

# **1. Einleitung**

## **1.1 Epidemiologie der Alzheimer-Demenz**

Die Demenz vom Alzheimer-Typ (AD) stellt mit einer Gesamtprävalenz von bis zu 7,7% bei den über 65jährigen den größten Anteil der Demenzerkrankungen dar (Stevens et al. 2002; Rahkonen et al. 2003). Dabei findet man in den untersuchten Populationen einen exponentiellen Anstieg der Prävalenz von 1,4% bei den 65-70jährigen bis hin zu 25-40% bei den über 85jährigen (Jorm et al. 1987; Evans et al. 1989).

In der Ätiologie der seltenen familiären Form der Erkrankung spielen unter anderem Genmutationen eine Rolle. Bei dieser autosomal-dominant vererbten Form der AD sind Mutationen auf den Genen für das Amyloid-Präkursor-Protein (APP) auf dem Chromosom 21 (Selkoe 1993), für das Präsenilin 1 auf Chromosom 14 und für das Präsenilin 2 auf Chromosom 1 nachgewiesen worden (Hardy 1997; Steiner et al. 1999). Ein Risikogen sowohl für die familiäre als auch sporadische Form der AD ist die ApoE4-Allelvariante des Apolipoproteins auf Chromosom 19 (Duff 1997; Saunders 2000). Die Ätiologie für die weitaus häufigere, sporadisch und somit nicht familiär gehäuft auftretende Form der AD ist bis heute noch weitgehend ungeklärt.

Derzeit ist es nicht möglich, die Krankheit kurativ zu behandeln, allenfalls eine palliative Behandlung ist bis jetzt möglich.

## **1.2 Neurochemische Veränderungen im Alzheimer-Gehirn**

Als gesichert geltende neurochemische Veränderungen in Gehirnen von Patienten mit AD sind ein verminderter Acetylcholin-Gehalt und eine Reduktion der Aktivität des Enzyms Cholinacetyltransferase (ChAT) im Neocortex (Bartus et al. 1982; Collerton 1986; Gottfries 1990). Dieses cholinerge Defizit ist am ausgeprägtesten in temporalen und limbischen kortikalen Strukturen, im Hippocampus und dem Corpus amygdaloideum (Amygdala) (Brun und Gustafson 1976; Davies und Maloney 1976; Bowen und Davison 1986). Dies sind Regionen, die konstant die ausgeprägtesten pathologischen Veränderungen in Frühstadien der Erkrankung zeigen (Fewster et al. 1991). Das Ausmaß der ChAT-Aktivitätsminderung korreliert hierbei auch gut mit der Schwere der Demenz (Bowen und Davison 1986).

Nahezu die gesamte cholinerge Innervation des Neocortex stammt aus dem basalen Vorderhirn, vor allem dem Nucleus basalis Meynert (NBM), dem Nucleus septi medialis und dem Nucleus des diagonalen Bandes (Coyle et al. 1983). Dieses cholinerge System im basalen Vorderhirn degeneriert früh und regelmäßig bei der AD und anderen dementiellen Erkrankungen (Whitehouse et al. 1982; Arendt et al. 1983). Ihm wird eine wichtige Rolle für Gedächtnisfunktionen zugeschrieben, wofür es eine Vielzahl von Hinweisen aus neuropathologischen, neurochemischen, pharmakologischen und Verhaltensstudien gibt (Perry 1986; Chozick 1987; Cummings und Benson 1987; Perry 1994). Die „cholinerge Hypothese“ der AD impliziert nun einen Zusammenhang zwischen der beschriebenen zentralen cholinergen Dysfunktion und den kognitiven Störungen (Bartus et al. 1982; Perry 1986).

Das cholinerge System im basalen Vorderhirn besteht aus zwei Hauptbündeln: zum einen aus cholinergen Neuronen mit Ursprung im Nucleus septi medialis (Ch 1) und dem Nucleus des vertikalen Schenkels des diagonalen Bandes (Ch 2) mit Projektion zum Hippocampus, zum anderen aus Neuronen mit Ursprung im Nucleus basalis magnocellularis bei der Ratte bzw. im Nucleus basalis Meynert beim Menschen (Ch 4) mit Projektion zum gesamten Neocortex und der Amygdala (Mesulam et al. 1983; Butcher und Semba 1989; Mesulam 1990; Mesulam 1995). Die Dichte der cholinergen Fasern im Neocortex ist dabei sehr variabel mit größter Dichte in limbischen und paralimbischen Bereichen. Diese Bereiche sind die wahrscheinlich einzigen cholinerg innervierten Regionen im cerebralen Cortex, die wesentliche Projektionsfasern zurück zu den cholinergen Neuronenpopulationen des basalen Vorderhirns führen (Mesulam 1990). Zur Untersuchung der physiologischen Auswirkungen des cholinergen Systems im basalen Vorderhirn wurden zahlreiche Studien durchgeführt. Hier wurden unter anderem einzelnen Neuronengruppen gezielte Läsionen gesetzt und deren Auswirkungen auf kognitive Funktionen untersucht (Dunnett 1994). Daneben existieren auch diverse Beobachtungen zur Wirkung systemisch verabreichter anticholinerg Substanzen (Dunnett und Barth 1991), deren gedächtnisbeeinträchtigende Eigenschaften beim Menschen gut bekannt sind (Christensen et al. 1992).

Es ist jedoch bekannt, dass neben dem bereits erwähnten cholinergen auch andere neuronale Systeme im Zentralen Nervensystem (ZNS) von Alzheimer-Patienten degenerieren, wobei vor allem serotoninerge und noradrenerge Neurone betroffen sind. Die noradrenergen Neurone

scheinen besonders bei präsenilem Beginn und aggressivem Verlauf sowie depressiver Begleitsymptomatik betroffen zu sein (Bondareff et al. 1987).

Des Weiteren wurden noch Störungen von glutamatergen,  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)-ergen und dopaminergen Neuronen beschrieben, außerdem sollen auch Corticotropin Releasing Factor, Neuropeptid Y und Somatostatin im Alzheimer-Gehirn vermindert sein (Dunnett 1994). Weitere Studien ergaben noch andere Beeinträchtigungen, so wurden Störungen des cerebralen Glucosestoffwechsels und des oxidativen Metabolismus sowie der interzellulären Signaltransduktion beschrieben (Blass 1993; Hoyer 1994). Die Bedeutung dieser Veränderungen für die Pathophysiologie der AD ist jedoch unklar und die Abgrenzung zur allgemeinen Degeneration verschiedenster neuronaler Systeme im Alter oft schwierig (Adams und Victor 1993).

Da das cholinerge Defizit die ausgeprägteste Neurotransmitterveränderung bei der AD darstellt und bei nahezu allen Erkrankten vorliegt (Whitehouse et al. 1982), ist es weiterhin ein sehr wichtiger Baustein im pathophysiologischen Konzept der Erkrankung, sollte aber im Kontext der anderen beschriebenen Störungen gesehen werden.

Auch die funktionelle Bedeutung zentraler cholinergischer Neurone ist, im Vergleich zu den anderen involvierten Transmittersystemen, recht gut untersucht und für die klinische Symptomatik relevant. Eine im Verlauf der Erkrankung frühe Veränderung scheint die Degeneration zentraler cholinergischer Neurone zu sein, die eventuell in frühen Krankheitsstadien auch von diagnostischem Wert sein könnte. Man fand in einer Studie eine deutliche Hypersensitivität gegenüber Anticholinergika-haltigen Augentropfen bei 95% der untersuchten AD-Patienten und bei einem nicht-dementen Patienten, der aber 9 Monate später eine kognitive Störung im Sinne einer AD entwickelte (Scinto et al. 1994).

