

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. J. Deckert

Hypertonie als Risikofaktor für Morbus Alzheimer

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius- Maximilians- Universität Würzburg

vorgelegt von
Diana- Iulia Iuhos
aus Stuttgart

Würzburg, Februar 2014



Referentin: Frau Priv.-Doz. Dr. med. Edna Grünblatt

Korreferent: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Reif, i.V. PD Dr. Martin Herrmann

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2014

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

I.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
II.	TABELLENVERZEICHNIS	IV
III.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Morbus Alzheimer.....	1
1.1.1	Neuropathologie	1
1.1.2	Risikofaktoren	3
1.2	Die Rolle des zerebralen Insulinstoffwechsels und der Glykogensynthase Kinase 3 bei der Alzheimer Demenz	3
1.2.1	Glykogensynthase Kinase 3.....	3
1.2.2	Der Einfluss der Glykogensynthase Kinase 3 auf den Amyloid- Vorläufer- Protein – Metabolismus und Phosphorylierung des Tau- Proteins bei Morbus Alzheimer	4
1.2.3	Insulinmetabolismus im Gehirn: Vorkommen und Funktion von Insulin im Zentralen Nervensystem	5
1.2.4	Struktur des Insulinrezeptors	5
1.2.5	Die Signalkaskade des zerebralen Insulinrezeptors	6
1.2.6	Die Signalkaskade des zerebralen Insulinrezeptors bei Morbus Alzheimer	7
1.3	Hypertonie als Risikofaktor für Morbus Alzheimer.....	9
1.4	Hypothesen und Zielsetzung	11
2.	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Material	13
2.1.1	Chemikalien.....	13
2.1.2	Untersuchungsobjekt	13
2.1.3	Anatomisch-topographische Auswahl der untersuchten Hirnregionen	14
2.1.4	Probenumfang.....	14
2.2	Methoden.....	14
2.2.1	Aufbereitung des Hirngewebes	14
2.2.2	Homogenisierung des Hirngewebes	15
2.2.3	Proteinbestimmung.....	15
2.2.4	Beschreibung des Enzym- Linked-Immuno-Sorbent Assays (ELISA).....	15
2.3	Statistik.....	19
3.	ERGEBNISSE	19
3.1	β -Untereinheit des Insulinrezeptors.....	19
3.1.1	Nachweis der β -Untereinheit des Insulinrezeptors	19
3.1.2	Konzentrationsunterschiede des Insulinrezeptors in den einzelnen Hirnregionen.....	20
3.1.3	Korrelationen des Insulinrezeptors	20
3.2	Phosphorylierter Insulinrezeptor	22
3.2.1	Nachweis des phosphorylierten Insulinrezeptors	22
3.2.2	Konzentrationsunterschiede des phosphorylierten Insulinrezeptors in den einzelnen Hirnregionen	22

3.2.3	Korrelationen des phosphorylierten Insulinrezeptors.....	23
3.2.4	Verhältnis zwischen dem phosphorylierten Insulinrezeptor und der β - Untereinheit des Insulinrezeptors.....	24
3.3	Proteinkinase B.....	26
3.3.1	Nachweis der Proteinkinase B.....	26
3.3.2	Konzentrationsunterschiede der Proteinkinase B in den einzelnen Hirnregionen	26
3.3.3	Korrelationen der Proteinkinase B	27
3.4	Glykogensynthase Kinase 3β	29
3.4.1	Nachweis der Glykogensynthase Kinase 3β	29
3.4.2	Konzentrationsunterschiede der Glykogensynthase Kinase 3β in den einzelnen Hirnregionen.....	29
3.4.3	Korrelationen der Glykogensynthase Kinase 3	30
3.5	Phosphorylierte Glykogensynthase Kinase 3β	32
3.5.1	Nachweis der phosphorylierten Glykogensynthase Kinase 3β	32
3.5.2	Konzentrationsunterschiede der phosphorylierten Glykogensynthase Kinase 3β in den einzelnen Hirnregionen.....	32
3.5.3	Korrelationen der phosphorylierten Glykogensynthase Kinase 3β	33
3.5.4	Verhältnis zwischen der phosphorylierten Glykogensynthase Kinase 3β und der Glykogensynthase Kinase 3β	35
4.	DISKUSSION	36
4.1	β -Untereinheit des Insulinrezeptors im Gruppenvergleich	36
4.2	Proteinkinase B im Gruppenvergleich.....	37
4.3	Glykogensynthase Kinase 3β im Gruppenvergleich	38
4.4	Korrelationen.....	40
4.5	Schlussfolgerung: Hypertonie als Risikofaktor für Morbus Alzheimer?.....	41
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	42
6.	LITERATURVERZEICHNIS	44
7.	DANKSAGUNG	
8.	LEBENS LAUF	

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Neuropathologische Kennzeichen der AD	1
Abbildung 2: Hirngewebeschnitt mit Amyloiden Plaques	2
Abbildung 3: Struktur des Insulinrezeptors	5
Abbildung 4: Zerebraler Insulinmetabolismus unter physiologischen Bedingungen	6
Abbildung 5: Zerebrale Signalkaskade des Insulinrezeptors bei sporadischer Alzheimer Demenz	8
Abbildung 6: Veränderung des Blutdrucks bei AD und VD innerhalb von 15 Jahren	10
Abbildung 7: Vergleich der mittleren IR β - Konzentrationen zwischen der Gesamt- kontrollgruppe und der Gesamtgruppe der SHR	19
Abbildung 8: Vergleich der mittleren IR β - Konzentrationen in den einzelnen Hirnregionen	20
Abbildung 9: Korrelationen mit IR β - Spiegel	22
Abbildung 10: Vergleich der mittleren IR pTyr 1162/1163- Konzentrationen zwischen der Gesamtkontrollgruppe und der Gesamtgruppe der SHR	23
Abbildung 11: Vergleich der mittleren IR pTyr 1162/1163- Konzentrationen in den einzelnen Hirnregionen	24
Abbildung 12: Korrelationen mit IR pTyr- Spiegel	25
Abbildung 13: Verhältnis IR pTyr / IR β im Gruppenvergleich	26
Abbildung 14: Verhältnis IR pTyr / IR β in den einzelnen Hirnregionen	27
Abbildung 15: Vergleich der mittleren PKB- Konzentrationen zwischen der Gesamt- kontrollgruppe und der Gesamtgruppe der SHR	28
Abbildung 16: Vergleich der mittleren PKB- Konzentrationen in den einzelnen Hirnregionen	29
Abbildung 17: Korrelationen mit PKB- Spiegel	30
Abbildung 18: Vergleich der mittleren GSK 3β - Konzentrationen zwischen der Gesamtkontrollgruppe und der Gesamtgruppe der SHR	31
Abbildung 19: Vergleich der mittleren GSK 3β - Konzentrationen in den einzelnen Hirnregionen	32

Abbildung 20: Korrelationen mit GSK 3 β - Spiegel	33
Abbildung 21: Vergleich der mittleren GSK 3 β pSer - Konzentrationen zwischen der Gesamtkontrollgruppe und der Gesamtgruppe der SHR	34
Abbildung 22: Vergleich der mittleren GSK 3 β pSer- Konzentrationen in den einzelnen Hirnregionen	35
Abbildung 23: Korrelationen mit GSK 3 β pSer- Spiegel	36
Abbildung 24: Verhältnis GSK 3 β pSer/ GSK 3 β im Gruppenvergleich	37
Abbildung 25: Verhältnis GSK 3 β pSer/ GSK 3 β in den einzelnen Hirnregionen	38

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Firmen der verwendeten Substanzen	13
Tabelle 2: Angaben zu den verwendeten ELISA- Kits	13
Tabelle 3: Probenumfang der Studie	14
Tabelle 4: Zusammensetzung des RIPA- Puffers	15
Tabelle 5: Rekonstitutionsschema für IgG-HRP	16
Tabelle 6: Standardkonzentrationen	17
Tabelle 7: Verdünnungsreihe von IR β	17
Tabelle 8: Verdünnungsfaktor der Proben	17
Tabelle 9: Pipettierschema für Proben aus dem frontalen Kortex und Hippokampus	18

III. Abkürzungsverzeichnis

A β	β -Amyloid-Proteins
AD	Alzheimer Demenz
sAD	sporadische Form der Alzheimer Demenz
APP	Amyloid- Vorläufer- Protein
ATP	Adenosintriphosphat
EGF	epidermal growth factor
ELISA	Enzym- Linked-Immuno-Sorbent Assays
ER	endoplasmatisches Retikulum
FC	frontaler Kortex
GA	Golgi-Apparat
GSK-3	Glykogensynthase Kinase 3
GSK- 3 β pSer	phosphorylierte Glykogensynthase Kinase 3 β
HIP	Hippokampus
Hyp	Hypothalamus
IgG HRP	Meerrettichperoxidase gekoppelter Antikörper
IR β	β - Untereinheit des Insulinrezeptors
IR pTyr 1162/1163, IR pTyr	posphorylierter Insulinrezeptor
MAP	Mikrotubuli-assoziertes Tauprotein
μ l	Mikroliter
μ g	Mikrogramm
MW	Mittelwerte
NGF	nerve growth factor
PHF	paarige helikale Filamente
PI-3K	Phosphatidylinositol-3- Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
SH2 – Domänen	Src-homology 2- Domänen
SHR	Spontan Hypertensive Ratten
Std	Standardreihe
Str	Striatum
VD, VaD	Vaskuläre Demenz
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer (Alzheimer Demenz; AD) ist mit ca. 60 % die häufigste Ursache für eine Demenzerkrankung im Alter. Es handelt sich dabei um eine primär degenerative Erkrankung des Gehirns, die erstmals 1907 von Alois Alzheimer beschrieben wurde (Blennow et al., 2006).

Typisches Kennzeichen dieser Krankheit ist ein schleichender Beginn mit langsamer Verschlechterung. Zu den wichtigsten klinischen Leitsymptomen zählen, neben einer langsam progredienten Gedächtnisstörung, Wortfindungsstörungen und eine zeitliche und örtliche Desorientierungsstörung. Im Verlauf können eine Depression, Wahn, Halluzinationen und neurologische Auffälligkeiten, wie zum Beispiel motorische Defizite, hinzukommen (Möller et al. 2009; Bath et al, 2002).

Unterschieden wird die seltene familiär autosomal- dominant vererbte Form mit frühem Beginn (Beginn ca. vor dem 65. Lebensjahr), von der häufigsten, sporadischen Form (Beginn nach dem 65. Lebensjahr). Für die familiäre Form werden verschiedene genetische Veränderungen verantwortlich gemacht, darunter Mutationen im Präsenilin 1 Gen auf Chromosom 14, im Präsenilin 2 Gen auf Chromosom 1 und im Amyloid- Vorläufer- Protein (APP) Gen auf Chromosom 21. Im Gegensatz zu der familiären Form ist die Ursache für die sporadische Form bis heute nicht bekannt. Man geht davon aus, dass sie multifaktoriell bedingt ist. Zu den wichtigsten Risikofaktoren zählen u.a. vor allem das Alter, das Apolipoprotein E $\epsilon 4$ als bekanntester genetischer Risikofaktor, ein niedriges Ausbildungsniveau, Rauchen sowie auch Übergewicht und Hypertonie (siehe auch Abschnitt 1.1.2).

1.1.1 Neuropathologie

Neuropathologisch ist AD durch amyloide Plaques, Neurofibrillenbündel und durch eine Gehirnatrophie des Kortex, besonders in frontalen, parietalen und temporalen Bereich, gekennzeichnet.

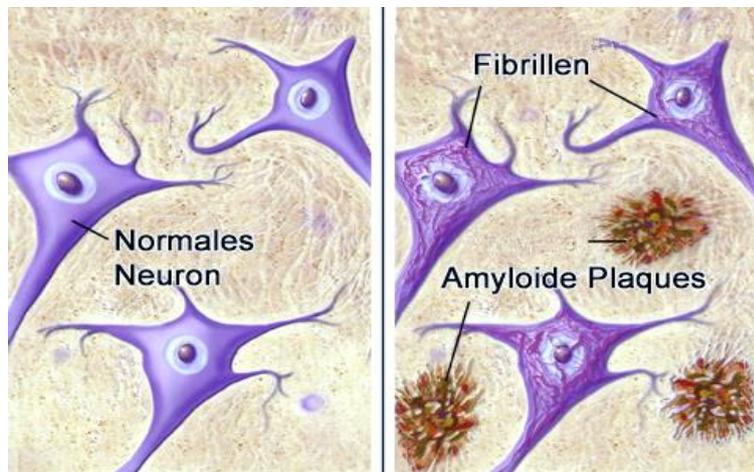
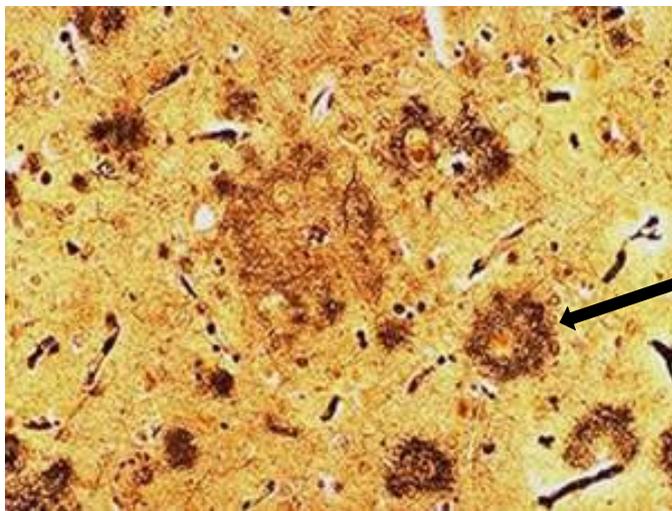


Abb.1 Neuropathologische Kennzeichen der AD: Amyloide Plaques und Neurofibrillenbündel. Quelle: www.alzheimer-forschung.de
AD = Alzheimer Demenz

Bei den neuritischen Plaques handelt es sich hauptsächlich um extrazelluläre Proteinablagerungen des β -Amyloid-Proteins ($A\beta$). Diese Proteinablagerungen kommen überwiegend im Hippokampus und Kortex vor, in geringerem Maß auch in anderen Hirnregionen (Gasparini et al., 2002).

Das Plaque- bildende $A\beta$ ist Folge einer pathologischen Spaltung des APPs. Das APP ist ein membranständiges Protein, dessen genaue physiologische Funktion jedoch bis heute nicht vollständig geklärt ist. Im menschlichen Erbgut befindet sich das für APP codierende Gen auf Chromosom 21, in der Nähe der Down- Syndrom Region. Unter anderem wird vermutet, dass es bei der Bildung von Synapsen eine Rolle spielt (Turner et al., 2003).

Normalerweise wird es durch die α -Sekretase in zwei Teilfragmenten gespalten, die sich nicht als toxische $A\beta$ niederschlagen. Bei der pathologischen Spaltung durch die β - und γ -Sekretase entstehen zwei unterschiedliche $A\beta$ - Peptide mit 39/40 Aminosäuren ($A\beta_{40}$), welche überwiegend gebildet werden, oder mit 42/43 Aminosäuren ($A\beta_{42}$), die stärker dazu neigen Aggregate zu bilden. *In-Vitro* Studien konnten zeigen, dass amyloide Plaques eine neurotoxische Wirkung auf die umgebenden Zellen haben und zur Apoptose führen (Gasparini et al., 2002). Heutzutage geht man davon aus, dass auch intrazelluläre Aggregate der $A\beta_{42}$ - Variante besonders zytotoxisch wirken und einen entscheidenden Einfluss auf die Pathogenese haben (Kienlen- Campard et al., 2002).



Amyloide Plaques

Abb. 2 Ausschnitt aus einem Hirngewebeschnitt mit Amyloiden Plaques.
Bielschowsky Färbung.

Quelle: www.liv.ac.uk/researchintelligence/issue30/images/amyloidplaques.jpg

Neuronale Fibrillen sind intrazelluläre Ablagerungen, die aus zusammengelagerten hyperphosphorylierten Tauproteinen bestehen. Sie sind u.a. im Hippokampus, in der Amygdala und im Neokortex zu finden. Tauproteine sind mikrotubuli-assoziierte Proteine, die an axonale Mikrotubuli binden und eine Stabilisierung der Neurone bewirken. Bei AD bestehen Neurofibrillenbündel aus abnormal hyperphosphorylierten Tauproteinen, die sich zu paarigen helikalen Filamenten anordnen. Eine Hyperphosphorylierung vermindert die Affinität zu axonalen Mikrotubuli und führt zum Zerfall axonaler Strukturen. Neurone werden dadurch instabiler und degenerieren (Blennow et al., 2006; Bhat et al., 2002).

Amyloide Plaques und Neurofibrillen treten auch während des physiologischen Alterungsprozesses und bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen auf, jedoch sind sie bei der AD besonders stark ausgeprägt.

Neben den beschriebenen neuropathologischen Veränderungen sind auch verschiedene Neurotransmittersysteme betroffen, darunter das cholinerge, dopaminerge, noradrenerge,

glutamaterge und das serotonerge System. Besonders der Mangel an Acetylcholin, der durch den neuronalen Zellverlust bedingt ist, soll mit dem Grad der Demenz und den amyloiden Plaques korrelieren (Tölle, Windgassen, 2008).

