welche die Neubildung von Zellen und Geweben fördern und somit der Regeneration dienen. Diese Prozesse werden bereits von einigen Gruppen diskutiert (*Hoozemans et al. 2005*) und dienen als Grundlage einiger Therapieansätze.

Die Regulation der Zelladhäsion in der AD zeigt ein ähnlich starkes Ausmaß wie die höchsten Werte nach der Ischämie. Da gleichzeitig die Inflammation nur geringe Ausmaße annimmt, erscheint dies verwunderlich. Dies kann jedoch, wie bereits bei der Betrachtung der AD alleine diskutiert, dadurch verursacht sein, dass der Alzheimer-Erkrankung eine fehlerhafte Prozessierung von Zelladhäsionsmolekülen zu Grunde liegt. Dies könnte zu einer Feedback-Reaktion der Gene führen, welche durch eine zusätzliche Expression der vermehrten Prozessierung entgegen wirkt.

Die Bedeutung dieses Prozesses nach der Ischämie ist jedoch nicht deutlich zu bestimmen. So kann es sowohl in Hinsicht einer Neuroregeneration als auch in Hinsicht der Leukozyteninvasion von Bedeutung sein.

Die in der Prozessanalyse gefundene Beteiligung der verschiedenen Prozesse spiegelt sich auch in der Betrachtung der gemeinsam differenziell exprimierten

Gene wieder. Obwohl diese Gengruppe wesentlich kleiner als erwartet ist, enthält sie einige Gene der Neuroinflammation, -regeneration und Signaltransduktion.

Dass die Ergebnisgruppe dennoch so gering ist, mag dadurch begründet sein, dass die betrachteten Erkrankungen doch wesentlich unterschiedlicher sind, als von uns angenommen. Obwohl es in beiden Erkrankungen zu ähnlichen Prozessen kommt, scheinen diese über unterschiedliche Signalkaskaden und auch Entzündungsmediatoren zu verlaufen.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Neuroinflammation in der akuten Neurodegeneration, der Ischämie, eine wesentlich wichtigere Rolle spielt, als in der chronischen Neurodegeneration, der Alzheimer Erkrankung, zumindest im Stadium des fortgeschrittenen AD (Gewebeproben dieser Studie). Dies ist vermutlich dadurch zu erklären, dass es in der AD zu einer schwächeren oder auch anders gerichteten Inflammation kommt als nach der Ischämie. In der AD kommt es z. B. nicht zur Chemotaxis von Leukozyten und im Fall einer geschlossenen Bluthirnschranke auch nicht zur Invasion dieser Zellen. Da eine Hauptaufgabe der Neuroinflammation genau diese Aktivierung von Immunzellen ist, erklärt dies vermutlich einen Teil der geringen Regulation.

Zusätzlich ist zu beachten, dass nach der Ischämie eine großflächige Verletzung des Gewebes vorhanden ist, welche behoben werden muss, wohingegen es bei einer chronischen Erkrankung nicht zu einer großflächigen Gewebsverletzung kommt.

In einer chronischen Neuroinflammation ist eine starke Entzündungsreaktion außerdem nicht zu erwarten, da dies über den langen Verlauf der Erkrankung schwerwiegende Schäden, durch sekundäre Effekte der beteiligten Immunzellen, verursachen würde.

Andererseits zeigt sich, dass es in beiden Formen der Neurodegeneration zu Prozessen kommt, welche eine Regeneration des Gewebes fördern. Dies zeigt sowohl die wesentliche Beteiligung proliferatorischer Prozesse als auch der Zelladhäsion und Signaltransduktion.

Die zeitlich sehr lang andauernde Beteiligung von neuroinflammatorischen und neurodegenerativen Prozessen beim Schlaganfall auf der einen Seite und die doch unerwartet hohe Beteiligung von regenerativen Prozessen bei der chronischen Neurodegeneration AD auf der anderen Seite sind die wesentlichen neuen

Befunde dieser Studie und schaffen damit die Basis für neue vielversprechende Ansatzpunkte für zukünftige diagnostische und kurativ-therapeutische Ansätze im Bereich akuter und chronischer Neurodegenerationen.