### **1.3 Histopathologische Veränderungen im Alzheimer-Gehirn**

Die Gehirne von an Alzheimer-Demenz (AD) Erkrankten zeigen übereinstimmende morphologische Charakteristika (Alzheimer 1907; 1911; Braak und Braak 1993). Hierbei sind zum einen die neuropathologisch für die AD charakteristischen intrazellulären neurofibrillären „Tangles“ zu erwähnen, welche pathologisch hyperphosphorylierte Tau-Proteine sind, die die Mikrotubuli der Axone verklumpen. Zum anderen findet man neuritische Amyloid-Plaques, welche aus einem transmembranösen Protein bestehen, einem

Spaltprodukt des APP (Masters et al. 1985). Bei diesem Spaltprodukt handelt es sich um das A $\beta$ -Amyloid, welches ein A $\beta$ -Protein mit der Tendenz zur Aggregation ist, bestehend aus hauptsächlich 40 bis 42 Aminosäuren und einer  $\beta$ -Faltblattstruktur (Wisniewski et al. 1997). Die Bedeutung dieser Amyloidablagerungen für die Pathogenese der AD wird kontrovers diskutiert (Giannakopoulos et al. 1997; Hardy 1997; Hörtnagl und Hellweg 1997b). 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). Genauer betrachtet führen im Rahmen der „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ die APP-Mutationen zu einer Stimulation von  $\beta$ -Sekretasen, die zu einer erhöhten Fragmentierung des APP-Proteins und schließlich zu einer Anhäufung von A $\beta$ -Protein führen. Die Präsenilinmutationen potenzieren bei dieser Kaskade allein oder in Kombination mit APP-Genveränderungen die A $\beta$ -Amyloid-Bildung über Beeinflussung der  $\gamma$ -Sekretasen, so dass verstärkt A $\beta$ 42 akkumuliert und sich schließlich Amyloid-Plaques bilden (Hardy 1997; Steiner et al. 1999). Eine Hypothese besagt, dass diese Amyloid-Plaques neuronale Schaltkreise beeinträchtigen (Hyman et al. 1984; Geula 1998) oder neuronale Verbindungen unterbrechen, was zum Funktionsverlust derselben führt und in Demenz endet (Knowles et al. 1998; Phinney et al. 1999). Nach wie vor ist jedoch der Zusammenhang nicht nachzuweisen, da immer auch andere Läsionen wie zum Beispiel neurofibrilläre Tangles vorliegen. Auch wurde unphysiologisches dystrophisches Aussprossen von Axonen (Geddes et al. 1986) sowie die Bildung von Mikroglia in Plaquesbereichen, die über Entzündungsprozesse die Neurodegeneration vorantreiben, beobachtet (Itagaki et al. 1989; Mackenzie et al. 1995; Stalder et al. 1999). Letzteres erklärt auch Behandlungsversuche mit nicht-steroidalen Antiphlogistika (McGeer et al. 1996; Stewart et al. 1997), die jedoch wie viele andere therapeutische Ansätze bisher keine durchschlagenden Erfolgsergebnisse bei der Behandlung der AD zeigten.

#### **1.4 Transgene Tiermodelle der Alzheimer Demenz**

Da aus wissenschaftlicher Sicht sicherlich wünschenswerte Studien beim Menschen zur Erforschung der Veränderungen verschiedener neurochemischer Parameter bei der AD oft aus

ethischen wie aus praktischen Gründen nicht möglich sind, wird hierfür meist auf Tiermodelle zurückgegriffen. In einem idealen Tiermodell der AD müsste der neuropathologische Verlauf der menschlichen Erkrankung möglichst genau imitiert werden. In den Gehirnen der meisten alternden Säugetiere kommen jedoch gerade die für die AD charakteristischen neuropathologischen Veränderungen wie Amyloid-Plaques und Alzheimer'sche Neurofibrillenveränderungen nicht vor (Dunnett 1994), altersassoziierte neurochemische Veränderungen wie beim Menschen einschließlich entsprechender Störungen der verschiedenen Neurotransmittersysteme lassen sich jedoch auch hier finden (Dunnett 1994; Hörtnagl und Hellweg 1997a). So konnten in den bisherigen Tiermodellen immer nur Teilaspekte der Erkrankung untersucht werden.

In jüngerer Zeit haben vor allem transgene Mäuse, bei denen einzelne Gene spezifisch eliminiert wurden (sogenannte „knockout“-Mäuse), immer größere Bedeutung erlangt. Zur Erforschung der AD wurden u.a. APP-überexprimierende Mäuse, die zudem die bei familiärer AD gefundenen Mutationen im APP-Gen aufweisen, herangezogen (Games et al. 1995; Hsiao et al. 1995; Hsiao et al. 1996; Duff 1997; Hsiao 1998a; b). Auch Mäuse mit Trisomie des bei der Maus das APP-Gen tragenden Chromosoms 16, die infolge dessen Entwicklungsauffälligkeiten und altersabhängige Neurodegenerationen zeigten, wurden untersucht (Holtzman et al. 1993; Holtzman et al. 1996). Tatsächlich sind für derartige transgene Tiere Lerndefizite wie häufigere Fehlversuche im Water-Maze-Test (Morris 1984) und Verhaltensauffälligkeiten (Chapman et al. 1999; Chen et al. 2000) sowie einige neurochemische und morphologische Veränderungen im fortschreitenden Alterungsprozess gezeigt worden (Duff 1997; Holcomb et al. 1998). Weiterhin zeigte eine Versuchsreihe mit APP-überexprimierenden Mäusen neben einem gestörten Lernverhalten auch Defizite der hippokampalen *long-term-potentiation* (LTP) (Chapman et al. 1999), einem weit verbreiteten neurobiologischen Modell für Lern- und Erinnerungsprozesse (Patterson et al. 1992; Castren et al. 1993).

Im Rahmen der Entwicklung transgener Tiermodelle der AD zeigten jedoch nicht alle Mutationen gleiche phänotypische Veränderungen. So wurden aufgrund der beim Menschen auftretenden familiären Form der AD, die mit APP- und Präsenilin-Genveränderungen einhergeht, verschiedene Mutationen in das Erbgut der Maus eingeschleust. Während des Alterungsprozesses traten abhängig von der Art der Mutation zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in unterschiedlicher Dichte Amyloidablagerungen im ZNS auf. Als am

besten geeignetes transgenes Tiermodell zur Erforschung der AD erwies sich das Modell der APP23-Mäuse mit der „Schwedischen-Doppelmutation“ (KM670/671NL), die im Gegensatz zu den APP14-Mäusen und den APP22-Mäusen (Kombination aus Schweden- und Londonmutation) APP bis zu siebenfach höher exprimierten. Bei gleicher Mutation unterscheiden sich APP14- und APP23-Mäuse im Promoter, der bei APP14-Mäusen human-Thy1 und bei APP23-Mäusen mouse-Thy1 ist. Dabei entwickelten die APP23-Mäuse die ersten typischen A $\beta$ -Ablagerungen umgeben von dystrophischen Neuriten sowie Astro- und Mikrogliose bereits im Alter von 6 Monaten und zeigten einen dramatischen Anstieg insbesondere im kortikalen und hippocampalen Bereich bis zum Alter von 24 Monaten (Sturchler-Pierrat et al. 1997; Sommer und Staufenbiel 1998; Bornemann und Staufenbiel 2000; Bornemann et al. 2001). Dabei zeigte sich aktivierte Mikroglia vor allem in der Umgebung von kompakten Plaques, nicht jedoch aber von Plaques diffusen Typs (Stalder et al. 1999).

Von uns wurden nun transgene APP23-Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten im Rahmen einer longitudinalen Studie untersucht, da sie lebenslang eine pathologische APP-Überexpression aufzeigen und damit den im Rahmen der „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ vermuteten jahrzehntelangen präklinischen Verlauf der AD (Price und Morris 1999) modellhaft widerspiegeln. Die APP22-Mäuse zeigten dagegen beginnende Ablagerungen erst nach 18 Monaten, die APP14-Mäuse keine Hinweise auf für die AD typische Veränderungen. Allerdings wies keine der verschiedenen Maus-Reihen neurofibrilläre Tangles auf, wobei jedoch zumindest Immunoreaktivität gegenüber hyperphosphoryliertem Tau-Protein auftrat. Zusätzlich wurden bei den APP23-Mäusen Degenerationen cholinergischer Neuriten beobachtet, so dass sich Hinweise auf einen möglichen kausalen Zusammenhang mit den A $\beta$ -Ablagerungen ergaben (Sturchler-Pierrat et al. 1997). Bei Kreuzung der APP23-Mutation mit Tieren, die die Präsenilin1-Mutation (PS1 ML146) besaßen, zeigten sich sogar noch frühere und größere A $\beta$ -Ablagerungen. Auch waren hier Störungen in den räumlichen Gedächtnisleistungen bereits vor Auftreten der A $\beta$ -Ablagerungen nachweisbar, so dass ein den Ablagerungen vorangehender Prozess angenommen werden muss, der zu den Veränderungen führt. Einhergehend mit den A $\beta$ -Plaques zeigte sich ein neuronaler Verlust im kortikalen und hippocampalen Bereich, wie er auch bei der AD beschrieben ist. Hierbei zeigte vor allem die hippocampale Area CA1 einen Neuronenverlust von bis zu 25%, der darüber hinaus in positiver Korrelation zu der Plaque-Dichte stand (Calhoun et al. 1998). Ebenfalls

beobachtet wurde ein unphysiologisches dystrophisches Aussprossen von Axonen sowie die Bildung von ektopen entorhinalen Neuronenpopulationen nach Amyloid-Plaquesbildung (Phinney et al. 1999).

Mit Hilfe dieser transgenen Tiere wurde nun begonnen, die Zusammenhänge zwischen Entstehung von Amyloid-Plaques und ihrer Rolle im Entwicklungsprozess der AD besser verstehen zu lernen. So fand man heraus, dass nicht allein eine lokale Produktion von A $\beta$ -Amyloid oder eine Aufnahme von A $\beta$ -Amyloid über das Blut, sondern auch Transport- und Abflussmechanismen primäre Ursachen der Plaquesbildung darstellen können (Calhoun et al. 1999).