1.1.2 Risikofaktoren

In vielen Studien wurde versucht, Risikofaktoren für diese Erkrankung herauszufinden. Der bekannteste genetische Risikofaktor für die sporadische AD ist das $\epsilon 4$ - Allel für das Apolipoprotein E auf Chromosom 19. Bei AD Patienten ist es 2- bis 3-mal so häufig wie bei Gesunden zu finden. Laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO, World Health Organization) zählen eine positive Familienanamnese und insbesondere ein hohes Lebensalter zu den wichtigsten Risikofaktoren. Bei 60-64-jährigen liegt die Prävalenz für Morbus Alzheimer unter 1% und steigt mit zunehmendem Alter deutlich an, so dass sie bei über 85jährigen inzwischen bis zu 50% beträgt (Mayeux, Stern et al., 2012). Darüber hinaus scheinen ein niedriges Ausbildungsniveau, Rauchen, Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie, ein Schädelhirntrauma und Hypertonie das Risiko zu erhöhen (Mayeux, Stern et al., 2012, Plassman et al.; 2000; Yang et al.; 2011; Wallesch C- W, Hans Förstl, 2005). Unter all den genannten Risikofaktoren werden jedoch vor allem zerebrovaskuläre Erkrankungen verbunden mit flächigen kortikalen, fokalen oder hämorrhagischen zerebralen Infarkten als wichtige Risikofaktoren hervorgehoben. Tatsache ist, dass viele Patienten vor Ausbruch einer AD entweder klinisch stumme oder auch symptomatische Schlaganfälle hatten (Schneider, Bennett et al., 2010). Einige Arbeitsgruppen konnten in Langzeitstudien zudem zeigen, dass Übergewicht ein weiterer Risikofaktor für sAD darstellen kann (Xu et al., 2011). Inwiefern langjährige, chronische Entzündungsprozesse im Körper die Pathogenese der sAD beeinflussen können, ist derzeit noch umstritten und unklar, da sich unter den zahlreichen Studien auch viele nicht eindeutige Resultate finden (Sundelöf et al., 2009, Tan et al., 2007). Seit längerer Zeit verdichten sich jedoch außerdem die Hinweise, dass auch ein gestörter zerebraler Insulinmetabolismus einen entscheidenden Einfluss auf neuropathologische Mechanismen der sAD hat (de la Monte et al.; 2012, Gasparini et al., 2002; Hoyer et al. 2004).

Eine protektive Wirkung scheinen dagegen unter anderem ungesättigten Fettsäuren, Vitamin C und E, Vitamin B 12, grüner Tee und ein moderater Weinkonsum zu haben, wobei der Einfluss der Ernährung noch nicht vollständig geklärt ist, so dass feste, allgemeingültige Ernährungsempfehlungen nicht existieren (de la Monte et al.; 2012, Mayeux, Stern et al., 2012, Wilson et al. 2002; Lindsay et al. 2002; Blennow et al., 2006; Gasparini et al., 2002). Beispielsweise konnten Studien zeigen, dass die zusätzliche, regelmäßige Einnahme von Vitamin E eine leichtgradige neuroprotektive Wirkung aufweist und das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken senken kann, eine eindeutige protektive Wirkung bezüglich Vitamin C konnte dagegen in diesen Studien nicht belegt werden (Devore et al., 2010; Gray et al., 2008).

Gemäß Angaben der WHO sollen insbesondere regelmäßige geistige und körperliche Aktivitäten das Risiko für eine AD senken können, teilweise um bis zu 30% (Masuhr und Neumann, 2007). Eine Langzeitstudie konnte inzwischen bestätigen, dass besonders eine mediterrane Ernährungsweise in Kombination mit regelmäßiger sportlicher Betätigung das Alzheimer- Risiko signifikant senken kann (Scarmeas et al., 2009).

1.2 Die Rolle des zerebralen Insulinstoffwechsels und der Glykogensynthase Kinase 3 bei der Alzheimer Demenz

1.2.1 Glykogensynthase Kinase 3

Die Glykogensynthase Kinase 3 (GSK-3) ist eine Serin/Threonin Kinase. In menschlichen Zellen kommen zwei Isoformen vor, die von zwei verschiedenen Genen kodiert werden, GSK-3 α mit einem Molekulargewicht von 51kDa und GSK-3 β mit einem Molekulargewicht

von 46-kDa (Bhat et al., 2002). Kennzeichnend für beide ist eine hohe Ähnlichkeit in der Kinasedomäne. Jedoch unterscheidet sich die GSK-3 α sowohl durch ihre C-terminale Region als auch durch ihre glycinreiche N-terminalen Domäne (Peineau et al., 2007; Calbiochem-User Protocol 2006).

Ursprünglich wurde die GSK-3 als eine Proteinkinase entdeckt, welche die Glykogensynthese phosphoryliert, dadurch inaktiviert und so eine wichtige regulatorische Funktion im Glykogenstoffwechsel erfüllt (Cohen, Goedert, 2004). Heute ist bekannt, dass sie eine Vielzahl von anderen Substraten phosphorylieren kann und somit eine zentrale Rolle in vielen zellulären Signalwegen spielt, wie zum Beispiel bei der Embryogenese, der Zellproliferation und der Induktion von Apoptose. Zu den Substraten zählen neben Transkriptionsfaktoren auch Translationsfaktoren wie Catenin, das Mikrotubuli-assoziierte Tauprotein (MAP) und dessen Unterformen MAP-1, MAP-2 (Bhat et al., 2002).

Die Aktivität beider Isoformen wird überwiegend durch Phosphorylierung an unterschiedlichen Serinstellen reguliert. Eine Phosphorylierung von Serin 9 bei GSK-3 β , welches sich im N-terminalen Ende befindet, führt zu deren Inaktivierung. Bei GSK-3 α bewirkt eine Phosphorylierung an der Serinstelle 21 deren Hemmung. Einige Kinasen, die diesen Vorgang fördern, sind die Proteinkinasen (PK) A, PKB sowie einige Isoformen der PKC (Bhat et al., 2004).

Im Gegensatz dazu erhöht die Phosphorylierung an der Tyrosinstelle 216 die GSK-3 β Aktivität. Verschiedene Tyrosinkinasen wie Fyn, eine Kinase aus der src (sarcoma) Tyrosinkinasefamilie, aber auch erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen können zu einer Phosphorylierung und Aktivierung führen. Es gibt außerdem Hinweise, dass extrazelluläre Proteinablagerungen des A β die GSK-3 β -Aktivität erhöhen. Untersuchungen haben gezeigt, dass es dabei mehrere Mechanismen gibt, die die Aktivität von GSK-3 β regulieren können. Auch Stressfaktoren wie oxidativer Stress, Hitzeschock und einige Wachstumsfaktoren wie EGF (*epidermal growth factor*), NGF (*nerve growth factor*) können ebenfalls die Aktivität von GSK-3 β beeinflussen.

Aufgrund ihrer zentralen Rolle in zahlreichen Signalwegen kann eine Fehlregulation der GSK-3 Aktivität zu einer Reihe von Erkrankungen führen, darunter Diabetes und psychische Erkrankungen, wie zum Beispiel bipolare affektive Störungen, Schizophrenie sowie neurodegenerativen Erkrankungen wie AD. Außerdem wird angenommen, dass eine Störung der GSK-3 β -Aktivität auch bei der Entstehung einiger Neoplasien beteiligt ist (Bhat et al. 2002; Peineau et al., 2007).

1.2.2 Der Einfluss der Glykogensynthase Kinase 3 β auf den Amyloid- Vorläufer-Protein -Metabolismus und Phosphorylierung des Tau- Proteins bei Morbus Alzheimer

Wie bereits erwähnt wurde, kann eine Fehlregulation der GSK-3 Aktivität zu neurodegenerativen Erkrankungen wie AD führen.

Ein wichtiges neuropathologisches Kennzeichen der AD sind Neurofibrillenbündel, die durch Hyperphosphorylierung von Tauproteinen entstehen. Einige Versuchsreihen konnten zudem zeigen, dass GSK-3 β ebenfalls zu den Kinasen gehört, welche das Tauprotein an unterschiedlichen Stellen phosphoryliert. Dabei phosphoryliert GSK-3 β überwiegend die Stellen am Tauprotein, die auch bei der AD abnormal hyperphosphoryliert sind. Bei Patienten mit AD konnte eine deutlich erhöhte Konzentration und Aktivität der GSK-3 β nachgewiesen werden (Hooper et al., 2008). Bei postmortalen Analysen von AD Patienten wurden sowohl erheblich höhere Konzentration an aktivierter GSK-3 β als auch erhöhte Konzentrationen an hyperphosphorylierten Tau-proteinen gefunden (Bhat et al., 2002; Steen et al., 2005). Demnach scheint die aktivierte Form der GSK-3 β in hohem Maße an der Phosphorylierung von Tauprotein bei der AD beteiligt zu sein (Bhat et al., 2002). Eine Studie von Phiel et al.

(2003) konnte wiederum nachweisen, dass die Regulation des APP- Metabolismus und die Produktion von A β grostenteils durch die GSK-3 α erfolgt. Zusätzlich fand man heraus, dass Proteinablagerungen des A β die Aktivität der GSK-3 β beeinflussen, indem sie die deren Aktivität erhöhen. Die gesteigerte Aktivität der GSK-3 β führt wiederum zu einer zunehmenden Hyperphosphorylierung von Tauproteinen (Takashima et al., 1998; Bhat et al., 2002).

Diese Versuchsreihen belegen, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen der GSK-3-Aktivität und einigen neuropathologischen Mechanismen der AD gibt.

1.2.3 Insulinmetabolismus im Gehirn: Vorkommen und Funktion von Insulin im Zentralen Nervensystem

Zahlreiche Befunde haben in den letzten Jahren belegt, dass Insulin nicht nur an der peripheren Blutglukoseregulation beteiligt ist, sondern auch auf zentraler Ebene zahlreiche Wirkungen hat. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass sowohl Insulin als auch Insulinrezeptoren im Gehirn vorkommen (Havrankova et al., 1978; Frölich et al., 1997). Im menschlichen Gehirn reguliert Insulin die Nahrungsaufnahme sowie den zerebralen Glukose- und Energiestoffwechsel (Frölich et al. 1998). Die Kontrolle des Glukose- und Energiestoffwechsels erfolgt dabei antagonistisch durch Insulin und Kortisol (Hoyer et al., 1995). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass Insulinrezeptoren Bestandteil neuronaler Synapsen sind, wo sie unter anderem die Ausschüttung von Neurotransmittern regulieren. Der Nachweis von Insulin mRNA führte schließlich zur Hypothese, dass Insulin auch im Gehirn gebildet wird (Young et al., 1986). Aktuell wird angenommen, dass Insulin teilweise aus der Peripherie über die Blut-Hirn Schrank ins ZNS transportiert, teilweise im Gehirn von Pyramidenzellen gebildet wird (Plata- Salaman et al., 1991; Wozniak et al., 1993; Hoyer et al., 2004). Insulin mRNA ist vor allem in Pyramidenzellen des Hippokampus, im Thalamus, im enthorhinalen und perirhinalen Kortex nachweisbar. In Gliazellen dagegen konnten weder eine Synthese von Insulin noch Insulin mRNA nachgewiesen werden (Hoyer et al., 2004). Die Verteilung der Insulinrezeptoren ist regional unterschiedlich. Die höchste Rezeptordichte findet sich im Bulbus olfactorius, Hippokampus, Hypothalamus und Kortex. Die besonders hohe Dichte an Insulinrezeptoren im Hippokampus und im Kortex deutet darauf hin, dass Insulin an Lernprozessen und Gedächtnisleistungen beteiligt ist. Tierexperimentell induzierte Störungen der zerebralen Insulinrezeptorfunktion durch intrazerebroventriculare (i.c.v.) Injektionen von Streptozotocin, ein spezifisches Toxin für insulinproduzierenden Betazellen des Pankreas, führten nicht nur zu Defiziten im Glukose-Energiestoffwechsel, sondern auch zu einer Abnahme der Gedächtnisleistung der Ratten. Im Gegensatz dazu hatten i.c.v. Injektionen von Insulin einen positiven Einfluss auf die Gedächtnisleistung. Der gleiche positive Effekt auf kognitive Fähigkeiten durch Insulin konnte in Studien auch beim Menschen erzielt werden (Gasparini et al., 2002). Andere Studien, die sich mit den Auswirkungen einer Insulinresistenz beim Diabetes mellitus Typ II beschäftigen, können ebenfalls die Annahme unterstützen, dass Insulin eine wesentliche Rolle bei der Gedächtnisfunktion spielt. Sowohl Diabetiker vom Typ I als auch vom Typ II weisen zusätzlich zu den bekannten Komplikationen, wie zum Beispiel Makro- und Mikroangiopathien oder diabetische Neuropathien, auch kognitive Defizite bezüglich Lernen und Gedächtnis auf. Interessanterweise haben Patienten mit Diabetes mellitus vom Typ II und der damit verbundenen Insulinresistenz ein deutlich höheres Risiko an der AD zu erkranken als gesunde Vergleichspersonen (Gasparini et al., 2002).

1.2.4 Struktur des Insulinrezeptors

Der Insulinrezeptor gehört zu der Gruppe der Tyrosinkinaserzeptoren. Er ist ein Tetramer aus zwei α und zwei β -Untereinheiten, die jeweils durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abb.3). Jede Untereinheit hat eine spezifische Funktion. Die extrazellulär

gelegenen α -Untereinheiten bilden die Insulinbindungsdomäne. Die β -Untereinheit des Insulinrezeptors besteht aus einer kurzen extrazellulären Domäne, einer transmembranen Domäne und einer intrazellulären Domäne. Sie besitzen die Tyrosinkinaseaktivität. Die Bindung von Insulin löst eine Kaskade von Phosphorylierungsreaktionen aus (Löffler, 2001).

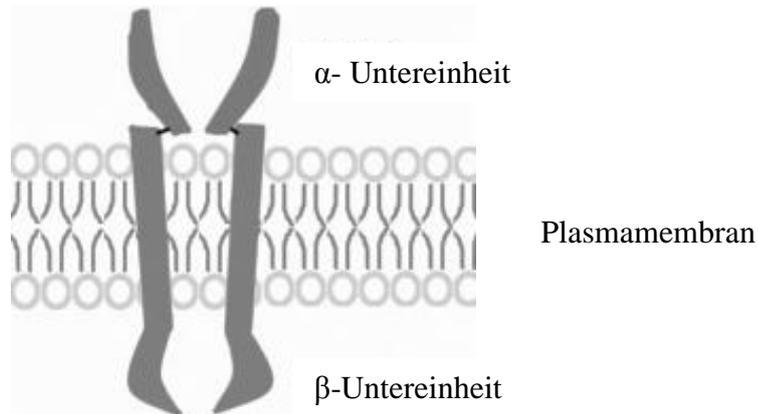


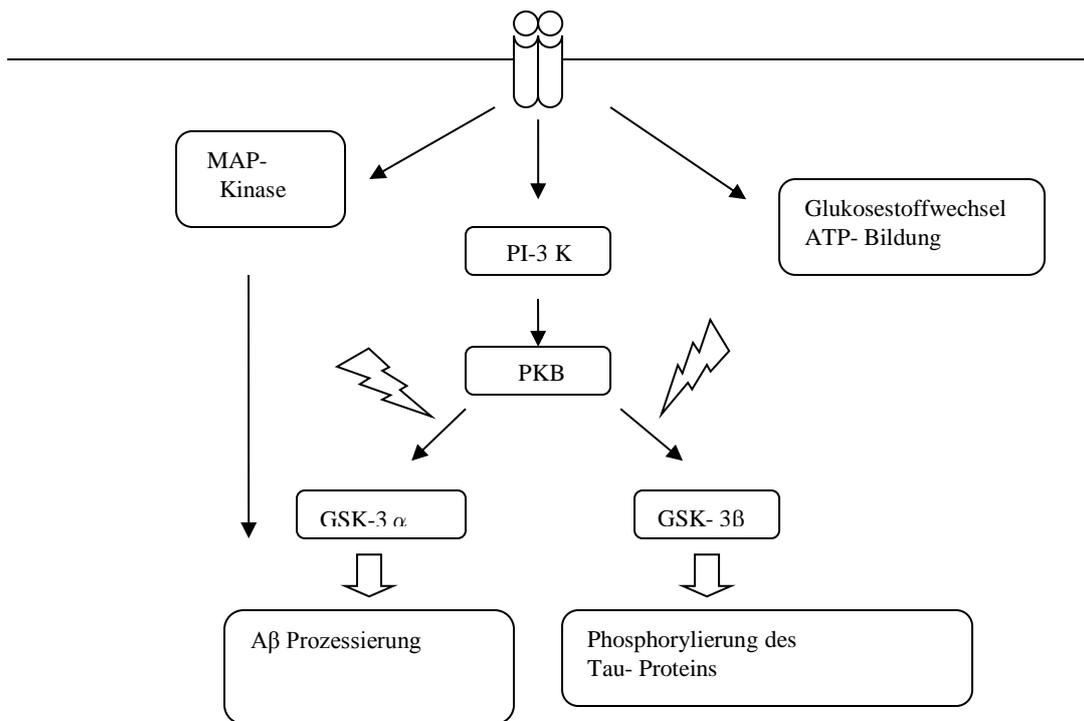
Abb. 3 Struktur des Insulinrezeptors, bestehend aus einer extrazellulären α - Untereinheit und einer intrazellulären β -Untereinheit. Quelle:

http://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Cell_Signaling_Pathways/Insulin_Signaling

1.2.5 Die Signalkaskade des zerebralen Insulinrezeptors

Durch die Bindung von Insulin an die extrazelluläre α -Untereinheit wird die Tyrosinkinaseaktivität der β -Untereinheiten aktiviert und der Rezeptor autophosphoryliert. An die Phosphotyrosinreste des Rezeptors können nun Proteine mit sogenannten Cellular Sarcoma(c-Src)-homology 2 (SH2) – Domänen andocken und auf diese Weise aktiviert werden (Löffler, 2001). Eines dieser Proteine ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K), die wiederum die Proteinkinase B aktiviert. Die Proteinkinase B phosphoryliert und inaktiviert die GSK-3 α und GSK-3 β . Die Folge davon ist, dass eine unkontrollierte Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins durch die GSK-3 β gehemmt wird (Hoyer et al., 2004). Zusätzlich fördert Insulin zusammen mit der MAP-Kinase den Transport von A β vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran. Durch die gesteigerte Freisetzung des A β von intrazellulär nach extrazellulär, werden intrazelluläre Ablagerungen von A β -40 und A β -42 reduziert. (Gasparini et al. 2002).

Die ablaufenden Signalwege des Insulinrezeptors verdeutlichen, dass Insulin den APP-Metabolismus und die balancierte Phosphorylierung des Tau-Proteins kontrolliert (Abb.4).



Insulinrezeptor,
 Insulin,
 Aktivierung,
 Hemmung/ Reduktion

Abb.4 Zerebraler Insulinmetabolismus unter physiologischen Bedingungen:

Insulin bindet an die extrazelluläre α -Untereinheit des Rezeptors und löst eine Kaskade von Phosphorylierungsreaktionen aus. Die Tyrosinkinaseaktivität der β -Untereinheiten wird aktiviert und der Rezeptor autophosphoryliert. An die Phosphotyrosinreste des Rezeptors können Proteine andocken und auf diese Weise aktiviert werden, darunter die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K). Die PI-3K wiederum aktiviert die Proteinkinase B (PKB). Die PKB phosphoryliert und inaktiviert die Glykogensynthase Kinase α (GSK-3 α) und Glykogensynthase Kinase β (GSK-3 β). Auf diese Weise wird unter physiologischen Bedingungen eine unkontrollierte Hyperphosphorylierung des Tauproteins durch die GSK-3 β gehemmt.

PI-3K = Phosphatidylinositol-3-Kinase, **PKB** = Proteinkinase B, **APP** = Amyloid- Precursor-Protein, **A β** = β - Amyloid-Protein, **GSK** = Glykogensynthase Kinase

1.2.6 Die Signalkaskade des zerebralen Insulinrezeptors bei der Alzheimer Demenz

Aufgrund der Wirkung von Insulin auf zelluläre und molekulare Prozesse im Gehirn, mehren sich in den letzten Jahren die Hinweise, dass eine gestörte Signalkaskade des Insulinrezeptors eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Neurofibrillenbündel und amyloiden Plaques spielt. Verschiedene Arbeitsgruppen haben herausgefunden, dass die hereditäre und die sporadische AD sich hinsichtlich der Ursache für die Fehlregulation des Insulinstoffwechsels unterscheiden.

Bei der hereditären früheinsetzenden AD führen verschiedene genetische Mutationen zu gesteigerten Ablagerung von A β _{1-40/1-42}. Man geht davon aus, dass das vermehrt gebildete A β die α -Untereinheit des Rezeptors kompetitiv hemmt und folglich die Bindung von Insulin an die α -Untereinheiten gestört wird (Xie et al., 2002).

Bei der sporadischen AD ist vor allem das Alter ein sehr hoher Risikofaktor. Dabei führen Alter und Stress zu zahlreichen Veränderungen im zerebralen Glukose- und Energiestoffwechsel. Auffallend ist, dass die Konzentrationen an Kortisol und Noradrenalin im Liquor zerebrospinalis mit zunehmendem Alter ansteigen. Versuchsreihen konnten zeigen, dass Patienten mit sporadischer AD eine stark erhöhte Kortisolkonzentration im Liquor zerebrospinalis aufwiesen als gesunde Vergleichspersonen (Swaab et al., 1994; Hoyer et al., 2004). Auch die Konzentration an Noradrenalin im Liquor zerebrospinalis war deutlich erhöht, zusätzlich korrelierte der erhöhte Noradrenalin Spiegel mit der Schwere der Demenz (Peskind et al. 1998; Hoyer et al. 2004). Craft et al. (1998) haben nachgewiesen, dass bei AD Patienten ein Mangel an Insulin im Liquor besteht. Eine Studie von Frölich et al. (1998) konnte wiederum zeigen, dass die Tyrosinkinaseaktivität der zerebralen Insulinrezeptoren von AD Patienten wesentlich geringer war als bei Kontrollgruppen. Kompensatorisch war die Dichte der Insulinrezeptoren im Vergleich zur Kontrollgruppe hochreguliert. Diese Veränderung im Gehirn von Patienten mit sporadischer AD ist vergleichbar mit den Veränderungen, die durch Diabetes mellitus Typ II verursacht werden (Hoyer et al. 2004). Aus diesem Grund besteht seit einiger Zeit der Verdacht, dass Morbus Alzheimer eine neuroendokrine Störung des ZNS sein könnte.

Der Grund für die beeinträchtigte Funktion des Insulinrezeptors bei der sporadischen AD ist die Hemmung der β - Untereinheit des Rezeptors durch Kortisol oder Noradrenalin (Hoyer et al. 2004). Die Hemmung der neuronalen Insulinrezeptorfunktion bewirkt eine Herabsetzung der Aktivität der PI-3 Kinase und der PKB. Die Folge davon ist eine Enthemmung der GSK-3 α und GSK-3 β . Daraus resultiert eine unkontrollierte Phosphorylierung von Tauprotein durch GSK-3 β und ein gestörter APP- Metabolismus durch GSK-3 α . Durch die inaktivierte PI-3 Kinase wird zusätzlich die Freisetzung von A β - Derivaten von intrazellulär nach extrazellulär behindert. Demzufolge kommt es zu vermehrten intrazellulären Ablagerungen in Neuronen, die dadurch degenerieren. Das Amyloid, das auf diese Weise freigesetzt wird, aggregiert zu Plaques (D'Andrea et al. 2001; Gouras et al. 2000, Hoyer et al. 2004).

Für den veränderten Insulinmetabolismus ist außerdem ein reduzierter zerebraler Glukoseenergiestoffwechsel kennzeichnend. Der reduzierte Glukosemetabolismus führt zunächst zu einer Abnahme der oxidativen Phosphorylierung und zellulären ATP-Produktion (Hoyer S, Riederer P et al., 2003). ATP (Adenosintriphosphat) wird mit Hilfe von Glukose gebildet und ist für zellulären und molekularen Abläufe essentiell, wie zum Beispiel für die Proteinsynthese, Proteinfaltung, Transport und Abbau von Proteinen. Die herabgesetzte Bildung von ATP führt unter anderem zu einer beeinträchtigten Funktion des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi- Apparates, wodurch die Toxizität des A β erhöht wird (Kaufmann et al. 1999; Verde et al. 1995; Dorner et al. 1990). Obwohl auch im physiologischen Alterungsprozess geringfügige Veränderungen im zerebralen Stoffwechsel der Glukose vorkommen, unterscheiden sich die Störungen bei Morbus Alzheimer deutlich von den normalen altersabhängigen Prozessen (Herholz K. et al., 2002).

Auf diese Weise hat eine gestörte Signalkaskade des Insulinrezeptors Konsequenzen für den neuronalen Glukose- Energiestoffwechsel, für den Metabolismus des APP und die Phosphorylierung des Tauproteins (Abb. 5).

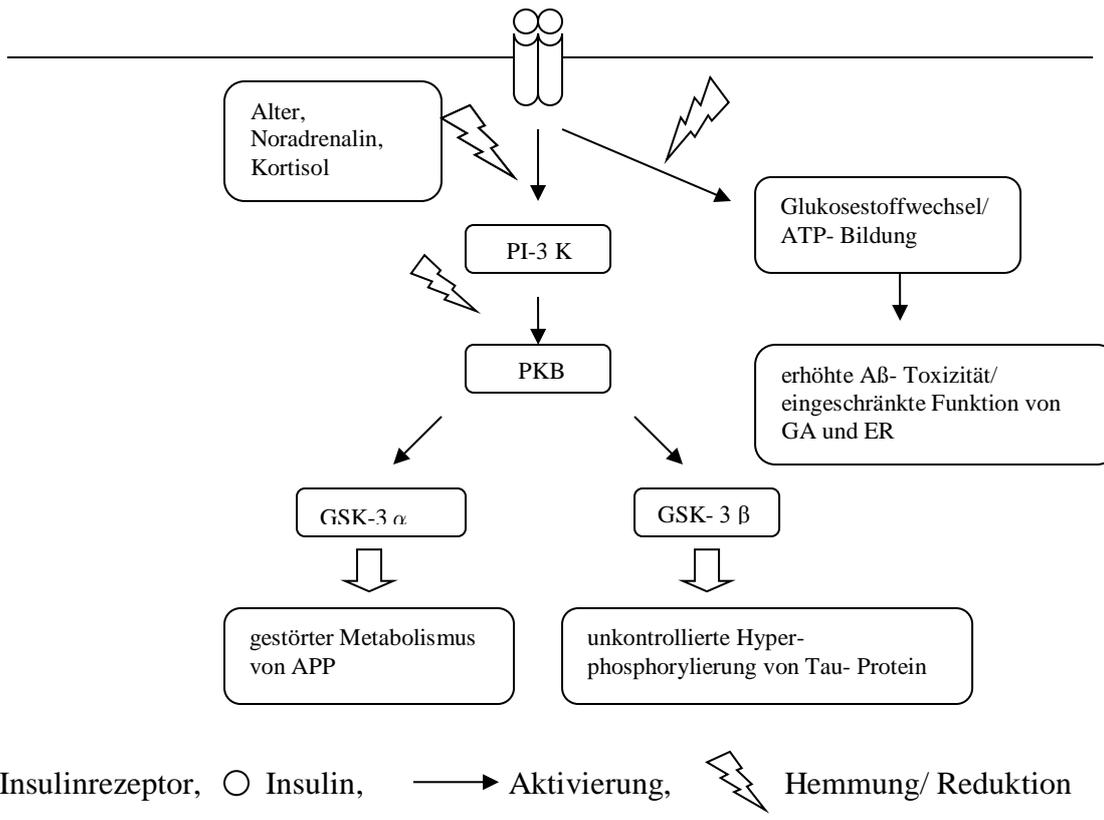


Abb. 5 Zerebrale Signalkaskade des Insulinrezeptors bei sporadischer Alzheimer Demenz: Verschiedene Faktoren, darunter das Alter, Stress, erhöhte Noradrenalin- und Kortisolkonzentrationen mit zunehmendem Alter führen zu Veränderungen und Störungen in der Signalkaskade des zerebralen Insulinrezeptors; u.a. kommt es zu einer Hemmung der neuronalen Insulinrezeptorfunktion. Dies führt zu einer herabgesetzten Aktivität der Phosphatidylinositol-3- Kinase (PI-3 K) und der Proteinkinase B (PKB). Die Folge davon ist eine Enthemmung der Glykogensynthase Kinase 3 α (GSK-3 α) und Glykogensynthase Kinase 3 β (GSK-3 β) mit daraus resultierender unkontrollierter Hyperphosphorylierung des Tauproteins durch GSK-3 β und einem gestörtem APP- Metabolismus durch GSK-3 α . **PI-3K** = Phosphatidylinositol-3-Kinase, **PKB** = Proteinkinase B, **APP** = Amyloid- Precursor-Protein, **GSK** = Glykogensynthase Kinase, **GA**= Golgi-Apparat, **ER**= endoplasmatisches Retikulum, **A β** = β - Amyloid-Protein, **sAD**= sporadische Form der Alzheimer Demenz

1.3 Hypertonie als Risikofaktor für Morbus Alzheimer

Hypertonie ist weltweit der häufigste Risikofaktor für zerebro- und kardiovaskuläre Erkrankungen. Man geht davon aus, dass ca. 30 Millionen Menschen in Deutschland einen zu hohen Blutdruck haben (Middeke, 2004). Da mit zunehmendem Alter der Blutdruck durchschnittlich ansteigt, ist die Prävalenz der Hypertonie im Alter besonders hoch. Etwa 60% der Bevölkerung haben ab dem sechzigsten Lebensjahr Blutdruckwerte von mehr als 140/90 mmHg (Kearney PM, Whelton M, Reynolds K et al. 2005). Auch das Risiko an einer AD zu erkranken steigt mit zunehmendem Alter ebenfalls an, die Prävalenz für AD liegt bei über 85jährigen zwischen 24-33% (Hoyer et al. 2004). Für die vaskuläre Demenz (VD) ist die arterielle Hypertonie ein gesicherter Risikofaktor, dabei stellt sich jedoch auch die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen Hypertonie und AD gibt (Solfrizzi et al., 2010). Die Zusammenhänge zwischen AD und kardiovaskulären Risikofaktoren, wie die arterielle Hypertonie, wurden lange Zeit übersehen. Im Laufe der Jahre haben sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit diesem Thema beschäftigt. Inzwischen wurden für alle bekannten

kardiovaskulären Risikofaktoren relevante Assoziationen mit der Entstehung von AD nachgewiesen. Unter diesen zahlreichen Studien fanden sich jedoch häufig auch nicht eindeutige Resultate zum Zusammenhang mit Hypertonie und AD. Diese ließen sich teilweise mit zu kurzen Beobachtungsintervallen erklären. Nur bei sehr langer Beobachtungsdauer von mehr als 15 Jahren traten Beziehungen hervor (Launer et al. 2000; Kivipelto et al. 2001, 2002).

Auffallend ist, dass bei Patienten mit klinisch manifester AD häufig normotone Blutdruckwerte nachweisbar sind. Längsschnittstudien konnten aber zeigen, dass bei Patienten mit AD in jüngeren Lebensjahren ein erhöhter Blutdruck vorlag, bevor sich kognitive Störungen entwickelten. In einer von vielen Studien wurden Probanden im Alter von 70 Jahren, bei denen noch keine AD vorlag, regelmäßig über einen Zeitraum von 15 Jahren untersucht. Diejenigen, die im Laufe dieser 15 Jahre eine Demenz entwickelten, hatten zu Beginn einen deutlich höheren Blutdruck. Mit dem Fortschreiten der AD nahm der Blutdruck ab (Waeber, Francois et al. 2010, Skoog, Lernfelt, Landahl et al. 1996; Skoog, Gustafson et al. 2002). Eine mögliche Erklärung für die Abnahme des Blutdrucks mit Fortschreiten der Demenz ist, dass die durch Hypertonie hervorgerufene Schädigung der weißen Substanz zu einer Blutdruckfehlregulation mit der Tendenz zur Hypotonie führen kann. (Moretti R, Torre P, Antonello RM et al. 2008; Skoog, Gustafson et al. 2002).

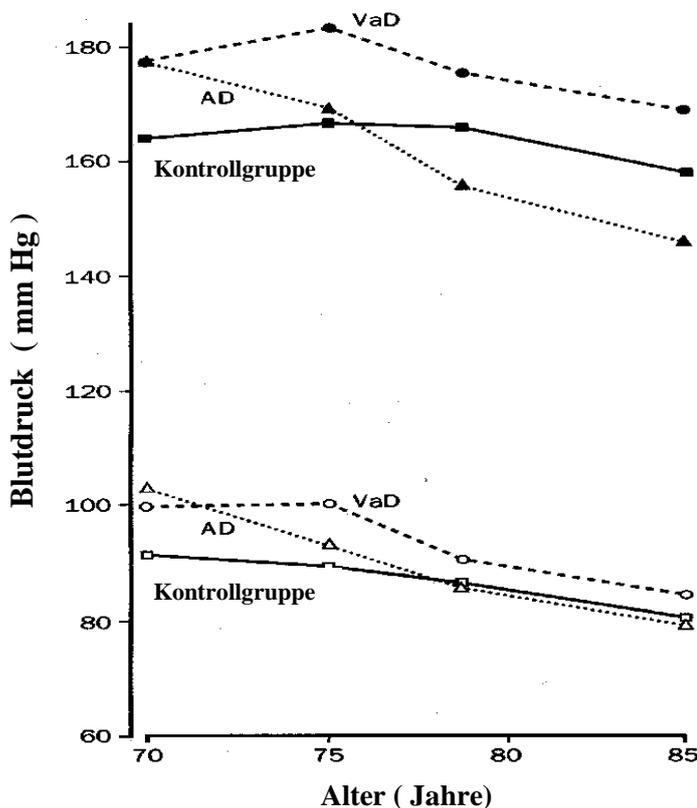


Abb. 6 Veränderung des Blutdrucks (diastolischer und systolischer Blutdruck) bei Patienten mit AD und VaD und einer Kontrollgruppe innerhalb von 15 Jahren (Skoog et al., Lancet 1996). Auffallend ist, dass sowohl der diastolische als auch der systolische Blutdruck der Patienten mit AD und VaD zu Beginn der Studie im Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe deutlich erhöht ist. Mit Fortschreiten der Erkrankung ist eine Abnahme des Blutdrucks bei den AD- und VaD- Patienten zu verzeichnen, während der Blutdruck der Kontrollgruppe über die Jahre nur geringfügig sinkt bzw. annähernd konstant bleibt.