Neben den APP-überexprimierenden Tieren, die bereits viele, jedoch nicht gleichzeitig alle der bei der AD auftretenden pathologischen Veränderungen aufweisen (Hsiao 1998a), gibt es noch weitere transgene Tiermodelle zur AD. Ein erst kürzlich beschriebenes Modell stützt sich auf Tiere, die einen Antikörper (AK) gegen das Neurotrophin *nerve growth factor* (NGF) bilden, wobei die anti-NGF-Antikörper-Konzentration altersabhängig bis zur dreifachen Konzentration ansteigt (Ruberti et al. 2000). Diese Tiere entwickeln ebenfalls altersabhängige neurodegenerative Veränderungen wie Amyloid-Plaques, unlösliche und hyperphosphorylierte Tau-Proteine und neurofibrilläre Tangles in corticalen und hippocampalen Regionen; weiterhin wurden extensive neuronale Verluste im Cortex, cholinerge Defizite im basalen Vorderhirn und Verhaltensauffälligkeiten beschrieben (Capsoni et al. 2000).

Somit zeigen sich bei diesem die AD bisher am besten widerspiegelnden transgenen Tiermodell deutliche Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Erkrankung und gestörtem Neurotrophintransport und/oder -signalen. Diese Erkenntnis bestärkt die Hypothese, wonach ein zumindest vorübergehender Neurotrophinmangel ursächlich sein könnte für die bei der AD auftretenden neurodegenerativen Veränderungen (Hellweg und Jockers-Scherübl 1994; Yuen et al. 1996; Yuen und Mobley 1996; Hellweg et al. 1998a; Hellweg et al. 1998b).

## **1.5 Die Familie der Neurotrophine**

Die Entdeckung des ersten Neurotrophins, des Nervenwachstumsfaktors NGF, erfolgte eher zufällig. Damals wurde beobachtet, dass bei der Implantation von Maus-Sarkomgewebe in

Hühnerembryonen eine ausgeprägte Innervation des Tumors durch sensorische Nervenfasern erfolgte (Bueker 1948). Der spätere Nachweis, dass für die Stimulation des neuronalen Wachstums ein löslicher Faktor ursächlich war, führte zum Konzept des „target derived neurotrophic factor“ (Thoenen und Barde 1980; Barde 1989; Korsching 1993). Diesem Konzept zufolge steuern die Zielzellen („targets“) ihre Innervation mit Hilfe spezifischer Nervenwachstumsfaktoren, den so genannten Neurotrophinen. Diese Peptide werden unter physiologischen Bedingungen nur in sehr niedrigen Konzentrationen synthetisiert (Davies 1996) und entfalten auch *in vitro* ihre Wirkung bereits bei Konzentrationen im picomolaren Bereich (Meakin und Shooter 1992; Götz und Scharf 1994).

NGF-sensitive Neurone erreichen mit ihren Neuriten dem Konzentrationsgradienten von NGF folgend ihre Zielzellen (sogenannter Neurotropismus). NGF wird dabei von NGF-sensitiven Neuronen zusammen mit seinem Rezeptor (NGFR) als Komplex internalisiert (Levi et al. 1980), welcher dann retrograd zum Perikaryon transportiert wird (Hendry et al. 1974) und im Zellkern prinzipiell vergleichbar der Signaltransduktion von Steroidhormonen die Differenzierung des Neurons bewirkt (Lewin und Barde 1996).

Großen Mengen von NGF wurden überraschender Weise im Speichel der männlichen Maus entdeckt. Nun waren erstmals, nach Gewinnung aus der Glandula submandibularis, ein experimenteller Einsatz von NGF und die Entwicklung spezifischer anti-NGF-AK möglich, um die biologischen Funktionen von NGF zu entschlüsseln (Levi-Montalcini und Calissano 1979; Thoenen und Barde 1980).

Die Entdeckung von NGF trug wesentlich zum Verständnis der Entwicklung und Plastizität des Nervensystems bei. So wird NGF von peripheren sympathischen und sensorischen Neuronen, die der Neuralleiste entstammen, sowie vornehmlich von cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns während der neuronalen Entwicklung zur Differenzierung und zum Wachstum benötigt. Nach Abschluss der neuronalen Entwicklung wird NGF von NGF-sensitiven Neuronen zur Aufrechterhaltung diverser zellulärer Funktionen und im Falle der sympathischen Neurone auch zum Überleben benötigt (Thoenen und Barde 1980; Levi-Montalcini 1987; Korsching 1993; Hellweg und Jockers-Scherübl 1994; Lewin und Barde 1996; Hellweg et al. 1998b).

In der Folgezeit wurden nun weitere, für andere Neuronenpopulationen wirksame Neurotrophine entdeckt (Thoenen 1991; Barde 1994). Dazu gehören bisher mit eigenständigen biologischen Wirkungen der *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF),



Neurotrophin (NT)-3, NT-4/5 (Ebendal 1992), NT-6 (Götz et al. 1994) und NT-7 (Lai et al. 1998). Mittlerweile lässt sich die Familie der neurotrophen Faktoren in vier verschiedene Superfamilien aufteilen, die NGF-Familie, die *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF)-Familie, die Neurokin- oder Neuropoietinfamilie sowie die *non-neuronal growth factor*-Familie (Übersicht bei Siegel und Chauhan 2000). Dabei ist die Aminosäuresequenz dieser vergleichsweise kleinen Genfamilie der Neurotrophine DNA-Analysen zufolge bei Vertebraten im Laufe der Evolution in weiten Bereichen konserviert geblieben (Ebendal 1992; Barde 1994; Götz und Schartl 1994; Ebadi et al. 1997). So sind ca. 50% der Aminosäuresequenzen bei allen Neurotrophinen identisch, die für die einzelnen Neurotrophine kodierenden Gene sind auch speziesabhängig auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. So ist das Gen für das neurotrophe Vorläufermolekül von NGF beim Menschen auf Chromosom 1 lokalisiert, das der Maus auf Chromosom 3 (Zabel et al. 1985), während die Gene von humanem BDNF und NT-3 auf den Chromosomen 11 bzw. 12 liegen (Maisonpierre et al. 1991).

Neurotrophine agieren nicht nur als Wachstumsfaktoren und Regulatoren für bestimmte sich entwickelnde und bestehende neuronale Systeme auf retrograden Signalwegen, sondern auch auf parakrinem und autokrinem Weg (Yuen et al. 1996; Yuen und Mobley 1996; Siegel und Chauhan 2000). Man fand heraus, dass bestimmte Faktoren wie BDNF und NT-3 auch auf anterogradem Weg postsynaptische Neuronenpopulationen und möglicherweise Gliazellen beeinflussen können (Altar und DiStefano 1998). Diese Faktoren unterstützen das neuronale Überleben, stimulieren das axonale Wachstum und beeinflussen während der Entwicklung die Etablierung synaptischer Kontakte. Hierbei wird angenommen, dass wachsende Axone um die von Zielgeweben nur limitiert produzierten Neurotrophine konkurrieren (Grimes et al. 1996; Yuen et al. 1996; Yuen und Mobley 1996). Neurone, die keine ausreichende Menge notwendiger Neurotrophine erlangen, sterben durch den Prozess des programmierten Zelltods ab (Thoenen et al. 1987b; Barde 1989; Davies 1996; Connor und Dragunow 1998). Es ist somit sehr gut vorstellbar, dass Veränderungen der Regulationsmechanismen spezifischer Neurotrophine oder ihrer Rezeptoren einen kritischen und zentralen Punkt im Entstehungsprozess neurodegenerativer Erkrankungen darstellen (Connor und Dragunow 1998), wobei die genaue ätiologische Klärung durch ein mögliches Zusammenspiel zwischen den einzelnen Neurotrophinen und Neurotrophinfamilien und die damit verbundenen sich ergänzenden oder überschneidenden Wirkspektren weiter erschwert wird (Ibanez 1998).

## 1.6 NGF und NT-3 – Funktion und Rezeptoren

NGF scheint als überlebens- und funktionsstützender Faktor für cholinerge Neurone des basalen Vorderhirns, die bereits in einem frühen Krankheitsstadium der AD degenerative Veränderungen aufweisen (Whitehouse et al. 1982; Mufson und Kordower 1989), große Bedeutung zu haben (Ha et al. 1999; Siegel und Chauhan 2000).

Weiterhin ist die Rolle des relativ „jungen“ Neurotrophins NT-3 hinsichtlich seiner Rolle im Rahmen der AD in jüngster Zeit untersucht worden, jedoch mit widersprüchlichen Resultaten (Murase et al. 1994; Narisawa-Saito et al. 1996; Durany et al. 2000).