AD = Alzheimer Demenz, **VaD** = Vaskuläre Demenz

Eine weitere Studie, die einen Zusammenhang zwischen AD und arterieller Hypertonie belegen kann, ist die Honolulu-Asia Aging Studie. Ca. 3700 Männer nahmen 1965-1971 am „Honolulu Heart Program“ (HHP) teil. Dabei wurde im Abstand von jeweils 3 Jahren der systolische und diastolische Blutdruck der Probanden gemessen. Im Jahre 1991, 25 Jahre nach Studienbeginn, wurden die Probanden neuropsychologisch untersucht. Das Ergebnis war, dass besonders die Gruppe der Probanden mit unbehandelter arterieller Hypertonie, 57% der Männer, ein deutlich höheres Risiko für AD und VD aufwiesen. Zusätzlich konnte eine Studie von Launer et al. (2002) einen Zusammenhang zwischen erhöhten diastolischen Blutdruck und AD nachweisen. In der Gruppe der Studienteilnehmer mit antihypertensiver Medikation war kein Zusammenhang zwischen arteriellen Blutdruck und der Entwicklung einer Demenz im fortgeschrittenen Alter erkennbar (Launer et al., 2000; Skoog, Gustafson et al., 2002).

Petrovitch et al. (2000) konnten anhand postmortalen Analysen von ehemaligen Teilnehmern der Honolulu-Asia Aging Studie einen Zusammenhang zwischen der Anzahl von Amyloidplaques, Neurofibrillenbündel und arterieller Hypertonie zeigen. Bei einem erhöhten systolischen Blutdruck im mittleren Alter (≥ 160 mmHg) konnten sowohl im Neokortex als auch im Hippokampus eine erhöhte Anzahl an senilen Plaques und ein niedrigeres Hirngewicht nachgewiesen werden. Bei einem erhöhten diastolischen Blutdruck (≥ 95 mmHg) wurde eine größere Anzahl an Neurofibrillenbündel im Hippokampus gefunden (Petrovitch et al., 2000; Skoog, Gustafson et al., 2002).

Über die genaue Pathophysiologie wie arterielle Hypertonie die Entwicklung von AD beeinflussen kann, wird noch diskutiert. Als mögliche pathophysiologische Faktoren kommen unter anderem eine zerebrale Ischämie durch Arteriosklerose und intimale Hyperplasie intrazerebraler Arteriolen in Frage. Hinzu kommt, dass Hypertoniker ein 3- bis 4fach erhöhtes Risiko tragen an einem Schlaganfall zu erkranken. Auch eine positive Schlaganfallanamnese wird mit dem späteren Auftreten einer AD in Verbindung gebracht. Es ist bekannt, dass viele Patienten vor Ausbruch einer AD entweder klinisch stumme oder auch symptomatische Schlaganfälle hatten (Förstl 2009). Nach einem Schlaganfall in jungen Jahren verdoppelt sich das Risiko innerhalb der nächsten 25 Jahre eine AD zu bekommen (Pasquier et al., 1997). Viele Arbeitsgruppen vertreten deshalb die Meinung, dass diese genannten zerebralen Schäden, die durch Hypertonie hervorgerufen werden, wesentlich zur Pathogenese der AD beitragen und die Verschlechterung der kognitiven Funktionen beschleunigen (Petrovitch et al., 2000; Launer et al., 2000). Andere Arbeitsgruppen vermuten wiederum, dass durch arterielle Hypertonie verursachte endotheliale Schäden zu inflammatorische Prozessen führen, die die Bildung seniler Plaques triggern. Durch Hypertonie bedingte Schädigungen der Blut-Hirn-Schranke kommen auch als Ursache in Frage. Sie stehen ebenfalls in Verdacht pathophysiologischen Prozessen einer AD zu fördern (Brown, Moody, Thore et al., 2000; Skoog, Gustafson et al., 2002; Kalaria, Skoog et al., 2002).

1.4 Hypothesen und Ziele

Basierend auf vorangegangene Untersuchungsergebnisse konnten in letzter Zeit viele Studien belegen, dass der zerebrale Insulinmetabolismus für die Pathogenese der sporadischen AD eine wichtige Rolle spielt. Insulin reguliert im menschlichen Gehirn nicht nur die Nahrungsaufnahme und den zerebralen Glukose- und Energiestoffwechsel, sondern auch den APP- Metabolismus und die balancierte Phosphorylierung des Tauproteins (Frölich et al. 1998, Hoyer et al., 2004, Gasparini et al., 2002). Bei der sporadischen AD sind die ablaufenden Signalwege des zerebralen Insulinrezeptors fehlreguliert, was zu einer unkontrollierten Phosphorylierung von Tauprotein und einem gestörter APP- Metabolismus führen kann.

Ein wichtiger Faktor, der bereits im Kapitel 1.4 erwähnt wurde und mit der Pathogenese der AD immer mehr in Verbindung gebracht wird, ist die arterielle Hypertonie. Immer mehr Studien konnten in den letzten Jahren einen relevanten Zusammenhang zwischen AD und

arterieller Hypertonie nachweisen. Zahlreiche Längsschnittstudien kamen zu dem Ergebnis, dass bei Patienten mit AD in jüngeren Lebensjahren ein erhöhter Blutdruck vorlag und besonders Patienten mit unbehandelter Hypertonie ein deutlich höheres Risiko für die spätere Entwicklung einer AD aufwiesen (Launer et al. 2000; Skoog, Lernfelt, Landahl et al. 1996; Skoog, Gustafson et al. 2002).

Die hier vorliegende Arbeit unterstützt die Hypothese, dass ein gestörter zerebraler Insulinmetabolismus pathogenetisch bedeutsam für die Entwicklung einer sAD ist. Ziel dieser Arbeit ist es nun festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen metabolischem Syndrom (wie Hypertonie und Insulinresistenz) und sAD nachweisbar ist und ob Hypertonie sich auf den zerebralen Insulinmetabolismus auswirken und somit auf diesen Weg pathophysiologischen Prozesse einer AD fördern kann.

Es ergeben sich unter anderen folgenden Fragen:

- Hat Hypertonie einen Einfluss auf den zerebralen Insulinmetabolismus?
- Welche Hirnregionen sind betroffen?
- Ist Hypertonie ein Risikofaktor für sAD?

In der Literatur werden für die sAD zahlreiche verschiedene experimentelle Tiermodelle vorgeschlagen. Unter diesen Modellen haben sich im Laufe der Zeit vor allem Ratten, die i.c.v. mit Streptozotocin behandelt wurden, als sehr geeignete Tiermodelle für die sAD bewährt, da diese Substanz in geringer Dosis keine systemischen Nebenwirkungen wie Diabetes mellitus hervorruft, jedoch zu gehirntypischen Veränderungen im Insulinstoffwechsel führen kann, die auch bei AD-Patienten gefunden werden. Um in dieser Studie den Einfluss der arteriellen Hypertonie zu untersuchen und andere Ursachen für einen gestörten zerebralen Insulinstoffwechsel auszuschließen, wurden in dieser Studie erstmals Spontan Hypertensive Ratten (SHR) als Modell gewählt, da sie besonders geeignete Tiermodelle für die essentielle arterielle Hypertonie sind und kognitive Defizite bezüglich Lernen und Gedächtnis aufweisen (Grünblatt et al., eingereicht).

Um zu prüfen, ob Hypertonie ein Risikofaktor für sAD darstellt, wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe neurochemischer Methoden die Insulinrezeptorkonzentration sowie weitere Bestandteile der zerebralen Insulinrezeptorsignalkaskade in verschiedenen Hirnregionen von SHR Rattengehirnen untersucht.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Substanzen wurden von folgenden Firmen bezogen:

Tab. 1 Auflistung der Chemikalien

Substanz	Firma
RIPA- Puffer	Sigma- Aldrich Chemie GmbH Kat. Nr. R0278
Protease Inhibitor Tabletten	Sigma- Aldrich Chemie GmbH Kat. Nr. S8820
DL- Dithiothreitol	Sigma- Aldrich Chemie GmbH Kat. Nr. 43819

Folgende ELISA- Kits wurden verwendet. Alle ELISA- Kits stammen von der Firma Calbiochem ®.

Tab. 2 Angaben zu den verwendeten ELISA- Kits

Enzym / Rezeptor	ELISA- Kit
PKB	PhosphoDetect ® Akt (Thr 308) ELISA Kit Kat.Nr. CBA004
GSK-3 β	GSK-3 β ELISA Kit Kat. Nr. CBA068
phosphorylierte GSK-3 β	PhosphoDetect® GSK-3 β (pSer 9) ELISA-Kit Kat.Nr. CBA069
phosphorylierter Insulinrezeptor	PhosphoDetect ® Insulin Receptor (pTyr 1162/1163) ELISA Kit Kat. Nr. CBA038
β - Untereinheit des Insulinrezeptors	Insulin Receptor (β - Subunit) ELISA- Kit Kat. Nr. CBA039

2.1.2 Untersuchungsobjekt

Die Untersuchungen der vorliegenden Studie erfolgten an gewonnenem postmortem Hirngewebe von weiblichen Wistar Kyoto Strain Ratten und SHR. Die untersuchten Tiere

erreichten ein Alter von drei Monaten. Die Gehirne der Tiere wurden zügig herauspräpariert, tiefgekühlt und bei -80° C aufbewahrt.

2.1.3 Anatomisch-topographische Auswahl der untersuchten Hirnregionen

Anhand von folgenden Voraussetzungen erfolgte die Auswahl der Hirnregionen, die neurochemisch untersucht wurden:

- Aus den Rattenhirnen sollte sich in ausreichender Menge Hirngewebe der ausgewählten Region präparieren lassen.
- Es wurden solche Hirnregionen ausgewählt, die von ausgeprägten, spezifischen Veränderungen der AD betroffen sind.

Typische neuropathologische Merkmale der AD in Form von senilen Plaques und Neurofibrillenbündel sind besonders im Kortex, Hippokampus, in der Amygdala und in geringerem Maß auch in anderen Hirnregionen zu finden (Blennow et al., 2006; Gasparini et al., 2002). Da bei der vorliegenden Studie der zerebrale Insulinstoffwechsel untersucht wurde, wurde auch die zerebrale Verteilung der Insulinrezeptoren bei der Auswahl der Hirnregionen berücksichtigt. Die höchste Dichte an Insulinrezeptoren findet sich im Bulbus olfactorius, Hippokampus, Hypothalamus und Kortex.

Aufgrund dieser Überlegungen wurden sowohl bei den gesunden Ratten in der Kontrollgruppe als auch bei den SHR folgende Hirnregionen ausgewählt: Gewebeproben aus dem frontalen Kortex, Hippokampus, Hypothalamus und Striatum. Alle untersuchten Areale erfüllten die oben genannten Kriterien.

2.1.4 Probenumfang

Der Probenumfang dieser Studie umfasste insgesamt Gewebeproben von 9 gesunden Wistar Ratten in der Kontrollgruppe und 10 SHR. Es ergab sich ein Gesamtumfang von 76 Gewebeproben. Die nachfolgende Tabelle gibt die genauen Zahlen der untersuchten Proben je Hirnregion wieder:

Tab.3 Probenumfang der Studie

Hirnregion	Kontrollratten	Spontan Hypertensive Ratten
frontaler Kortex	n (gesamt) = 9	n (gesamt) = 10
Striatum	n (gesamt) = 9	n (gesamt) = 10
Hippokampus	n (gesamt) = 9	n (gesamt) = 10
Hypothalamus	n (gesamt) = 9	n (gesamt) = 10

2.2 Methoden

2.2.1 Aufbereitung des Hirngewebes

Die makroskopische Präparation der vier Hirnregionen erfolgte nach etablierten Standardverfahren (Gsell et al. 1993). Nach Identifikation und Exzision der gesuchten Hirnregionen wurden die tiefgefrorenen Gewebeproben von Resten der Arachnoidea und Pia mater sowie von allen makroskopisch fassbaren Blutgefäßanteilen befreit. Anschließend wurde das Hirngewebe bei -80°C tiefgekühlt aufbewahrt.

2.2.2 Homogenisierung der Hirngewebe

Als Ausgangssubstrat für alle weiteren Untersuchungen erfolgte zunächst die Homogenisierung der Hirngewebe. Alle Arbeitsschritte wurden auf einer Kühlplatte durchgeführt. Alle Gewebeprouben wurden zuerst einzeln abgewogen und anschließend mit der vierfachen Menge an RIPA-Puffer versetzt. Für die Herstellung des RIPA-Puffers (V=100 ml) wurden folgende Substanzkonzentrationen verwendet:

Tab. 4 Zusammensetzung des RIPA- Puffers

RIPA-Puffer (Sigma- Aldrich Chemie GmbH)	
Inhaltsstoffe:	
NaCl	150 mM
IGEPAL CA-630	1,0%
Sodium Deoxycholat	0,5%
SDS	0,1%
Tris	50 mM
Sodium Vanadat	100 µM
DTT (DL- Dithiothreitol)	1 mM
1 Protease Inhibitor Tablette (Sigma- Aldrich Chemie GmbH)	
Inhaltsstoffe:	
AEBSF	2 mM
EDTA	1 mM
Bestatin	30 µM
E-64	14 µM
Leupeptin	1 µM
Aprotinin	0,3 µM

Der RIPA-Puffer wurde auf den pH-Wert 8,0 eingestellt. Die Homogenisierung der Gewebeprouben erfolgte bei einer Temperatur von 4°C mit einem Glas- Teflon-Homogenisator (Potter S., Melsungen, 1000 rpm, 60 Hübe ins.). Zur Isolierung der extrahierten Proteine wurde das Homogenat für 10 Minuten bei 4°C und 12 000 x g zentrifugiert. Der so entstandene klare Überstand, der die extrahierten Proteine enthielt, wurde zunächst in ein frisches Röhrchen pipettiert, dann auf mehrere Röhrchen portioniert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Das beim Zentrifugieren angefallene Sediment wurde verworfen.

2.2.3 Proteinbestimmung

Sämtliche Proteinbestimmungen in dieser Studie erfolgten nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Als Standard diente bovines Serumalbumin. Die Bestimmung des Proteingehalts der Homogenatproben ergab Werte zwischen 9,04 µg und 54,82 µg Protein pro µl. Auf diese Weise wurde eine Standardisierung der pro Röhrchen im Bindungsassay eingesetzten Menge an Protein möglich.

2.2.4 Beschreibung des Enzym- Linked-Immuno-Sorbent Assays

Zur Erhebung der Konzentrationen der zu bestimmenden Enzyme und Rezeptoren im Hirnhomogenat wurde das Enzym- Linked-Immuno-Sorbent (ELISA) Assay als Nachweisverfahren angewendet.

Bei dem ELISA handelt es sich um einen nicht kompetitiven Assay, wobei das zu messende Substrat wie bei einem Sandwich zwischen spezifischen Antikörpern gebunden wird. In diesem Fall bildeten immobilisierte monoklonale Antikörper, spezifische Detektionsantikörper und Enzym gekoppelte Antikörper zusammen mit dem im

Hirnhomogenat vorhandenen Rezeptor oder Enzym einen Sandwichkomplex. Das ungebundene Material wurde in mehreren Zwischenschritten durch Dekantieren und Waschen entfernt.

Folgende Enzyme und Rezeptoren im Hirnhomogenat wurden mit Hilfe des ELISA untersucht:

- phosphorylierte PKB
- GSK-3 β
- phosphorylierte GSK-3 β (GSK-3 β pSer)
- β - Untereinheit des Insulinrezeptors (IR β)
- phosphorylierter Insulinrezeptor (IR pTyr 1162/1163)

Für die Durchführung wurden spezielle ELISA-Kits der Firma Calbiochem ® verwendet. Die Durchführung des Assays geschah nach Anleitung des Herstellers. Die Lagerung der Kit-reagenzien erfolgte bei 4°C. Vor Versuchsbeginn wurden alle Testkomponenten auf Raumtemperatur (ca. 25°C) gebracht und vor dem Pipettieren gut durchmischt. Folgende Reagenzien sind in einem Kit enthalten:

- zur Erstellung von Standardproben: IR pTyr 1162/1163- Standard/ IR β -Untereinheit - Standard/ GSK-3 β Standard/ GSK-3 β pSer Standard/ PKB- Standard
→ 2x Ampullen, lyophilisiert
- Standard- Verdünnungspuffer : 25ml
- beschichtete Mikrotiterplatte: 96 Nöpfchen (wells) pro Platte
- Detektionsantikörper-Lösung : 1x Flasche, 11ml
- mit Meerrettichperoxidase gekoppelte Antikörper (IgG HRP): 125 μ l pro Ampulle
- Verdünnungspuffer für die Rekonstitution der IgG HRP: 25ml
- Wasch-Puffer Konzentrat: 100ml
- Substratlösung : Tetramethylbenzidin (TMB), 25ml
- Stopplösung : 25ml

Vor Durchführung der Versuchsreihen erfolgte die Präparation und Rekonstitution der IgG-HRP, des Waschpuffers und der Standardproben. Nach Rekonstitution verblieben die Reagenzien bei Raumtemperatur.

Tab.5 Rekonstitutionsschema für IgG-HRP

Anzahl der Mikrotiterplatten- Streifen (8 wells pro Streifen)	IgG-HRP Konzentrat	Verdünnungspuffer
2	20 μ l	2 ml
4	40 μ l	4 ml
6	60 μ l	6 ml
8	80 μ l	8 ml
10	100 μ l	10 ml
12	120 μ l	12 ml

Nachfolgend wird die Rekonstitution der Standardproben für die jeweiligen ELISA-Kits erläutert. Die lyophilisierten Standardproben wurden bei der Rekonstitution vollständig gelöst und vor dem Pipettieren gut durchmischt. Nach erfolgter Rekonstitution sollten die Proben

innerhalb 1h verwendet werden. In den nachfolgenden Tabellen wird dargestellt, wie die Standardproben im Pipettierschema eingesetzt wurden:

- Standardproben für IR pTyr 1162/1163: Rekonstitution mit 1,6 ml Standardverdünnungspuffer
- Standardproben für IR β Rekonstitution mit 0,3 ml Standardverdünnungspuffer
- Standardproben für GSK-3 β : Rekonstitution mit 1,25 ml Puffer
- Standardproben für GSK-3 β pSer: Rekonstitution mit 1,00 ml Puffer
- Standardproben für PKB: Rekonstitution mit 0,8ml Puffer

Tab. 6 Standardkonzentrationen

Standard	IR pTyr 1162/1163	IR β	GSK-3 β	GSK-3 β pSer	PKB
ng/ml; Units/ml	100 Units/ml	60 ng/ml	25 ng/ml	100 Units/ ml	100 Units/ml

Die nachfolgende Tabelle zeigt exemplarisch für IR β , welches Pipettierschema für die Verdünnungsreihen der Standardproben eingesetzt wurde.

Tab.7 Verdünnungsreihe von IR β

Standard		hinzufügen in:
A 60 ng/ml		
B 30 ng/ml	0,25 ml von Standard A →	0,25 ml Verdünnungspuffer
C 15 ng/ml	0,25 ml von Standard B →	0,25 ml Verdünnungspuffer
D 7,5 ng/ml	0,25 ml von Standard C →	0,25 ml Verdünnungspuffer
E 3,75 ng/ml	0,25 ml von Standard D →	0,25 ml Verdünnungspuffer
F 1,87 ng/ml	0,25 ml von Standard E →	0,25 ml Verdünnungspuffer
G 0,94 ng/ml	0,25 ml von Standard F →	0,25 ml Verdünnungspuffer
H 0 ng/ml	0,25 ml Puffer	leeres Röhrchen

Zur Erzielung von optimalen Ergebnissen wurden die verwendeten Proben des Hirngewebshomogenats der jeweiligen Hirnregionen mit Hilfe des Standard-Verdünnungspuffers verdünnt. Die nachfolgende Tabelle veranschaulicht den Verdünnungsfaktor der Proben für die jeweiligen ELISA- Kits:

Tab. 8 Verdünnungsfaktor der Proben

Enzym/Rezeptor		Verdünnungsfaktor der Proben:
IR pTyr 1162/1163	→	1:10
IR β	→	1:10
GSK-3 β	→	1: 300
GSK-3 β pSer	→	1: 10
PKB	→	1: 10

Zunächst erfolgte die Gabe von jeweils 100µl (50µl bei GSK-3 β pSer und GSK-3 β) der Standardreihe und Homogenatproben in die Assay- Röhren der Mikrotiterplatte. Zur Fehlerminimierung werden die Rezeptor- und Proteinbestimmungen als Dreifachmessungen ausgeführt. Nach 2h Inkubationszeit bei Raumtemperatur werden 100µl Detektionsantikörperlösung (50µl bei GSK-3 β / GSK-3 β pSer) in jedes Assay-Röhren pipettiert. Nach einer weiteren Inkubationsstunde wird die Platte zur Entfernung von ungebundenem und überschüssigem Material 4-mal mit einem speziellen ELISA- Waschpuffer gewaschen. Es folgt die Zugabe von 100µl IgG-HRP- Lösung und 30 Minuten Inkubationszeit. Nach einem erneuten Waschgang erfolgt die Gabe von 100µl HRP- Substratlösung und eine Inkubationszeit von 30 min bei Dunkelheit. Die Enzymreaktion wird anschließend durch die Gabe von 100µl Stopplösung aufgehalten. Es erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung der Platte sollte innerhalb der nächsten 2 Stunden erfolgen.

Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgt mit einem speziellen ELISA-Spektrophotometer bei 450 nm.

Die nachfolgende Tabelle veranschaulicht, welches Pipettierschema für die Proben der verschiedenen Hirnregionen eingesetzt wurde.

Hier ist exemplarisch das Pipettierschema für die Proben aus dem frontalen Kortex und Hippokampus für IR β dargestellt.

Tab. 9 Pipettierschema für die Proben aus dem frontalen Kortex und Hippokampus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Puffer	Puffer	Puffer	FC 2 1:10	FC 2 1:10	FC 2 1:10	FC 10 1:10	FC 10 1:10	FC 10 1:10	K FC8 1:10	K FC8 1:10	FC8 1:10
B	Std G	Std G	Std G	FC 3 1:10	FC 3 1:10	FC 3 1:10	K FC1 1:10	K FC1 1:10	K FC1 1:10	K FC9 1:10	K FC9 1:10	K C9 1:10
C	Std F	Std F	Std F	FC 4 1:10	FC 4 1:10	FC 4 1:10	K FC2 1:10	K FC2 1:10	K FC2 1:10	HIP1 1:10	HIP1 1:10	HIP1 1:10
D	Std E	Std E	Std E	FC 5 1:10	FC 5 1:10	FC 5 1:10	K FC3 1:10	K FC3 1:10	K FC3 1:10	HIP 2 1:10	HIP 2 1:10	HIP 2 1:10
E	Std D	Std D	Std D	FC 6 1:10	FC 6 1:10	FC 6 1:10	K FC4 1:10	K FC4 1:10	K FC4 1:10	HIP 3 1:10	HIP 3 1:10	HIP 3 1:10
F	Std C	Std C	Std C	FC 7 1:10	FC 7 1:10	FC 7 1:10	K FC5 1:10	K FC5 1:10	K FC5 1:10	HIP 4 1:10	HIP 4 1:10	HIP 4 1:10
G	Std B	Std B	Std B	FC 8 1:10	FC 8 1:10	FC 8 1:10	K FC6 1:10	K FC6 1:10	K FC6 1:10	HIP 5 1:10	HIP 5 1:10	HIP5 1:10
H	FC 1 1:10	FC 1 1:10	FC 1 1:10	FC 9 1:10	FC 9 1:10	FC 9 1:10	K FC7 1:10	K FC7 1:10	K FC7 1:10	leer		

Std G- Std B= Verdünnungsreihe der Standardproben, hier exemplarisch für IR β:

Std B= 30 ng/ml, Std C= 15 ng/ml, Std D= 7,5 ng/ml, Std E= 3,75 ng/ml, Std F=1,87 ng/ml, Std G= 0,94 ng/ml (siehe auch Tabl. 7)

FC 1- FC 10 = Hirngewebeproben der SHR aus dem frontalen Kortex, Verdünnungsfaktor der Proben: 1:10

K FC 1- K FC 9= Hirngewebeproben der gesunden Kontrollratten aus dem frontalen Kortex, Verdünnungsfaktor der Proben: 1:10

HIP 1-5= Hirngewebeproben der SHR aus dem Hippokampus, Verdünnungsfaktor der Proben: 1:10

FC = frontaler Kortex, **HIP=**Hippokampus, **IR β =** β - Untereinheit des Insulinrezeptors;

K= gesunde Kontrollratten, **SHR=** Spontan Hypertensive Ratten; **Std=** Standardproben

2.3 Statistik

Für die statistischen Berechnungen wurde das Programm StatView 5.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA; Version 5) verwendet. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben. Die Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt und die erhobenen Probenwerte der SHR im Verhältnis darauf bezogen. Als signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ angesehen.

Bei der Prüfung auf regionale Verteilungsunterschiede der β - Untereinheit des Insulinrezeptors, des phosphorylierten Insulinrezeptors, der GSK-3 β , der GSK-3 β pSer und der Proteinkinase B für die Prüfung auf Gruppenunterschiede wurde die einfaktorielle ANOVA als einfache Varianzanalyse verwendet.

Zur statistischen Auswertung der Verteilung der gemessenen Enzyme und Rezeptoren und Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen Gruppenmittelwerten wurden die Post- Hoc Tests Fisher PLSD und Scheffé- Test eingesetzt.

Mit Hilfe der einfachen linearen Regressionanalyse wurde der Zusammenhang zwischen einer unabhängigen und einer abhängigen Variable untersucht, nämlich der Zusammenhang zwischen dem gemessenen Rezeptor/ Enzym und dem Körpergewicht, dem Nüchtern-Blutzuckerspiegel und Blutzuckerspiegel 30 min nach dem Glukosetoleranztest.

3. Ergebnisse

3.1 β - Untereinheit des zerebralen Insulinrezeptors

3.1.1 Nachweis der β -Untereinheit des Insulinrezeptors

In allen untersuchten Hirnregionen ließ sich IR β nachweisen. Der Mittelwert der Konzentration betrug für die Gesamtkontrollgruppe 8,277 ng/ ng Protein (SD \pm 0, 677) und für die Gesamtgruppe der SHR 2,768 ng/ng Protein (SD \pm 0,210). Abbildung 7 zeigt die gemessene Insulinrezeptorkonzentration der Gesamtkontrollgruppe und der SHR in Prozent.

Beim Gruppenvergleich war die mittlere Konzentration der Gesamtgruppe der SHR um 67% niedriger als die der Gesamtkontrollgruppe und unterschied sich im Scheffé- Test signifikant ($p < 0,0001$) von der Gesamtkontrollgruppe.

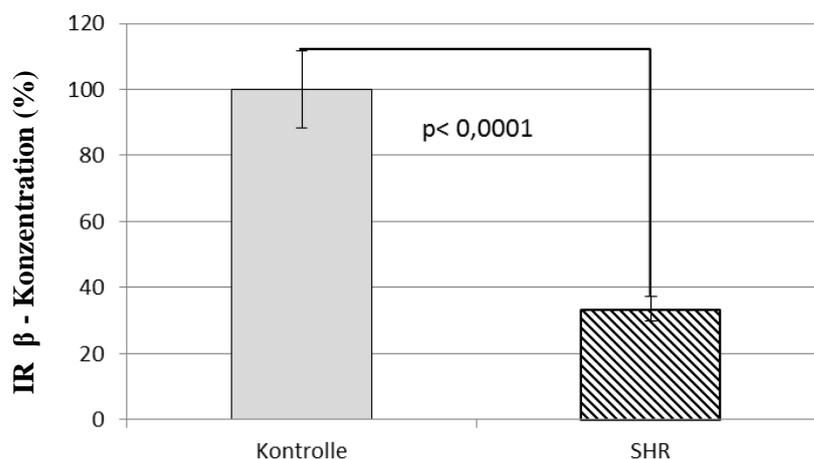


Abb. 7 Insulinrezeptor (IR β) - Konzentration der Gesamtkontrollgruppe und der Gesamtgruppe der Spontan Hypertensiven Ratten (SHR) in Prozent.

Die Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt und die Probenwerte der SHR im Verhältnis darauf bezogen. ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $p < 0,0001$, n (Kontrollratten)= 9, n (SHR) = 10

3.1.2 Konzentrationsunterschiede des Insulinrezeptors in den einzelnen Hirnregionen

Es wurden die Insulinrezeptorkonzentrationen der SHR und der Kontrollgruppe in den jeweils gleichen Hirnregionen miteinander verglichen und auf signifikante Variationen für den Insulinrezeptor mittels Post- Hoc Scheffé - Test untersucht. Als signifikant wurden p- Werte von $p < 0,05$ angesehen. Im frontalen Kortex der SHR zeigte sich eine signifikante 74%ige Reduzierung der Insulinrezeptor-Gesamtmenge gegen über der Kontrollgruppe. (ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $p < 0,0001$, Abb. 8). Ebenso konnte ein signifikanter Unterschied der Insulinkonzentrationen zwischen den beiden Gruppen im Hippokampus (ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $p < 0,0004$) und Striatum (ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $p < 0,0096$) festgestellt werden. Im Hippokampus der SHR war die mittlere Konzentration an IR β um 64% geringer als in der gleichen Hirnregion der Kontrollgruppe, im Striatum betrug der Unterschied zwischen beiden Gruppen 70%.

Im Hypothalamus unterschied sich die Gruppe der SHR bezüglich der Insulinrezeptorkonzentration nicht signifikant von der Gruppe gesunder Ratten (ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $p > 0,9999$).

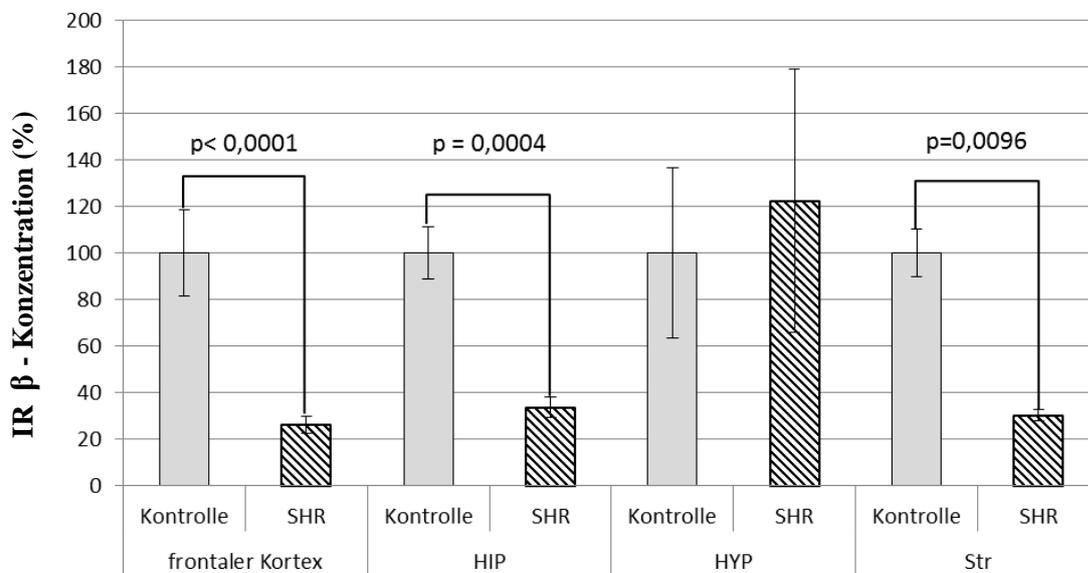


Abb. 8 Insulinrezeptor (IR β)- Konzentration der Kontrollgruppe und Spontan Hypertenisven Ratten (SHR) in den einzelnen Hirnregionen in Prozent.

Die Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt und die Probenwerte der SHR im Verhältnis darauf bezogen. ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $n(\text{Kontrollratten}) = 9$, $n(\text{SHR}) = 10$

HIP= Hippokampus, **Hyp**= Hypothalamus, **Str**= Striatum

3.1.3 Korrelationen des Insulinrezeptors

In der einfachen Regressionsanalyse ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,437$ mit statistischer Signifikanz ($p = 0,0004$) zwischen der Insulinrezeptorkonzentration und dem Nüchtern- Blutzuckerspiegel (Abb. 9, a)). Eine Korrelation zwischen der Insulinrezeptorkonzentration und dem Blutzuckerspiegel 30 min nach dem Glukosetoleranztest konnte nicht festgestellt werden ($p > 0,05$; $r = 0,113$, Abb. 9, b)).

Zwischen der Insulinrezeptorkonzentration und dem Körpergewicht zeigte sich eine Korrelation mit statistischer Signifikanz ($p < 0,0001$) und einem errechnetem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,681$ (Abb. 9, c)).

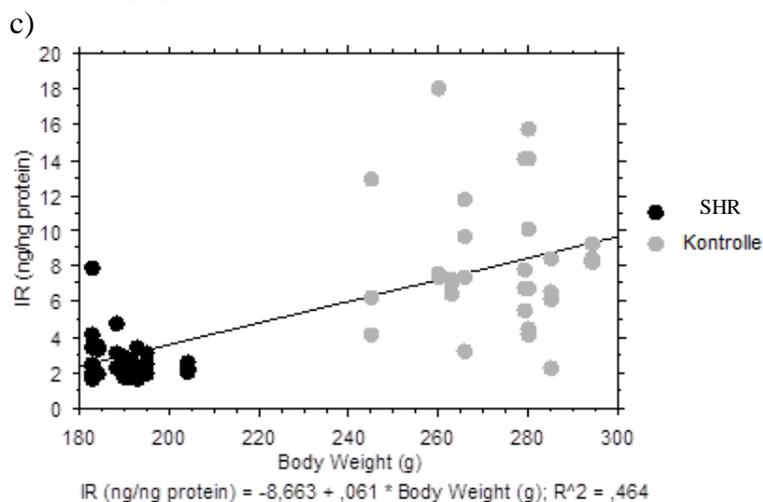
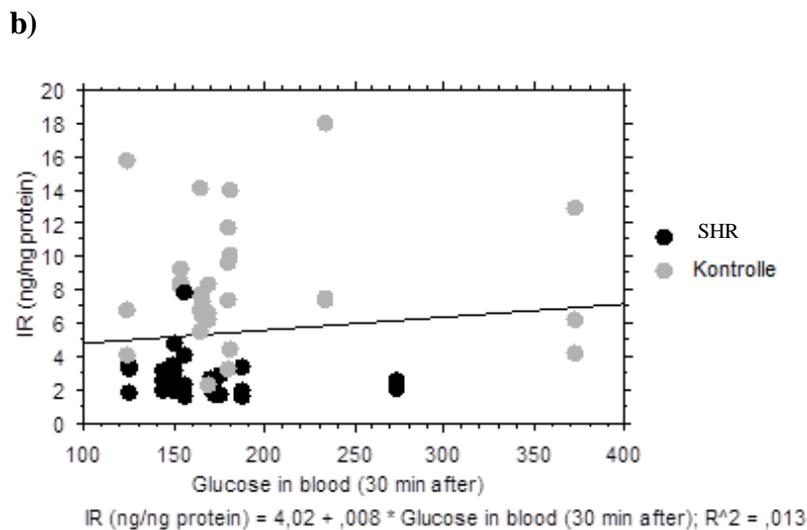
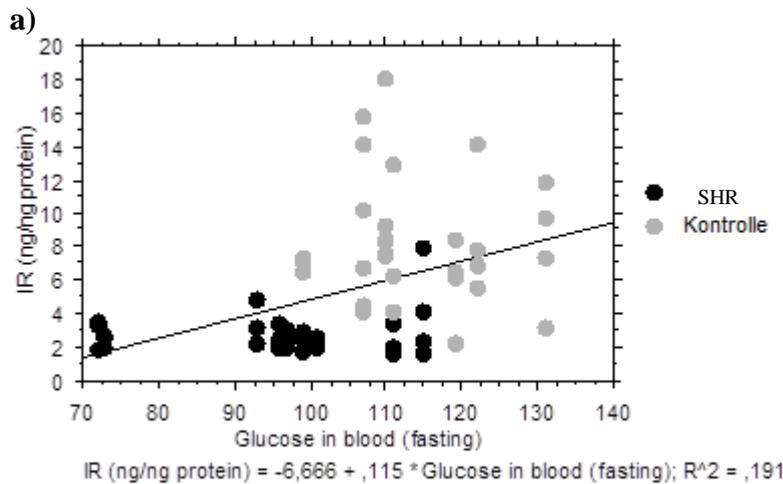


Abb. 9 a) Insulinrezeptorkonzentration (IR) in Abhängigkeit vom Nüchtern-Blutzuckerspiegel ($p = 0,004$; $r = 0,437$)
 b) IR Konzentration in Abhängigkeit vom Blutzuckerspiegel (30 min nach Glukose- Toleranztest) ($p = 0,3833$; $r = 0,113$)
 c) Insulinrezeptorkonzentration in Abhängigkeit vom Körpergewicht ($p < 0,001$; $r = 0,681$)

IR= β - Untereinheit des Insulinrezeptors; **SHR**= Spontan Hypertensive Ratten; **Kontrolle**= gesunde Kontrollratten

3.2 Phosphorylierter Insulinrezeptor

3.2.1 Nachweis des phosphorylierten Insulinrezeptors

In der Gesamtkontrollgruppe ließ sich der IR pTyr mit einem Mittelwert von 1,243 ng/ ng Protein (SD +/- 0,061) und in der Gesamtgruppe der SHR mit einem Mittelwert von 1,099 ng/ng Protein (SD +/- 0,033) nachweisen.