So wurden in der hier vorliegenden Studie die Konzentrationen von NGF und NT-3 in verschiedenen Regionen des ZNS und im Nervus Ischiadicus transgener APP23-Mäuse als Tiermodell der AD bestimmt.

### 1.6.1 Rezeptoren von NGF und NT-3

Neurotrophine binden nach Ausschleusung in den Extrazellulärraum an membranständige Proteine neurotrophinsensitiver Zellen. Dabei sind die Neurotrophine einzigartig darin, zwei verschiedene Rezeptortypen zu binden (Lee et al. 2001a), zum einen den niedrig-affinen p75-Rezeptor aus der Gruppe der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren (TNF-Rezeptoren), zum anderen die hoch-affinen Trk-Tyrosinkinase-Rezeptoren aus der Familie der Proto-Onkogene (Kaplan und Miller 1997; Chao et al. 1998; Friedman und Greene 1999; Kaplan und Miller 2000). Von den hoch-affinen Trk-Rezeptoren sind einige zehntausend pro Zelle, von den niedrig-affinen p75-Rezeptoren vier bis zehn Mal mehr vorhanden (Eide et al. 1993; Lewin und Barde 1996). Der erste Vertreter der hoch-affinen Neurotrophin-Rezeptorfamilie wurde in der onkologischen Forschung als Onkogen entdeckt und trägt noch den ursprünglichen Namen *Trk* für *tropomyosin receptor kinase*, weil diese Tyrosinkinase in humanen Kolon-Carcinomzellen als Fusionsprotein mit Tropomyosin vorkommt (Barbacid 1994).

Die hoch-affinen Trk-Rezeptoren sind vor allem zur Übermittlung der überlebens- und wachstumsregulierenden Funktionen der Neurotrophine zuständig. Diese Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren umfasst TrkA, TrkB und TrkC, wobei NGF vorzugsweise mit TrkA interagiert, BDNF und NT4/5 TrkB bevorzugen und NT-3 vor allem an TrkC bindet (Martin-Zanca et al. 1989; Ip und Yancopoulos 1994; Barbacid 1995a; b). Die Aminosäuresequenzen der verschiedenen Neurotrophin-Tyrosinkinase-Rezeptoren weisen

innerhalb der Säuger eine hohe Sequenzhomologie auf (Shelton et al. 1995), wodurch erklärt werden könnte, warum Neurotrophine teilweise auch an andere als die von ihnen eigentlich bevorzugten Rezeptoren binden (Saltiel und Decker 1994). So bevorzugt beispielsweise NT-3 den TrkC, assoziiert aber auch mit dem TrkB und in noch geringerem Ausmaß mit dem TrkA-Rezeptor (Eide et al. 1993; Korsching 1993). Allerdings scheinen die Trk-Rezeptoren, anders als bei nicht-neuronalen Zellen, in einem neuronalen Zellverband vornehmlich mit ihren regulären Neurotrophinliganden zu interagieren (Ip et al. 1993b).

Die Aktivierung des Trk-Signalweges durch die Neurotrophine erfolgt nach dem allgemein etablierten Schema der Tyrosinkinase-Rezeptoren: liganden-induzierte Dimerisation, initiale Kinase-Aktivierung und Phosphorylierung in der „Aktivations-Schleife“, volle Kinase-Aktivierung und Autophosphorylierung der Tyrosine außerhalb der Schleife, Binden von Signalmolekülen an die phosphorylierten Tyrosine, Phosphorylierung und darauf folgende Aktivierung der gebundenen Signalmoleküle und Verbreitung mittels durch rezeptoraktivierte Signalmoleküle in gang gesetzte Kaskaden rezeptorunabhängiger Signalwege (Second Messenger System). Zur Zeit sind mehrere Substrate für den Trk-Rezeptor bekannt, z.B. Phospholipase C- $\gamma$ , Phosphatidylinositol-3 Kinase und das Adapterprotein Shc, andere potentielle Substrate für den Trk-Rezeptor sind das Ras GTPase-aktivierende Protein und die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP) ERK1 (Kaplan und Stephens 1994).

Im Laufe der Zeit sind mehrere Isoformen der Trk-Rezeptoren identifiziert worden (Barbacid 1993; 1994). So fand man zwei Isoformen von TrkA, die sich in sechs Aminosäuren in der extrazellulären Domäne nahe der transmembranen Region unterscheiden. Beide Isoformen scheinen ähnliche biologische Eigenschaften, aber unterschiedliche Ausprägungsformen zu haben. So findet man die eine Isoform vorzugsweise auf neuronalen Zellen, die andere auf Zellen nicht-neuronalen Ursprungs (Barker et al. 1993; Horigome et al. 1993).

Auf Basis der Analyse von TrkC cDNA-Klonen scheinen vier Isoformen der TrkC zu existieren, die sich von der ursprünglichen Form durch 14 (TrkC K14), 25 (TrkC K25) oder 39 (TrkC K39) zusätzliche Aminosäuren in der Mitte der katalytischen Kinase-Domäne unterscheiden. Dabei setzen sich die Aminosäuresequenz der TrkC K39 aus den Aminosäuresequenzen der TrkC K25 und K14 zusammen. Diese Isoformen sind allerdings defekt in Hinblick auf die Signalübermittlung (Lamballe et al. 1993; Tsoulfas et al. 1993; Valenzuela et al. 1993).

Daneben wurde noch eine zweite Klasse von Isoformen der Trk-Rezeptoren beschrieben (Barbacid 1994; Chao 1994), bei denen die katalytische Tyrosin-Kinase fehlt, die so genannten *truncated* Isoformen (TrkB.T; TrkC.T). Sie kommen, im Gegensatz zu den *full-length*-Formen, nicht nur auf neuronalen Zellen sondern auch auf Gliazellen vor. Diese trunkierten Rezeptoren haben die gleiche extrazelluläre und transmembranäre Struktur wie die regulären, kinasetragenden Trk-Rezeptoren, aber sie haben eine andere zytoplasmatische Domäne. Bis jetzt sind zwei TrkB- (Klein et al. 1990; Middlemas et al. 1991) und vier TrkC-Rezeptoren (Tsoulfas et al. 1993; Valenzuela et al. 1993; Menn et al. 1998) ohne Tyrosin-Kinase identifiziert worden. So scheinen z.B. die *truncated* Formen von TrkC eine wichtigere Rolle bei der Entwicklung sensorischer Nervenenden (Merkel-Endigungen) zu spielen als die ebenfalls vorhandenen kinasetragenden TrkA und TrkC (Cronk et al. 2002). Auch wurden beträchtliche Mengen TrkB.T und TrkC.T im erwachsenen Gehirn gefunden (Middlemas et al. 1991; Tsoulfas et al. 1993; Barbacid 1995a).

Der TrkA-Rezeptor findet sich vornehmlich auf cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns und im Striatum, aber auch in verschieden anderen, meist nicht-cholinergen Regionen des ZNS, z.B. im Hippocampus, dem Thalamus und der Amygdala (Venero und Hefti 1993; Sobreviela et al. 1994; Holtzman et al. 1995; Mufson et al. 1999).

Der TrkC-Rezeptor ist, wie der TrkB-Rezeptor, im gesamten ZNS verbreitet, besonders hohe Vorkommen fanden sich im Cerebellum, dem Hippocampus und dem Cerebralen Cortex (Barbacid 1994; Lindsay et al. 1994; Savaskan et al. 2000).

Die Neurotrophine binden alle außerdem an einen so genannten niedrig-affinen p75-Rezeptor. Dieser ist ein 75kD schweres, transmembranäres Glykoprotein aus der Familie der TNF-Rezeptoren und bindet jedes der Neurotrophine mit ähnlich niedriger nanomolarer Affinität (Chao 1994; Friedman und Greene 1999).

Von den 25 mittlerweile bekannten Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie wurde der p75-Rezeptor als erster identifiziert, weitere sind TNFR1, TNFR2, Fas, RANK und CD40 (Baker und Reddy 1998). Alle Mitglieder der TNF-Familie haben strukturell verwandte cysteinreiche Regionen in ihren extrazellulären Domänen. P75 ist ein untypisches Mitglied dieser Familie aufgrund seiner Eigenschaft, eher zu di- als zu trimerisieren, als Trk-Co-Rezeptor zu agieren und weil Neurotrophine strukturell in keiner Beziehung zu den Liganden stehen, die sonst an TNF-Rezeptoren binden.

Die p75-Rezeptoren haben zwei Hauptfunktionen. Zum einen agieren sie als Trk-Co-Rezeptoren, die die Neurotrophin-vermittelte Trk-Rezeptor-Aktivität verstärken oder unterdrücken können. Neben dieser modulatorischen Funktion können über p75-Rezeptoren auch eigene Signalwege aktiviert werden, die sowohl zur Apoptose als auch zum Überleben von Zellen führen können. Ferner ist der p75-Rezeptor als Mitglied der TNF-Rezeptoren auch für die Migration von Schwann-Zellen, die über p75-, nicht aber über Trk-Rezeptoren verfügen, verantwortlich (Anton et al. 1994).