Die nachfolgende Abbildung 10 gibt die IR pTyr - Konzentration der beiden Gesamtgruppen in Prozent wieder. Beim Gruppenvergleich ergab sich bei der Gruppe der SHR eine um 12% niedrigere Konzentration an IR pTyr als in der Gesamtkontrollgruppe. Dieser Unterschied erwies im PostHoc Scheffé –Test als signifikant ($p < 0,0360$).

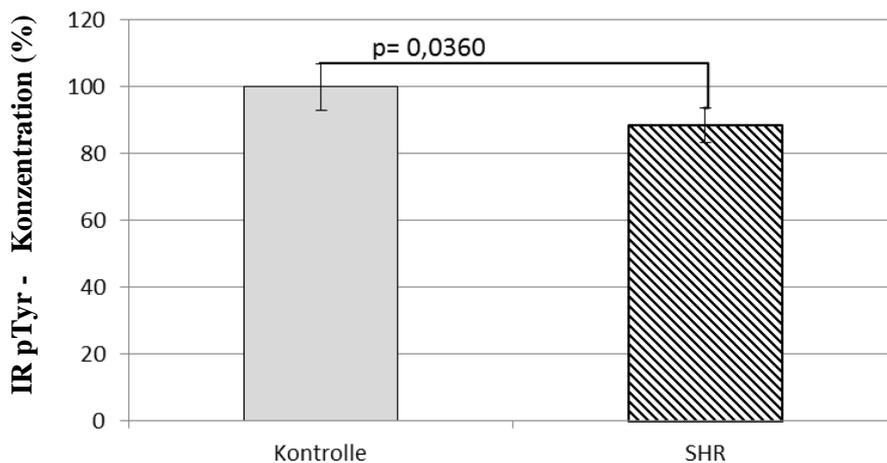


Abb. 10 Konzentration an phosphorylierten Insulinrezeptoren (IR pTyr) der Gesamtkontrollgruppe und Gesamtgruppe der Spontan Hypertensiven Ratten (SHR) in Prozent. Die Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt und die Probenwerte der SHR im Verhältnis darauf bezogen. ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $p = 0,0360$, $n(\text{Kontrollratten}) = 9$, $n(\text{SHR}) = 10$

3.1.2 Konzentrationsunterschiede des phosphorylierten Insulinrezeptors in den einzelnen Hirnregionen

Der Vergleich der Konzentrationen an phosphorylierten Insulinrezeptoren in den jeweils gleichen Hirnregionen ergab sowohl in frontalen Kortex (ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $p > 0,9998$, Abb.11) als auch im Hippokampus (ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $p > 0,9926$) keinen signifikanten Unterschied. Lediglich im Striatum war die gemessene Konzentration in der Gruppe der SHR signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $p < 0,0070$). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen betrug im Striatum 22%. Aufgrund der begrenzten Anzahl des zur Verfügung stehenden Gewebes des Hypothalamus, konnte eine statistische Auswertung in dieser Hirnregion nicht erfolgen.

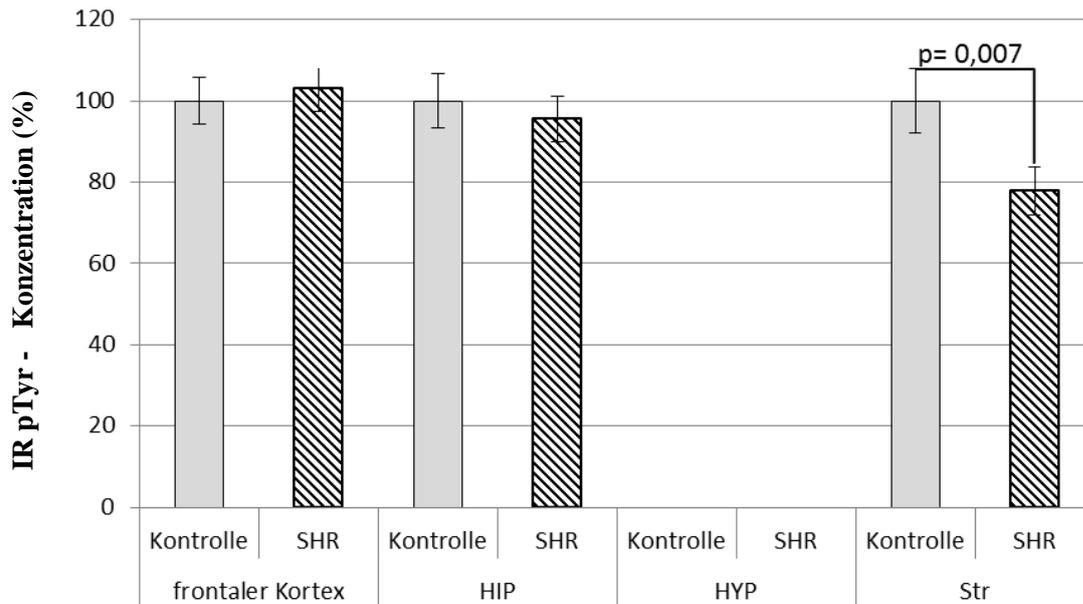
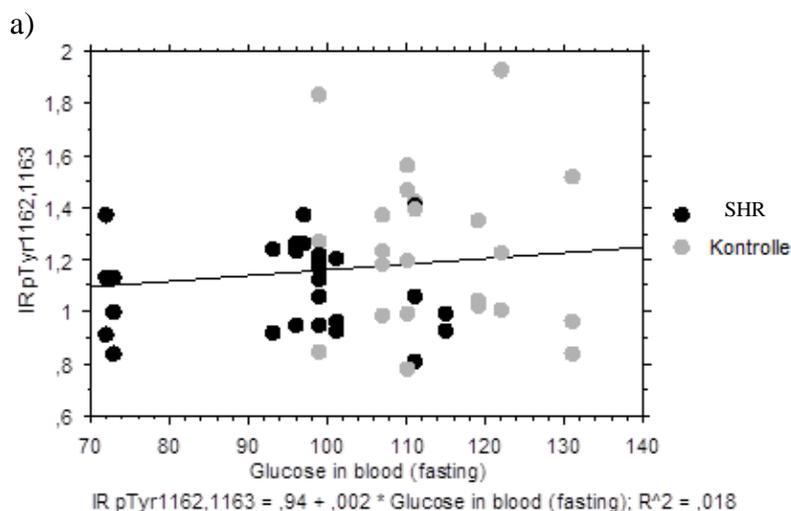


Abb. 11 Konzentration an phosphorylierten Insulinrezeptoren (IR pTyr) der Kontrollgruppe und Spontan Hypertensiven Ratten (SHR) in den einzelnen Hirnregionen in Prozent. Die Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt und die Probenwerte der SHR im Verhältnis darauf bezogen. ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, n(Kontrollratten)= 9, n (SHR) = 10 **HIP**= Hippokampus, **Hyp**= Hypothalamus, **Str**= Striatum

3.2.3 Korrelationen des phosphorylierten Insulinrezeptors

In der einfachen Regressionsanalyse konnte keine Korrelation mit statistischer Signifikanz zwischen der Konzentration phosphorylierter Insulinrezeptoren, dem Nüchternblutzuckerspiegel und dem Blutzuckerspiegel 30 min nach Glukosetoleranztest festgestellt werden (in jedem Falle $p > 0,05$, Abb. 12, a), b)). Die Konzentration phosphorylierter Insulinrezeptoren zeigte auch keinen signifikanten tendenziellen Zusammenhang zum Körpergewicht ($p > 0,05$; $r = 0,252$, Abb. 12, c)).



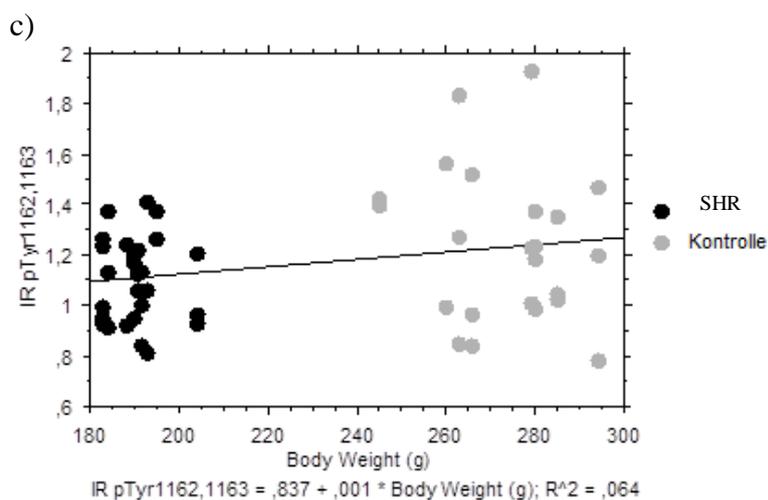
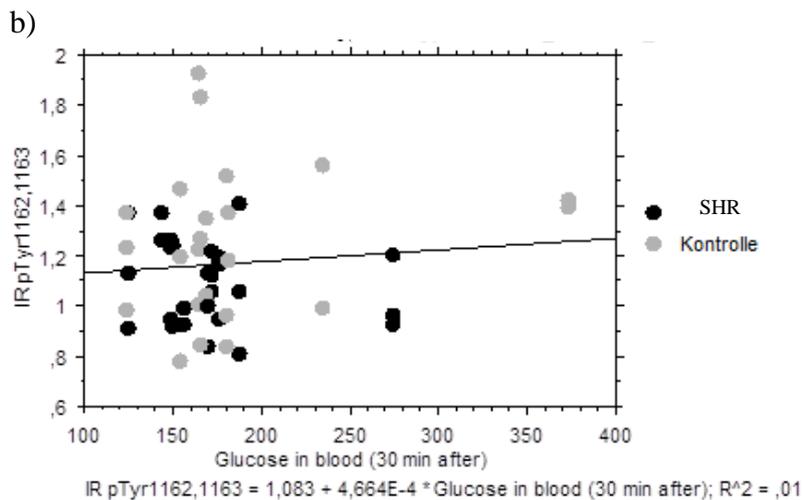


Abb. 12 a) Insulinrezeptorkonzentration in Abhängigkeit vom Nüchtern-Blutzuckerspiegel ($p = 0,3525$; $r = 0,133$)
 b) Insulinrezeptorkonzentration in Abhängigkeit vom Blutzuckerspiegel (30 min nach Glukose- Toleranztest) ($p = 0,4879$; $r = 0,099$)
 c) Insulinrezeptorkonzentration in Abhängigkeit vom Körpergewicht ($p = 0,0742$, $r = 0,252$)

IR pTyr 1162,1163 = phosphorylierter Insulinrezeptor ; **SHR**= Spontan Hypertensive Ratten;
Kontrolle= gesunde Kontrollratten

3.2.4 Verhältnis zwischen phosphorylierten Insulinrezeptor und der β -Untereinheit des Insulinrezeptors

Der Quotient errechnete sich aus der mittleren Gesamtkonzentration der IR pTyr und der mittleren Gesamtkonzentration der IR β . Der IR pTyr / IR β - Quotient der SHR war dabei im Vergleich zur Kontrollgruppe insgesamt signifikant erhöht. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen betrug 194 % (ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $p < 0,0001$, Abb. 13).

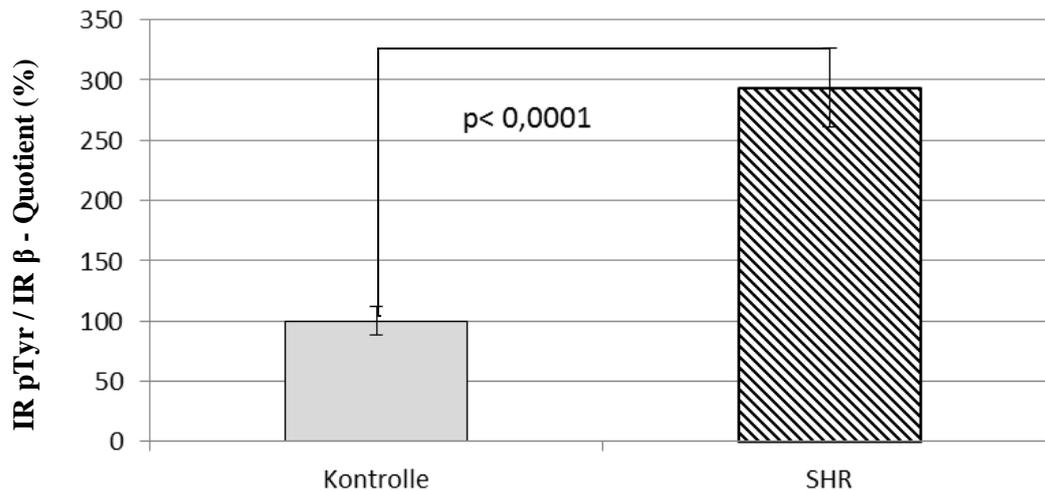


Abb. 13 Quotient aus phosphorylierten Insulinrezeptor (IR pTyr) und β -Untereinheit des Insulinrezeptors (IR β) der Spontan Hypertensiven Ratten (SHR) und der Kontrollgruppe in Prozent. Die Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt und die Probenwerte der SHR im Verhältnis darauf bezogen.

ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $p < 0,0001$, $n(\text{Kontrollratten}) = 9$, $n(\text{SHR}) = 10$

Bei Betrachtung der Daten in den einzelnen Hirnregionen zeigten sich durchgehend in allen Hirnregionen signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen bezüglich des Verhältnisses IR pTyr / IR β . Im frontalen Kortex der SHR zeigte sich ein um bis zu 254 % höherer Quotient. Im Hippokampus betrug der Unterschied 200 %, im Striatum der SHR war der Quotient 172 % deutlich erhöht (ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, in allen Fällen $p < 0,05$, Abb. 14). Da nicht ausreichend Gewebe des Hypothalamus zur Verfügung stand, war eine statistische Auswertung in dieser Hirnregion leider nicht möglich.

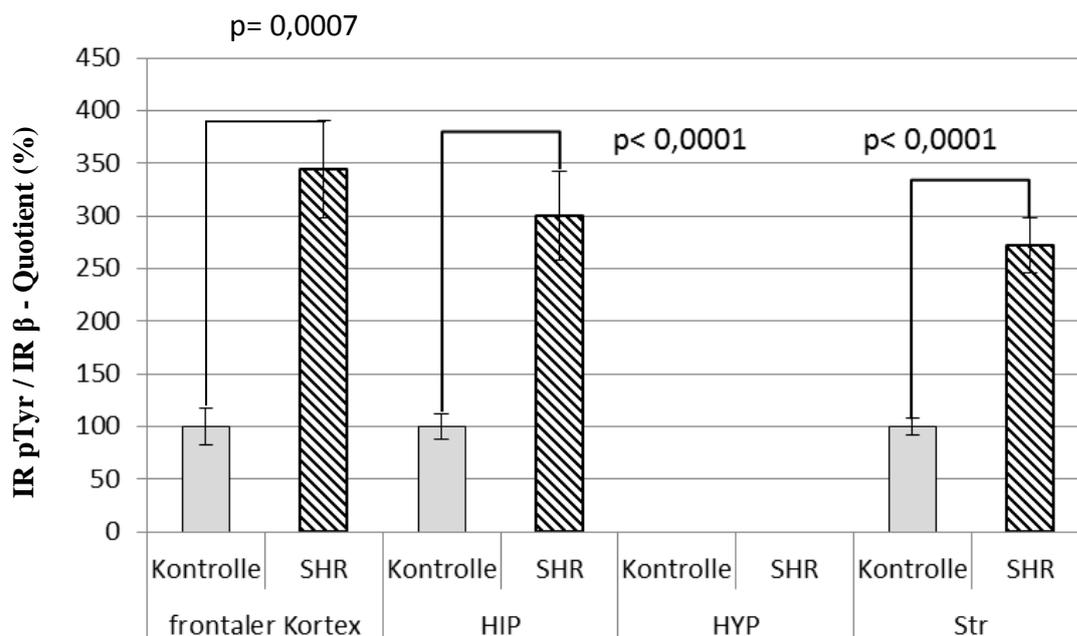


Abb. 14 Quotient aus phosphorylierten Insulinrezeptor (IR pTyr) und der β -Untereinheit des Insulinrezeptors (IR β) der Kontrollgruppe und der Spontan Hypertensiven Ratten (SHR) in den einzelnen Hirnregionen in Prozent. Die Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt und die Probenwerte der SHR im Verhältnis darauf bezogen. ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, in allen Fällen $p < 0,05$, $n(\text{Kontrollratten}) = 9$, $n(\text{SHR}) = 10$

HIP= Hippokampus, **HYP**= Hypothalamus, **Str**= Striatum

3.3 Proteinkinase B

3.3.1 Nachweis der Proteinkinase B

Die Proteinkinase B ließ sich ebenfalls in allen untersuchten Hirnregionen in unterschiedlichen Konzentrationen nachweisen.