Die durch p75-Rezeptoren aktivierten Signalwege sind noch genauer zu bestimmen, aber strukturelle und funktionelle Unterschiede zu anderen TNF-Rezeptoren lassen vermuten, dass die p75-Rezeptoren ihre Funktion über eigene Signalwege übermitteln (Roux und Barker 2002).

Mittlerweile hat man jedoch entdeckt, dass die Neurotrophine in bestimmten Konstellationen auch dazu in der Lage sind, mit hoher Affinität an den p75-Rezeptor zu binden. So bindet z.B. NT-3 mit höherer Affinität an p75-Rezeptoren sympathischer Neurone von Hühnerembryonen (Dechant et al. 1997), allerdings fördert dies nicht deren Überleben (Dechant et al. 1993). Eine weitere interessante Entdeckung war, dass das NGF Vorläufermolekül pro-NGF mit hoher Affinität an den p75-Rezeptor bindet und zu p75-induzierter Apoptose in den sympathischen Neuronen der Zellkulturen führte (Lee et al. 2001b). Dies legt die Vermutung nahe, dass sowohl die reife als auch die pro-Form der Neurotrophine p75-Rezeptoren aktivieren kann (Lee et al. 2001a).

Interessanterweise kann das Tollwut verursachende Rabies-Virus mit hoher Affinität den p75-Rezeptor binden, der so eventuell eine Eintrittspforte in die Zelle darstellt oder zumindest eine Rolle bei der Pathogenese der Krankheit spielt. Neuere Studien zeigen, dass auch das Herpes-Virus dort binden kann, so dass man vermutet, dass mehrere virale Glykoproteine hier binden können. Allerdings bindet das Virus an einer anderen Bindungsstelle als die Neurotrophine, so dass kein Wettbewerb um die Bindungsstellen zwischen Viren und Neurotrophinen herrscht (Langevin et al. 2002). Eine weitere Studie zeigte jedoch, dass die rabies-induzierte Nervenschädigung bei Mäusen mit hypomorphen p75-Rezeptoren nicht verzögert ist und der p75-Rezeptor somit keine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Krankheit zu spielen scheint (Jackson und Park 1999).

Die Verteilung des p75-Rezeptors im ZNS findet sich im basalen Vorderhirn der Ratte und des Menschen fast ausschließlich auf cholinergen Neuronen, wohingegen im Mittelhirn und

Hirnstamm dieser Zusammenhang nicht besteht (Hefti 1986; Mufson et al. 1989; Sobreviela et al. 1994; Holtzman et al. 1995). Im adulten Striatum ist der p75-Rezeptor nach kontinuierlichem Abfall während der postnatalen Entwicklung kaum noch nachweisbar (Mufson et al. 1989; Holtzman et al. 1992).

### **1.6.2 Physiologische Chemie und Funktionen von NGF und NT-3**

NGF wurde als erstes Mitglied aus der Reihe der Neurotrophine entdeckt und ist das am besten untersuchte Neurotrophin, auch im Hinblick auf experimentelle Modelle zur AD.

Es ist ein Protein, das sich aus drei dimeren Untereinheiten im stöchiometrischen Verhältnis  $\alpha_2\beta\gamma_2$  zu einem 7S-Makromolekül zusammensetzt, wobei die neurotrophe Signalfunktion nur der Untereinheit  $\beta$ -NGF (2,5S) zukommt. Der komplette 7S-Komplex schützt die  $\beta$ -Untereinheit vor Proteolyse, die  $\gamma$ -Untereinheit ist an der Prozessierung des ungefähr doppelt so großen Vorläufermoleküls pro-NGF beteiligt (Thoenen und Barde 1980; Chao 1990; Götz und Schartl 1994).  $\beta$ -NGF (Molekulargewicht 26,5 kDa) ist aus zwei identischen Polypeptidsträngen von je 118 Aminosäuren aufgebaut, die miteinander über drei Disulfidbrücken und mehrere Wasserstoffbindungen verbunden sind. Im Folgenden bezieht sich der Begriff NGF der Einfachheit halber auf das  $\beta$ -NGF-Protein, wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt.  $\beta$ -NGF ist ein basisches Protein mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 9,3 (Thoenen und Barde 1980).

NGF entfaltet seine Wirkung sowohl im peripheren Nervensystem (PNS) als auch im Zentralen Nervensystem (ZNS), wobei zunächst seine Rolle im PNS erforscht wurde und auch besser erforscht ist. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf den Wirkungen von NGF auf das ZNS liegt, sollen hier die Wirkungen auf das PNS nur kurz dargestellt werden.

Im Laufe der embryonalen Entwicklung spielt NGF eine wichtige Rolle beim Phänomen des „programmierten Zelltodes“. Hierbei sterben physiologisch bedingt bis zu 60% der überschüssig gebildeten Nervenzellen wieder ab, NGF wirkt hierbei im Sinne eines „Survival-Factors“. Eine Zelle benötigt während der embryonalen Entwicklung nicht nur von anderen Zellen ein Signal zum Proliferieren, sondern auch ein Signal zum Überleben. Das Ausleseverfahren, welche Nervenzellen durch die Apoptose abgetötet werden, wird unter

anderem durch die Konkurrenz um die stark begrenzte Menge neurotropher Faktoren wie NGF beeinflusst (s.u.) (Henderson 1996; Voyvodic 1996; Yuen et al. 1996).

Intrazellulär reguliert NGF spezifisch in sympathischen Neuronen und chromaffinen Zellen die Bildung der Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin, in sensorischen Neuronen die Expression der für die Schmerzvermittlung wichtigen Neuropeptide Substanz P und Calcitonin-gene-related-peptide (CGRP), sowie die Synthese von Somatostatin (Thoenen und Barde 1980; Levi-Montalcini et al. 1995; Lewin und Barde 1996).

Versuche mit „knock-out“ Mäusen, denen NGF fehlte, zeigten deutliche Auffälligkeiten. Auf Verhaltensebene zeigte sich eine massive Verminderung der Schmerz- und Temperaturempfindlichkeit, welche dadurch erklärt werden kann, dass bis zu 80% der sensorischen Zellen der Hinterwurzelganglien, 70% des sensorischen Teils des Ganglion trigeminale und nahezu 100% der Zellen im sympathischen Ganglion supracerivale zugrunde gingen. Die meisten Mäuse starben innerhalb von drei Wochen. Ein ähnliches Bild ergab sich bei „knock-out“ Mäusen, denen die Fähigkeit zur Bildung des TrkA-Rezeptors fehlte, dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass TrkA der spezifische Rezeptor für die neurotrophe Wirkung von NGF ist (Crowley et al. 1994; Smeyne et al. 1994).

Auch nach der Embryonalzeit wirkt NGF im Sinne einer neurotrophen Substanz für sympathische und sensorische Neurone wachstumsfördernd. Dabei führt NGF zu einer Konzentrationssteigerung von Transmittern, Neuropeptiden, einer Erhöhung des Gesamtproteins NGF-sensitiver Zellen, zur Neuritenaussprossung und zur Veränderung von Zellmembran und Zytoskelett (Snider 1994). Die Konzentration von NGF korreliert im PNS in hohem Maße mit der sympathischen Innervation (Korsching und Thoenen 1983).

Unter physiologischen Bedingungen wird NGF ab der Neonatalperiode nur in sehr niedrigen Mengen von Zielgeweben NGF-sensitiver Neurone ausgeschüttet. Die Konzentrationen von NGF bewegen sich in einem Bereich von pg/g bis ng/g Gewebe-Feuchtgewicht (Korsching und Thoenen 1983). Im Nervus ischiadicus sind z.B. *in vivo* unter 10% der NGF-Rezeptoren mit ihren endogenen Liganden besetzt (Raivich et al. 1991). Das bedeutet, dass bereits unter physiologischen Bedingungen quasi ein NGF-Mangelzustand an den NGF-sensitiven Neuronen vorliegt und eine hochgradige Konkurrenz der Zellen um den nur in limitierter Menge vorhandenen NGF besteht (Barde 1989). Dadurch erscheint es wahrscheinlich, dass schon bei geringen Konzentrationsveränderungen von NGF bedeutsame Modifikationen an den NGF-sensitiven Neuronen auftreten können. Im Hinblick auf die hohe Empfindlichkeit

der Neurone für Schwankungen der NGF-Konzentration könnten folglich auch Störungen der NGF-Synthese oder des retrograden NGF-Transports im Rahmen von Erkrankungen pathophysiologisch bedeutsam werden (Hellweg et al. 1992; Vantini 1992).