Bei der Gesamtkontrollgruppe ergab sich eine mittlere Konzentration von 0,788 ng/ng Protein (SD +/- 0,075), bei der Gesamtgruppe der SHR betrug die mittlere Konzentration 0,593 ng/ng Protein (SD +/- 0,062).

Abbildung 15 veranschaulicht die nachgewiesenen PKB- Konzentrationen beider Gesamtgruppen in Prozent. Die gemessene Konzentration in der Gruppe der SHR war im Vergleich zur Gesamtkontrollgruppe um 25% niedriger. Dieser Unterschied verfehlte im Scheffé- Test knapp das Signifikanzniveau mit einem p- Wert von 0,0532.

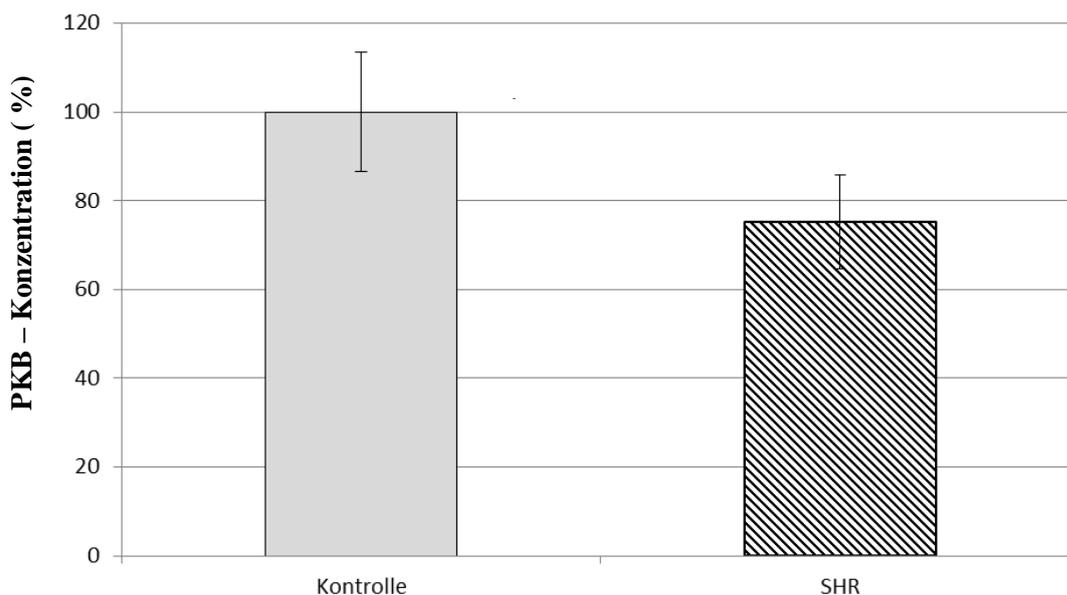


Abb. 15 Proteinkinase B (PKB) - Konzentration der Gesamtkontrollgruppe und Gesamtgruppe der Spontan Hypertensiven Ratten (SHR) in Prozent. Die Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt und die Probenwerte der SHR im Verhältnis darauf bezogen. ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $p = 0,0532$, $n(\text{Kontrollratten}) = 9$, $n(\text{SHR}) = 10$

3.3.2 Konzentrationsunterschiede der Proteinkinase B in den einzelnen Hirnregionen

Mittels Scheffé –Test wurden die Konzentrationen der phosphorylierten Proteinkinase B der zwei Gruppen in den jeweiligen Hirnregionen miteinander verglichen und gegenübergestellt. Signifikant unterschied sich die Konzentration der PKB in der Gruppe der SHR von der der Kontrollgruppe im Hippokampus (ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $p < 0,0001$, Abb.16). Der Unterschied im Hippokampus betrug 61%. In den anderen Hirnregionen erreichten die Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden Gruppen in der jeweils gleichen Hirnregion nicht das Signifikanzniveau. Im frontalen Kortex war die gemessene PKB- Konzentration der SHR rund 11% höher als die der Kontrollgruppe, im Striatum dagegen war sie nur 2% niedriger als die der Kontrollgruppe. Auch hier konnte, aufgrund der begrenzten Anzahl des zur Verfügung stehenden Gewebes des Hypothalamus, keine statistische Auswertung in dieser Hirnregion erhoben werden.

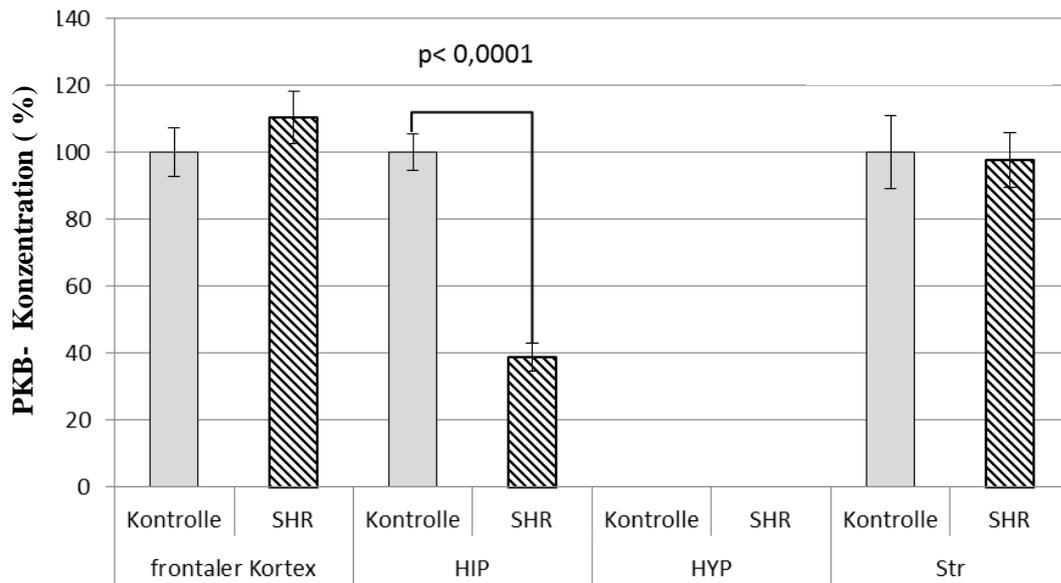
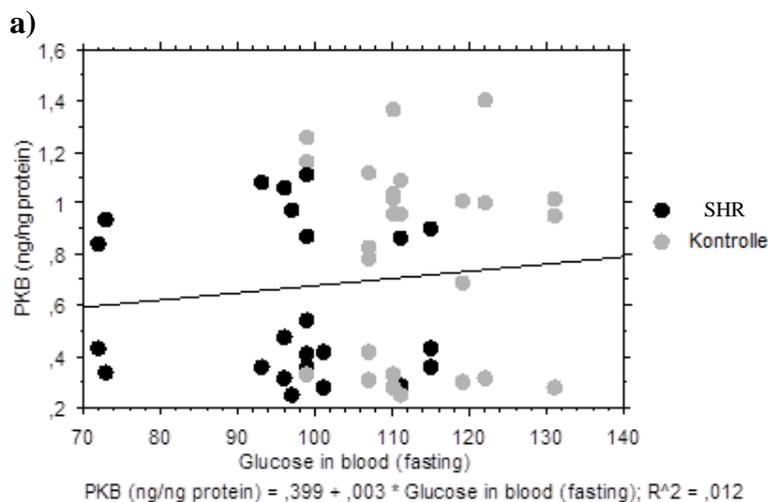


Abb. 16 Proteinkinase B (PKB)- Konzentration der Kontrollgruppe und Spontan Hypertensiven Ratten (SHR) in den einzelnen Hirnregionen in Prozent. Die Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt und die Probenwerte der SHR im Verhältnis darauf bezogen. ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, n(Kontrollratten)= 9, n (SHR) = 10
HIP= Hippokampus, **HYP**= Hypothalamus, **Str**= Striatum

3.3.3 Korrelationen der Proteinkinase B

Weder bei der Kontrollgruppe noch bei den SHR war eine Korrelation zwischen der PKB-Konzentration, dem Blutzuckerspiegel und dem Körpergewicht der Versuchstiere festzustellen (in jedem Falle $p > 0,05$, Abb. 17, a)- c)).



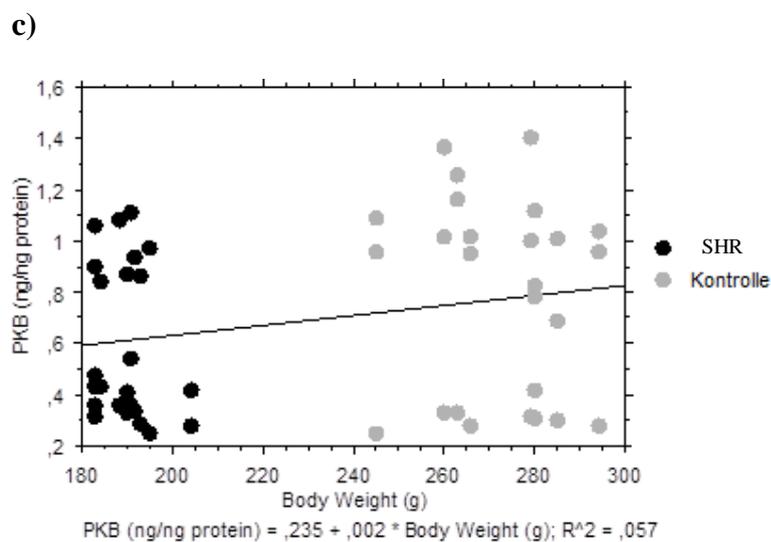
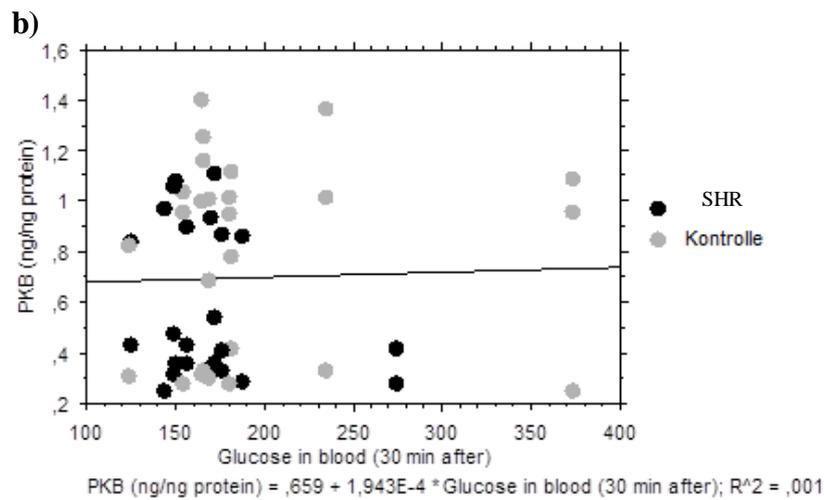


Abb.17 a) PKB- Konzentration in Abhängigkeit vom Nüchtern- Blutzuckerspiegel (p = 0,4534; r = 0,108)
 b) PKB- Konzentration in Abhängigkeit vom Blutzuckerspiegel (30 min nach Glukose- Toleranztest) (p = 0,8288; r = 0,031)
 c) PKB- Konzentration in Abhängigkeit vom Körpergewicht (p = 0,0955; r = 0,238)

PKB= Proteinkinase B; **SHR**= Spontan Hypertensive Ratten; **Kontrolle**= gesunde Kontrollratten

3.4 Glykogensynthase Kinase 3 β

3.4.1 Nachweis der Glykogensynthase Kinase 3 β

Die gemessene mittlere Konzentration der GSK 3 β betrug für die Gesamtkontrollgruppe 184,655 ng/ng Protein (SD +/- 26,191), für die Gesamtgruppe der SHR betrug sie 94,499 ng/ng Protein (SD +/- 17,209). Die GSK 3 β –Konzentrationen der beiden Gesamtgruppen wurden miteinander verglichen und in der nachfolgenden Abbildung in Prozent dargestellt. Die GSK- 3 β Konzentration der Gesamtgruppe der SHR war um 49 % niedriger als die der Gesamtkontrollgruppe. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen erreichte im Scheffé- Test das Signifikanzniveau ($p= 0,0049$, Abb. 18).

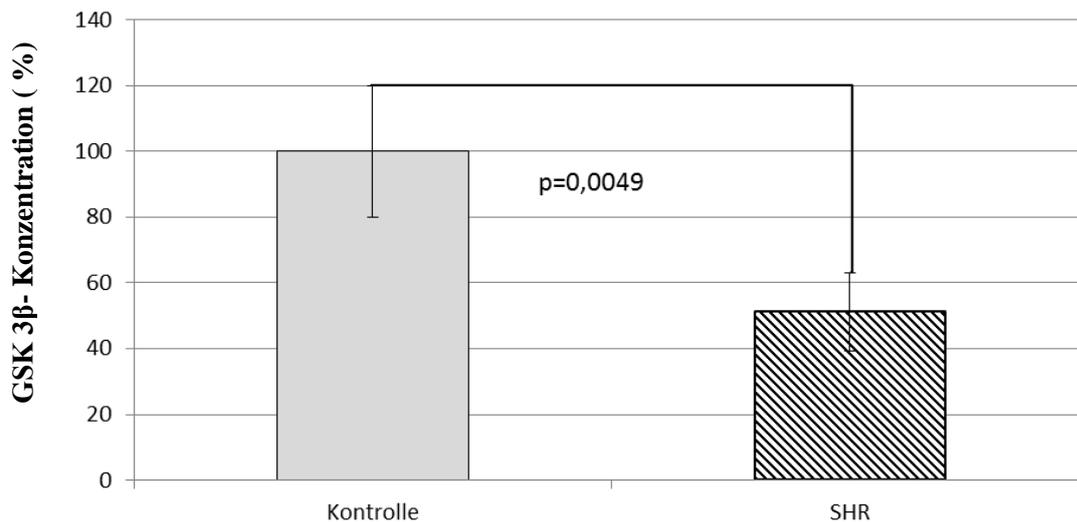


Abb.18 Glykogensynthase Kinase 3 β (GSK 3 β) - Konzentration der Gesamtkontrollgruppe und Gesamtgruppe der Spontan Hypertensiven Ratten (SHR) in Prozent. Die Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt und die Probenwerte der SHR im Verhältnis darauf bezogen. ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $p= 0,0049$, $n(\text{Kontrollratten})= 9$, $n(\text{SHR}) = 10$

3.4.2 Konzentrationsunterschiede der Glykogensynthase Kinase 3 β in den einzelnen Hirnregionen

In Abbildung 19 wurden die GSK 3 β - Konzentrationen beider Gruppen in den verschiedenen Hirnregionen in Prozent dargestellt und untereinander verglichen. Beim Vergleich der GSK- 3 β - Konzentrationen beider Gruppen in den einzelnen Hirnregionen ergab sich im Scheffé- Test kein signifikanter Unterschied (in allen Fällen $p> 0,05$).