Darüber hinaus wirkt NGF auch auf nicht-neuronale Zellen, wobei besonders Zellen des Immunsystems wie Mastzellen, Monozyten und Lymphozyten zu nennen sind, aber auch Zellen des hämatopoetischen Systems und zum neuroendokrinen System gehörende Zellen des Gehirns (Levi-Montalcini et al. 1995; Levi-Montalcini et al. 1996). Ebenso werden Schwann-Zellen durch NGF aktiviert, diese unterstützen so die Führung der Axone (Anton et al. 1994; Carter et al. 1996).

Im ZNS produzieren sowohl Neurone (Ayer-Lelievre et al. 1983; Rennert und Heinrich 1986; Thoenen et al. 1987a; Thoenen et al. 1987b; Senut et al. 1990; Lu et al. 1991b) als auch Gliazellen (Lindsay 1979; Furukawa et al. 1986; Assouline et al. 1987; Lu et al. 1991a) NGF, allerdings sind unter physiologischen Bedingungen vor allem die Neurone dafür zuständig (Lindholm et al. 1994; Rush et al. 1995; Thoenen 1995). Die Abhängigkeit in Bezug auf das Überleben zentralnervöser Neurone von den Neurotrophinen ist nicht eindeutig geklärt, auf der eine Seite konnten Überlebenseffekte von NGF auf cholinerge Neuronen des basalen Vorderhirns nachgewiesen werden. Hier wirkt NGF ebenfalls „*target-derived*“ über retrograden Transport (Lindvall et al. 1994; Mattson und Scheff 1994), ebenso können Neurotrophine das Absterben von Neuronen verhindern und die Neurotransmittersynthese stimulieren (Bonhoeffer 1996). Insgesamt spricht die Mehrzahl der vorliegenden Ergebnisse für eine Beteiligung von Neurotrophinen bei der aktivitätsabhängigen Entwicklung des Neocortex (Crowley et al. 1994; Smeyne et al. 1994; Snider 1994; Ruberti et al. 2000).

Andererseits konnte in Versuchen mit „knock-out“-Mäusen nicht eindeutig belegt werden, ob die einzelnen Neurotrophine während der physiologischen Entwicklung tatsächlich eine entscheidende Rolle für das Überleben zentralnervöser Neurone spielen, es ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse beim Vergleich von TrkA-Mutanten, die erkennbare Störungen zeigten, mit NGF-Mutanten hinsichtlich der Funktion der cholinergen Bahnen zu Cortex und Hippocampus (Temple und Qian 1995; Lindholm et al. 1996).

Außerdem spricht einiges dafür, dass im ZNS eine im Vergleich mit dem PNS viel größere Zahl von Stoffen am Überleben der Neurone beteiligt ist und das Fehlen eines davon kompensiert werden kann (Carnahan und Nawa 1995).



Im Gegensatz zum PNS und den Neurotrophen BDNF und NT-3 scheint aber NGF im ZNS keinen Einfluss auf die Expression von Neuropeptiden zu haben (Cohen et al. 1996). Allerdings scheinen NGF und NT-3 das Überleben von murenen Oligodendrozyten zu fördern (Thoenen et al. 1987a; Thoenen et al. 1987b).

NGF stimuliert vielmehr im ZNS vornehmlich die cholinerge Neurotransmission über die Regulierung des cholinergen Schlüsselenzyms Cholinacetyltransferase (ChAT) und hat so eine wichtige physiologische Rolle für den phänotypischen Funktionserhalt des cholinergen Systems des basalen Vorderhirns (Connor und Dragunow 1998). So bewahrte z.B. die Applikation von NGF in das Gehirn von Affen die cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns vor Degeneration nach Axotomie (Hayashi 1996).

In verschiedene Studien wurden die Verteilungen von NGF-mRNA und NGF im ZNS von Ratten (Hefti und Weiner 1986; Shelton und Reichardt 1986; Whittemore et al. 1986; Whittemore und Seiger 1987; Ayer-LeLievre et al. 1988; Cavicchioli et al. 1989; Maness et al. 1994), Primaten und Menschen (Goedert et al. 1986; Hefti und Weiner 1986; Tuszynski et al. 1990; Mufson et al. 1994) bestimmt. NGF ist in großen Mengen in verschiedenen Regionen des ZNS vorhanden. Dazu gehören sowohl die von den cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns innervierten Gebiete wie Hippocampus, Bulbus Olfactorius und Neocortex, als auch die Regionen, die die Zellkörper dieser Neurone enthalten (Septum, Nucleus des diagonalen Bandes, Nucleus basalis Meynert) (Auburger et al. 1987). Dabei korreliert die Konzentration von NGF im Vorderhirn mit der Dichte der cholinergen Innervation (Korsching und Thoenen 1985; Mufson et al. 1994). Vergleichsweise niedrige Konzentrationen fanden sich auch in verschiedenen anderen Regionen des Gehirns.

Die höchsten Konzentrationen von NGF-mRNA fanden sich im Hippocampus, Cortex und Bulbus Olfactorius, in den cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns fanden sich jedoch sehr viel niedrigere, aber dennoch signifikante Konzentrationen (Korsching und Thoenen 1985; Shelton und Reichardt 1986; Whittemore et al. 1986; Auburger et al. 1987; Thoenen et al. 1987a; Vantini 1992). Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass die cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns via retrograden Transport von ihren Zielregionen mit NGF versorgt werden (Thoenen et al. 1987a; Thoenen et al. 1987b; Korsching 1993; Lewin und Barde 1996). So wird NGF vom Neocortex retrograd zum Nucleus basalis Meynert transportiert, vom Hippocampus zum medialen Septum, dem diagonalen Band von Broca und Nucleus supramammillaris und vom Bulbus Olfactorius ebenfalls zum diagonalen Band von

Broca (Altar und DiStefano 1998; Mufson et al. 1999). Zusätzlich zur Produktion in den Zielregionen cholinergischer Neurone wird NGF auch lokal in den cholinerge Perikarya enthaltenden Regionen des basalen Vorderhirns wie z.B. dem Septum produziert (Lauterborn et al. 1991; Saporito und Carswell 1995).

Insgesamt betrachtet ist NGF somit der klassische Vertreter der „*target-derived*“ Neurotrophine, die als retrograde Botenstoffe ihre neurotrophen Effekte in Neurotrophin-sensitiven Neuronen entfalten. Im Hinblick auf die außerordentlich vielfältigen biologischen Wirkungen von NGF wird dieses Protein auch allgemein als „*survival and maintenance of function factor*“ bezeichnet (Hellweg et al. 1989; Hellweg et al. 1996b; Hellweg et al. 1998a).

NT-3 wurde nach NGF und BDNF als drittes Mitglied der Neurotrophin-Familie identifiziert und beschrieben (Ernfors et al. 1990; Hohn et al. 1990; Kaisho et al. 1990; Maisonpierre et al. 1990; Rosenthal et al. 1990). Es ist ein Homodimer mit einem Gewicht von 27kDa und aus zwei identischen Polypeptidsträngen von jeweils 119 Aminosäuren aufgebaut. Dabei zeigt es eine Sequenzhomologie von 57% zu NGF und von 58% zu BDNF (Narhi et al. 1993).

Für NT-3 wurde gezeigt, dass es Wachstum und Überleben sympathischer (Birren et al. 1993) und sensorischer (Thaler et al. 1994; Zhou und Rush 1996) Neurone im PNS und cholinergischer Neurone des basalen Vorderhirns im ZNS (Avila et al. 1993) unterstützt.

Im Gegensatz zu NGF und BDNF ist die Konzentration von NT-3-mRNA im ZNS während der fetalen Entwicklung hoch und im adulten Gehirn reduziert. Die im Vergleich zu NGF/BDNF hohe NT-3-Produktion im fetalen Gehirn kann Hinweis auf eine wichtige Rolle von NT-3 für das Überleben und die Differenzierung von Neuronen während der Entwicklung sein (Ernfors et al. 1990; Maisonpierre et al. 1990).

In Untersuchungen zur regionalen Verteilung und zellulären Lokalisation im ZNS wurde NT-3 sowohl in neuronalen Zellen als auch in Gliazellen nachgewiesen. Nachweise in Gliazellen fanden sich im Corpus Callosum, der Substantia Nigra, im Hippocampus, in den Ventrikeln und dem Cerebellum. NT-3-positive Neurone fanden sich im Cortex, dem septalen Nukleus, dem Hippocampus, dem diagonalen Band von Broca, dem Bulbus Olfactorius, der Amygdala, dem retikulären thalamischen Nukleus, dem Mittelhirn, dem Hirnstamm, dem Cerebellum und dem Rückenmark (Zhou und Rush 1994). Genetisch veränderte Mäuse mit einer Null-Mutation für das NT-3-Gen entwickelten eine verminderte Anzahl von Neuronen in ihren sensorischen Ganglien, dies scheint eine direkte Wirkung der mangelnden Versorgung dieser

Neurone mit NT-3 zu sein. Des Weiteren spielt NT-3 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und dem Überleben auditorischer Neurone (Avila et al. 1993; Staecker et al. 1995; Fritzsche et al. 2004). Bei erwachsenen Tieren führte der Verlust der Haarzellen der Cochlea zu einer Degeneration dieser auditorischen Neurone, bei Infusion von exogenem NT-3 zeigten sie jedoch ein verbessertes Überleben (Lefebvre et al. 1994; Staecker et al. 1996).

Auch auf die Entwicklung enterischer Neurone und Gliazellen scheint NT-3 als einziges Neurotrophin einen wichtigen Einfluss zu haben. Bei Mäusen, die entweder kein NT-3 oder dessen Rezeptor TrkC exprimierten, wurde ein Verlust von Neuronen sowohl im myenterischen als auch im submukosalen Plexus beobachtet, wohingegen es bei NT-3-überexprimierenden Mäusen zu einer Hyperplasie kam (Chalazonitis 2004).

Zellen des Immunsystems können NT-3 (und BDNF) sowie die Rezeptoren TrkB und TrkC exprimieren (Besser und Wank 1999).

Den ersten Hinweis auf die neurotrophe Wirkung von NT-3 erbrachte die Beobachtung, dass die Anwesenheit von NT-3 reichliches Aussprossen von Neuriten aus Spinalganglien bewirkte (Maisonpierre et al. 1990). Die spätere Beobachtung, dass NT-3 das Aussprossen aus sensorischen und sympathischen Ganglien bewirkt, führte zu der Vermutung, dass NT-3 ein größeres Wirkspektrum als NGF oder BDNF hat (Maisonpierre et al. 1990; Thoenen 1991; Holtzman und Mobley 1994; Maness et al. 1994). Des Weiteren fand man heraus, dass NT-3 das Absterben von fazialen Motoneuronen postnataler Ratten verhinderte (Arenas und Persson 1994). Insgesamt zeigte sich, dass NT-3 essentiell für das anfängliche Überleben sensorischer und sympathischer Neurone ist, die später von NGF und BDNF abhängig sind (Farinas et al. 1994).

Im ZNS wurde beobachtet, dass NT-3 das Überleben ventraler mesenzephaler dopaminergener Neurone im Gehirn von Ratten fördert. NT-3-mRNA wurde im ventralen tegmental Gebiet, der medialen Substantia Nigra (pars compacta) und dem retrorubralen Feld gefunden. Dies legte die Vermutung nahe, dass die trophische Unterstützung der dopaminergen Neurone in diesen Gebieten auch aus lokaler Synthese von NT-3 stammen könnte (Seroogy et al. 1994).

In Kulturen hippocampaler Neurone erhöhte NT-3 die Anzahl Calbindin- oder Acetylcholinesterase (AChE)-produzierender Neurone (Ip et al. 1993a), außerdem förderte NT-3 die ChAT-Aktivität und das Überleben cholinergener Neurone von embryonalen Zellkulturen des basalen Vorderhirns (Friedman et al. 1993). Diese Ergebnisse standen jedoch einer anderen Studie gegenüber, die keinen Effekt von NT-3 auf ChAT- oder AChE-Aktivität in

cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns postnataler Ratten zeigte (Nonomura et al. 1995). Eine weitere Studie zeigte zudem keinen protektiven Effekt von NT-3 auf cholinerge Neurone des Nucleus basalis Meynert nach unilateraler partieller Devaskularisation des Neocortex von Ratten (Skup et al. 1994).

Die Gabe von humanem NT-3 änderte zudem nicht die Aktivität von intakten oder durch Läsion der Bahnen geschädigten cholinergen oder GABAergen Neuronen des basalen Vorderhirns (Koliatsos et al. 1994). Außerdem änderte die Gabe von Pilocarpin, einem direkten Parasympathomimetikum, nicht die NT-3-mRNA-Konzentration im Hippocampus von Ratten, dies legt die Vermutung nahe, dass die NT-3-Produktion dort nicht vom cholinergen System reguliert wird (da Penha Berzaghi et al. 1993).

Im Gehirn erwachsener Ratten fanden sich erhöhte Konzentrationen von NGF und BDNF in einer Vielzahl von stimulierenden Paradigmen, die jedoch im Kontrast dazu eher zu einem Absinken der NT-3-mRNA führten (Takeda et al. 1992; Rocamora et al. 1993; Lindvall et al. 1994). Dies lässt die Vermutung zu, dass NT-3 andere Effekte als NGF und BDNF hat.

Für NT-3 wird angenommen, dass es seine Wirkung über retrograden und anterograden Transport entfalten kann. Dabei erfolgt der retrograde Transport vom Hippocampus zum medialen Septum, dem diagonalen Band von Broca, dem Thalamus und Nucleus supramammillaris des Hypothalamus. Anterograder Transport wurde bei Tieren beobachtet, so z.B. beim Huhn von der Retina zum Tectum und beim Finken vom frontalen Cortex zum Archistriatum (Altar und DiStefano 1998; Mufson et al. 1999).

### **1.6.3 NGF, NT-3 und ihre Rezeptoren im Rahmen der Alzheimer Demenz**

Wie bereits in der Einleitung ausführlich dargestellt, ist die klassische neuropathologische Veränderung im Gehirn AD-erkrankter Personen die Anhäufung von unlöslichem, fibrillärem Material im cerebralen Cortex, die sich extrazellulär als Amyloidplaques und intrazellulär als Alzheimer'sche Neurofibrillenveränderungen darstellen (Alzheimer 1907; 1911; Übersicht bei Braak und Braak 1993).

Die am besten nachgewiesene neurochemische Veränderung im Gehirn von an AD erkrankten Personen ist ein verminderter ACh-Gehalt und eine Reduktion der Aktivität des cholinergen Schlüsselenzyms ChAT im Neocortex (Bartus et al. 1982; Collerton 1986; Gottfries 1990). Dieses cholinerge Defizit ist am ausgeprägtesten in temporalen und limbischen corticalen Strukturen, im Hippocampus und der Amygdala, wobei das Ausmaß der ChAT-Aktivitätsminderung gut mit der Schwere der Demenz korreliert (Bowen und Davison 1986). Aus dem basalen Vorderhirn, vor allem dem Nucleus basalis Meynert, dem Nucleus septi medialis und dem Nucleus des diagonalen Bandes, stammt nahezu die gesamte cholinerge Innervation des Neocortex. Diese Neurone sind ein wichtiger Teil des cholinergen Systems im basalen Vorderhirn und degenerieren früh und regelmäßig bei der AD und anderen dementiellen Erkrankungen (Whitehouse et al. 1982; Arendt et al. 1983; Coyle et al. 1983; Mufson und Kordower 1989).

Da die Neurotrophine eine zentrale Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Funktion von Neuronen spielen, also auch den cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns und dem von ihnen versorgten Neocortex, wurde großes Augenmerk auf Konzentrationsveränderungen der Neurotrophine im ZNS bei an AD Erkrankten gerichtet.

Anfangs wurde so die Hypothese aufgestellt, dass NGF-Mangel für die Pathogenese der AD mit verantwortlich sein könnte (Hefti 1983).

Man ging nun auch der Frage nach, ob Neurotrophine bestimmte Neuronenpopulationen, die normalerweise im Rahmen der AD degenerieren, schützen können. Dabei zeigte sich, dass intracerebroventrikuläre Infusion von NGF zum Zeitpunkt von der Läsion der Fimbrien des Fornix als einem Modell der AD die retrograde Degeneration cholinergischer Neurone verhindern konnte (Hefti 1986; Gage et al. 1987). Die Fähigkeit von NGF, die Degeneration von cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns zu verhindern, wurde auch für nicht-

menschliche Primaten gezeigt (Koliatsos et al. 1990; Tuszynski et al. 1990; Tuszynski et al. 1991). NGF schützte in einer weiteren Studie jedoch nicht nur den Phänotyp der geschädigten zentralen cholinergen Neurone, sondern verhinderte auch ihren apoptotischen Zelltod (Wilcox et al. 1995).

Für NT-3 wurde gezeigt, 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 serotoninergen und dieses noradrenergen Systems in Mitleidenschaft gezogen (Arenas und Persson 1994).

In verschiedenen *in-vitro* Studien wurden die Effekte von Neurotrophinen auf cholinerge Systeme untersucht. Dabei zeigte sich z.B., dass die Behandlung kortikaler Zellen mit NGF die Abbauege von APP, die nicht zu Amyloidplaques führen, förderte (Rossner et al. 1998). Ein künstlich hergestelltes Molekül, das die aktiven Domänen von NGF und BDNF enthielt, erhöhte das Überleben kultivierter cholinergischer Neuronen des basalen Vorderhirns um den Faktor 100 im Vergleich zu BDNF allein (Friedman et al. 1995). Die Gabe von rekombinanten humanem NGF und Maus-NGF führten zu einer gesteigerten ChAT-Aktivität dieser Neurone (Knusel et al. 1990), außerdem wurde berichtet, dass TrkB-aktivierende Neurotrophine wie BDNF und NT-3 die biochemische Aktivität der Enzyme der Glykolyse aktivieren und die Verstoffwechslung von Glukose stimulieren können (Knusel und Gao 1996).

Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass NGF in Anwesenheit der Präsenilin 1-Mutation, die bei der familiären Form der AD vorkommt, keine positiven Effekte haben könnte. Hier kam es zu Störungen der Signalübermittlung, reduziertem Neuritenwachstum und einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration kommen (Furukawa et al. 1998).

In anderen Studien wurden die Konzentrationsveränderungen der Neurotrophine in post-mortem Untersuchungen der Gehirne an AD Erkrankter sowie in experimentellen Tiermodellen der AD bestimmt. Man fand in mehreren Untersuchungen keine Hinweise auf einen NGF-Mangel, vielmehr wurden meist normale bis erhöhte Konzentrationen nachgewiesen.

So wurden z.B. im Hippocampus von AD-Patienten normale NGF- und NT-3-mRNA-Konzentrationen gefunden (Phillips et al. 1991), auch im Cortex fanden sich normale Konzentrationen von NGF- (Goedert et al. 1986; Jette et al. 1994; Fahnstock et al. 1996) und NT-3-mRNA (Hock et al. 1998). Auch für die Konzentration der p75-Rezeptor-mRNA im

basalen Vorderhirn wurden bei AD-Patienten normale Werte gefunden (Goedert et al. 1989). Dies wurde ursprünglich als Zeichen einer unveränderten NGF-Rezeptor-Regulation bei der AD angesehen, allerdings wurde später bemerkt, dass ein unveränderter NGF-Rezeptor-mRNA Gehalt bei bekannter Halbierung der Zahl der cholinergen Neurone im basalen Vorderhirn, die diesen Rezeptor im adulten Gehirn des Menschen einzig exprimieren (Hefti und Mash 1989; Kordower et al. 1989), eher für Verdoppelung der NGF-Rezeptoren bei der AD spricht (Hefti und Schneider 1991).

In Studien zur Bestimmung der NGF-Konzentration im Alzheimer-Gehirn fanden sich insgesamt normale bis erhöhte Werte, in einer Studie wurden jedoch erniedrigte NGF-Werte im temporalen Cortex gefunden (Hamill et al. 1993).

Neben im Vergleich mit nicht-dementen Kontrollen unveränderten Konzentrationen (Allen et al. 1991; Murase et al. 1993b) fanden sich häufig ein Anstieg der NGF-Konzentrationen in verschiedenen corikalen und subcortikalen (z.B. Hippocampus) Strukturen (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), nicht aber im entorhinalen und motorischen Cortex (Narisawa-Saito et al. 1996) und dem Cerebellum (Scott et al. 1995).

Auf einen defekten retrograden Transport von NGF von diesen cholinergen Zielregionen zum Nucleus basalis Meynert deuten gleichzeitig erniedrigte Konzentrationen von NGF im Nucleus basalis Meynert hin (Mufson et al. 1995; Scott et al. 1995). Dafür spricht auch, dass bei der AD ein Verlust von TrkA auf cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns der Zelldegeneration vorangeht (Strada et al. 1992) und die TrkA-Expression in Neuronen des Nucleus basalis Meynert und des Striatum bei der AD stark reduziert ist (Mufson et al. 1996; Salehi et al. 1996; Boissiere et al. 1997b; Mufson et al. 1997; Salehi et al. 2004), während normale (Mufson et al. 1996; Boissiere et al. 1997a) oder erniedrigte (Arendt et al. 1997; Salehi et al. 2000) Konzentrationen für p75-mRNA in überlebenden cholinergen Neuronen des Nucleus basalis Meynert gefunden wurden.

Für eine eventuell gestörte Aufnahme von NGF im Cortex und dem Hippocampus und einen gestörten retrograden Transport zum basalen Vorderhirn sprechen auch die Beobachtungen, dass NGF in Cortex/Hippocampus erhöht war, die Rezeptor-Dichte von TrkA im Cortex hingegen erniedrigt war (Hock et al. 2000b), besonders stark in Schicht III des temporalen

Cortex (Salehi et al. 2004) und den pyramidalen Neuronen in Schicht IV und V (Savaskan et al. 2000).

Neuere Untersuchungen mittels Western-Blot haben gezeigt, dass im menschlichen Cortex das NGF-Vorläufermolekül pro-NGF, welches ebenfalls an TrkA-Rezeptoren binden kann (Fahnestock et al. 2004), vorherrschend vorhanden ist. Im parietalen Cortex liegt pro-NGF sowohl in den Stadien des *mild cognitive impairment* (MCI), einer Vorstufe der AD, und der milden Form der AD (Peng et al. 2004) als auch im Spätstadium der AD (Fahnestock et al. 2001) in erhöhten Konzentrationen vor. Auch dies ist eventuell auf einen defekten retrograden Transport zurückzuführen (Mufson et al. 1995; Scott et al. 1995), allerdings ist der retrograde Transport von pro-NGF bis jetzt noch nicht nachgewiesen worden. Interessant sind die erhöhten Konzentrationen von pro-NGF, weil dieses Molekül an den an sich niedrig-affinen p75-Rezeptor mit hoher Affinität binden und so apoptotische Vorgänge auslösen kann (Lee et al. 2001a; Lee et al. 2001b; Miller und Kaplan 2001). Dies ist eine mögliche Erklärung für den Zelltod im Rahmen der AD (Chao und Bothwell 2002).

Allerdings wurden NGF und TrkA auch in reaktiven Astrozyten bei einigen Gehirnerkrankungen und Entzündungen gefunden, außerdem zeigen Astrozytome starke Immunoreaktivität für TrkA (Connor et al. 1996; Aguado et al. 1998; Wang et al. 1998). Zusätzlich können Astrozytome und Glioblastome stimuliert werden, große Mengen an NGF auszuschütten (Emmett et al. 1997), inflammatorische Signale wie Zytokine und Komplementfaktoren induzieren mikrogliale NGF-Produktion (Kossmann et al. 1996; Heese et al. 1998). Folglich könnten die veränderten NGF/TrkA-Werte sowohl durch gestörten retrograden Transport als auch durch lokale Antwort von Gliazellen hervorgerufen werden, allerdings sprechen die allgemein eher niedrigen TrkA-Konzentrationen dagegen.

Eine weitere Studie legte die Vermutung nahe, dass NGF im Verlauf der Entwicklung einer AD Konzentrationsschwankungen unterworfen ist. Hier wurden, analog zu den oben erwähnten Studien, erhöhte NGF-Konzentrationen im Cortex bei der post-mortem Untersuchung von Gehirnen an AD Erkrankter festgestellt. In der Kontrollgruppe wurden die nicht-dementen Patienten mit A $\beta$ -Nachweis im Cortex, die von manchen Autoren als Frühstadium der AD angesehen wird, gesondert untersucht. Eine Hälfte der Patienten mit A $\beta$ -Plaques hatten diese nur im temporalen Cortex, die andere Hälfte hatte zusätzlich Plaques im frontalen Cortex. Dabei fiel auf, dass die Patienten mit Plaques im frontalen Cortex dort



deutlich niedrigere Konzentrationen aufwiesen als die Patienten ohne diese frontalen Plaques. Dies könnte darauf hinweisen, dass zumindest im Frühstadium einer AD die NGF-Konzentration erniedrigt ist (Hellweg et al. 1998a).

Für das NT-3-Protein wurden entweder unveränderte (Hock et al. 2000a; Hock et al. 2000b) oder leicht erniedrigte (Crutcher et al. 1993; Narisawa-Saito et al. 1996) Werte im Cortex an AD Erkrankter gefunden, im Cerebellum waren sie in einer Studie leicht erniedrigt (Hock et al. 2000b). Die Werte für den NT-3-Rezeptor TrkC waren unverändert (Hock et al. 1998). In einer weiteren Studie wurden bei post-mortem Untersuchungen an AD Erkrankten neben erniedrigten TrkA-Mengen auch erniedrigte Werte für TrkC im Cortex gefunden, hier besonders in einer tieferen Schicht des Cortex (Layer V), im Cerebellum hingegen fanden sich unveränderte Werte. Die Immunoreaktivität für TrkC war besonders hoch in den Purkinje-Zellen des Cerebellums, allerdings sowohl in der Kontroll- als auch in der Alzheimer-Gruppe (Savaskan et al. 2000). Dies deutet eher auf eine allgemeine Rolle von TrkC bzw. NT-3 im alternden Cerebellum hin, da auch im Tierexperiment die Expression von TrkC im Laufe des Alterns zunahm (Jaber et al. 1994).