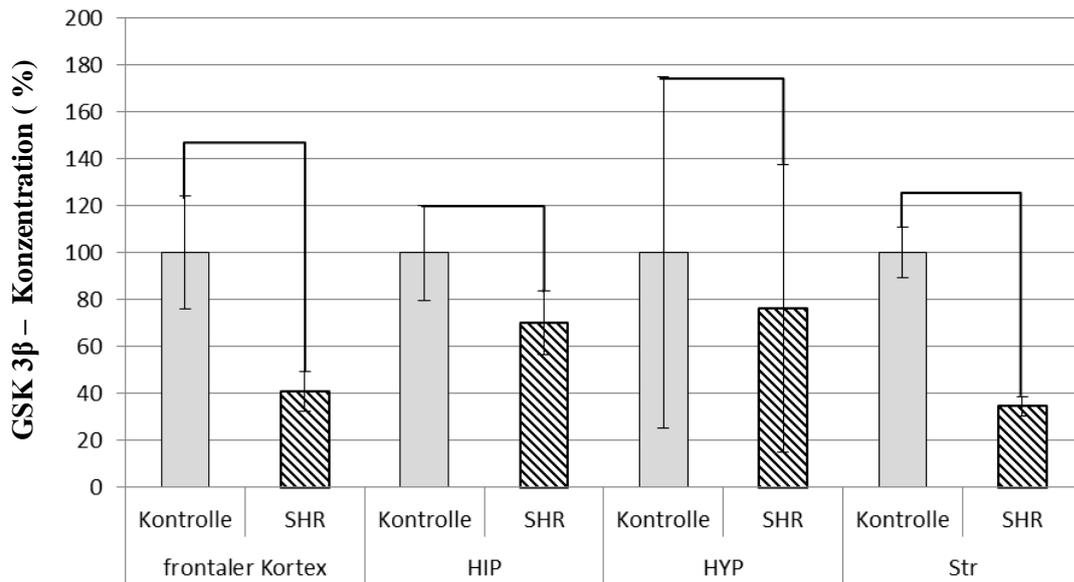


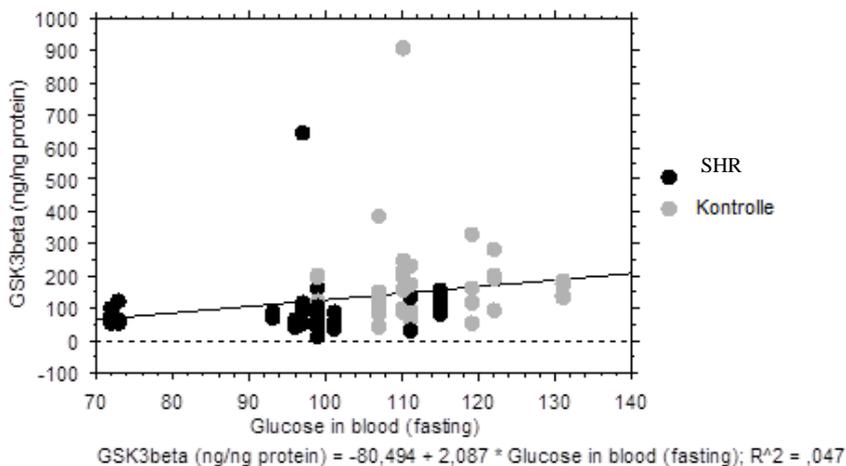
Abb. 19 Glykogensynthase Kinase 3 β (GSK 3 β) -Konzentration der Kontrollgruppe und Spontan Hypertensiven Ratten (SHR) in den einzelnen Hirnregionen in Prozent. Die Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt und die Probenwerte der SHR im Verhältnis darauf bezogen. ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, in allen Fällen $p > 0,05$; $n(\text{Kontrollratten}) = 9$, $n(\text{SHR}) = 10$

HIP= Hippokampus, **HYP**= Hypothalamus, **Str**= Striatum

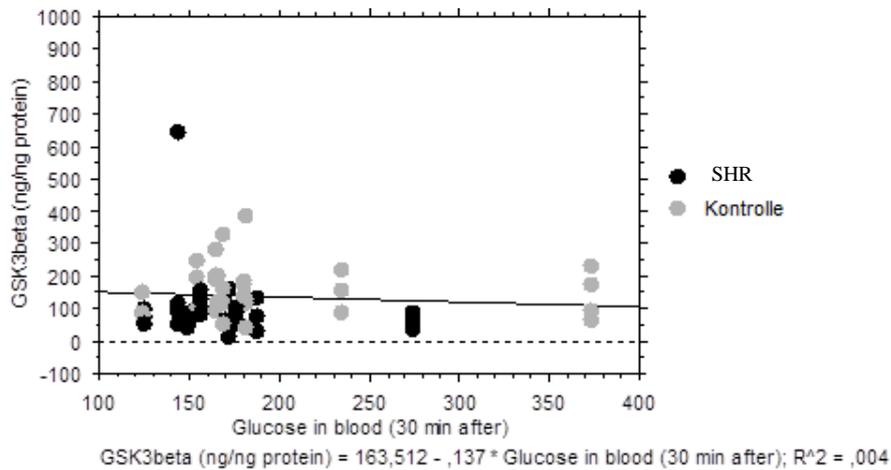
3.4.3 Korrelationen der Glykogensynthase Kinase 3 β

Eine Korrelation mit statistischer Signifikanz konnte in der einfachen Regressionsanalyse zwischen der GSK-3 β Konzentration und dem Blutzuckerspiegel nicht festgestellt werden (in jedem Falle $p > 0,05$, Abb. 20, a), b)). Dagegen zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang mit einem errechnetem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,377$ zwischen der GSK-3 β -Konzentration und dem Körpergewicht ($p = 0,0016$, Abb. 20, c)).

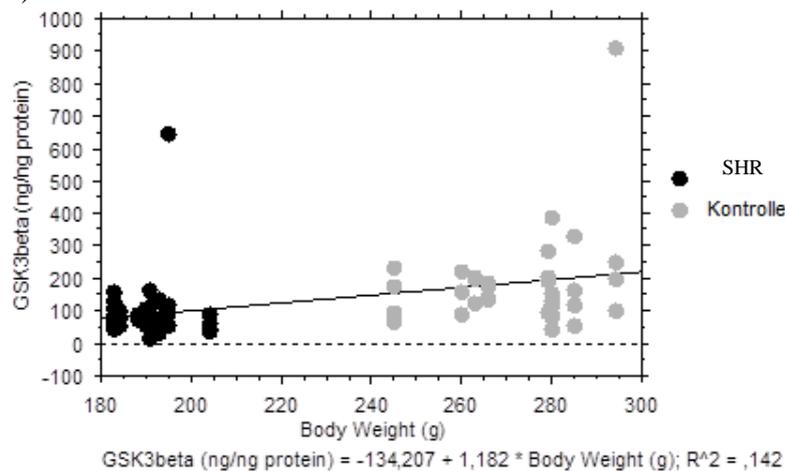
a)



b)



c)



- Abb.20** a) GSK 3 β - Konzentration in Abhängigkeit vom Nüchtern- Blutglukosespiegel (p = 0,0744; r = 0,218)
 b) GSK 3 β - Konzentration in Abhängigkeit vom Blutzuckerspiegel (30 min nach Glukose- Toleranztest) (p = 0,6286 ; r = 0,06)
 c) GSK 3 β - Konzentration in Abhängigkeit vom Körpergewicht (p = 0,0016; r = 0,377)

GSK-3 beta= Glykogensynthese Kinase 3 β ; **SHR**= Spontan Hypertensive Ratten;
Kontrolle= gesunde Kontrollratten

3.5 Phosphorylierte Glykogensynthase Kinase 3 β

3.5.1 Nachweis der phosphorylierte Glykogensynthase Kinase 3 β

Die Messungen der GSK 3 β pSer ergaben für die Gesamtkontrollgruppe eine mittlere Konzentration von 2,381 ng/ng Protein (SD +/- 0,128) und für die Gesamtgruppe der SHR eine mittlere Konzentration von 2,135 ng/ ng Protein (SD +/- 0,1). Die nachgewiesenen Konzentrationen an GSK 3 β pSer der beiden Gesamtgruppen werden in Abbildung 21 in Prozent gezeigt. Die mittlere Konzentration der Gesamtgruppe der SHR war 10% niedriger als die der Gesamtkontrollgruppe und unterschied sich somit im Scheffé- Test nicht signifikant von Konzentration der Gesamtkontrollgruppe (p= 0,1292).

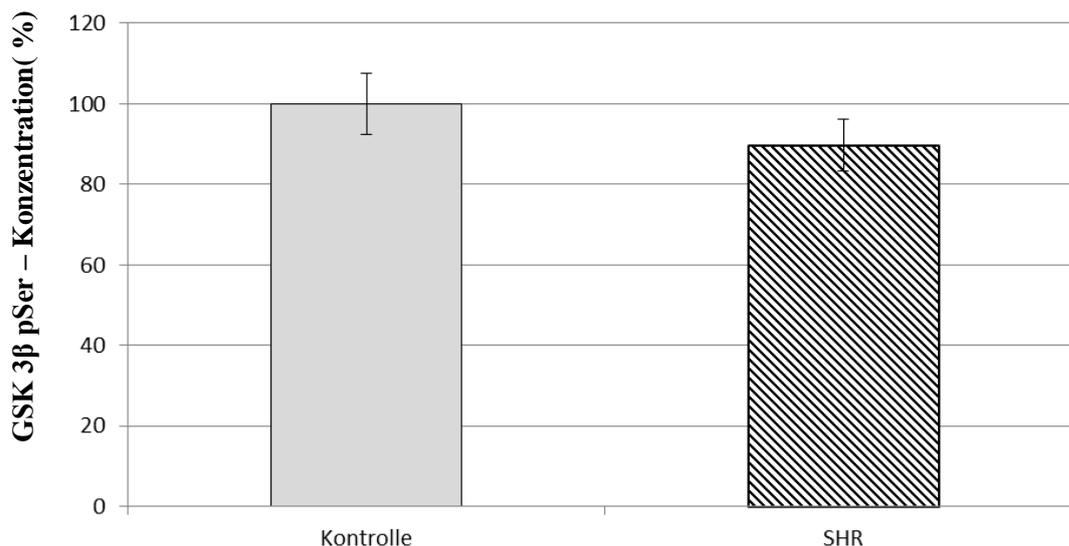


Abb. 21 Konzentration an phosphorylierter Glykogensynthase Kinase 3 β (GSK 3 β pSer) der Gesamtkontrollgruppe und Gesamtgruppe der Spontan Hypertensiver Ratten (SHR) in Prozent. Die Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt und die Probenwerte der SHR im Verhältnis darauf bezogen. ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, p= 0,1292, n(Kontrollratten)= 9, n (SHR) = 10

3.5.2 Konzentrationsunterschiede der phosphorylierte Glykogensynthase Kinase 3 β in den einzelnen Hirnregionen

Im Gruppenvergleich unterschieden sich die gemessenen Konzentrationen an GSK 3 β pSer in den einzelnen Hirnregionen nur geringfügig voneinander.

Mittels Scheffé- Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beim Gruppenvergleich in der jeweils gleichen Hirnregion (in allen Fällen p> 0,05, Abb. 22).

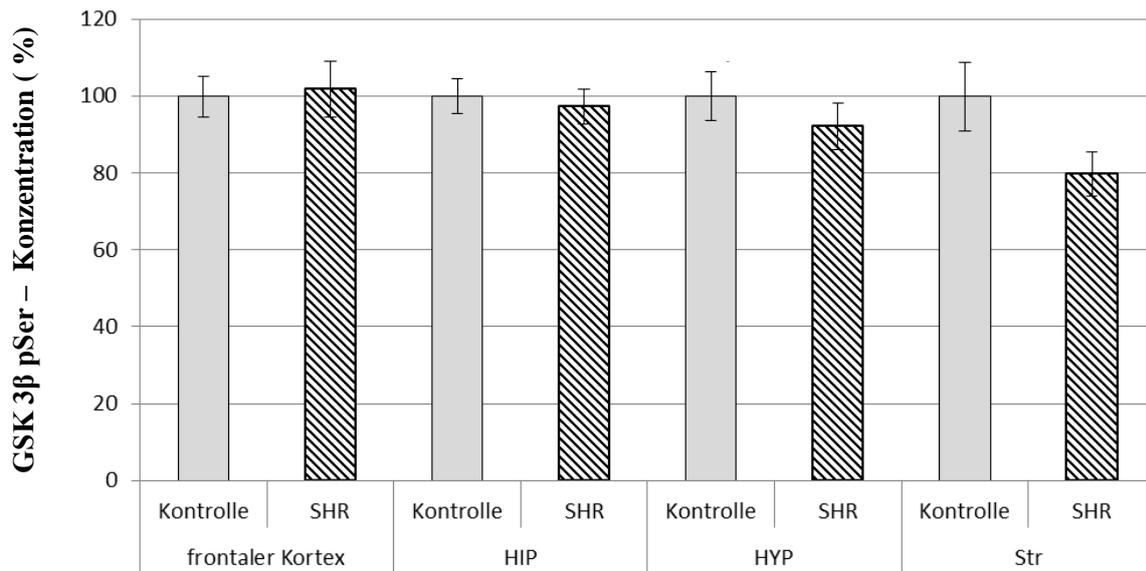
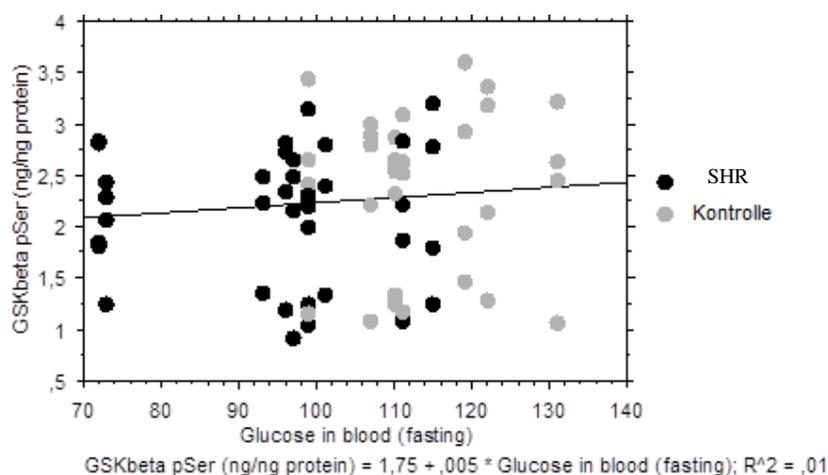


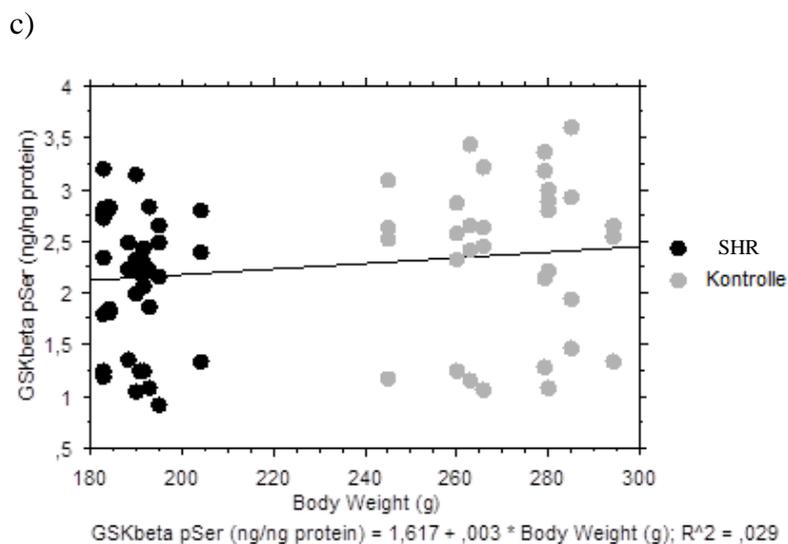
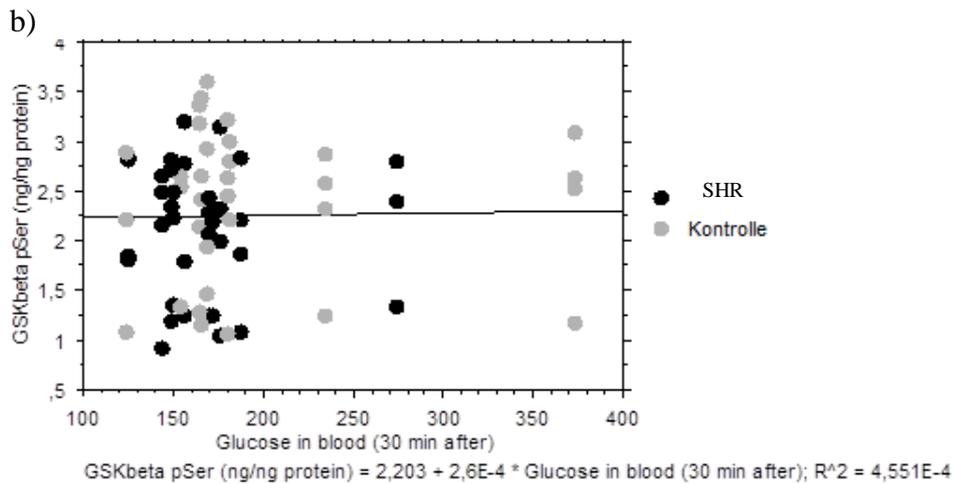
Abb. 22 Konzentration an phosphorylierter Glykogensynthase Kinase 3β (GSK 3β pSer) der Kontrollgruppe und Spontan Hypertensiven Ratten (SHR) in den einzelnen Hirnregionen in Prozent. Die Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt und die Probenwerte der SHR im Verhältnis darauf bezogen. ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, in allen Fällen $p > 0,05$, $n(\text{Kontrollratten}) = 9$, $n(\text{SHR}) = 10$
HIP= Hippokampus, **HYP**= Hypothalamus, **Str**= Striatum

3.5.3 Korrelationen der phosphorylierten Glykogensynthase Kinase 3β

Bei beiden Gruppen ergab sich in der einfachen Regressionsanalyse keine signifikante Korrelation zwischen der GSK 3β pSer –Konzentration, dem Blutzuckerspiegel und dem Körpergewicht der Versuchstiere (in allen Fällen $p > 0,05$, Abb. 23, a)- c)).

a)





- Abb. 23** a) GSK 3 β pSer- Konzentration in Abhängigkeit vom Nüchtern- Blutzuckerspiegel ($p > 0,05$; $r = 0,1$)
 b) GSK 3 β pSer- Konzentration in Abhängigkeit vom Blutzuckerspiegel (30 min nach Glukose- Toleranztest) ($p > 0,05$; $r = 0,0213$)
 c) GSK 3 β pSer- Konzentration in Abhängigkeit vom Körpergewicht ($p > 0,05$, $r = 0,17$)

GSK- 3 β pSer= phosphorylierte Glykogensynthase Kinase 3 β ; **SHR**= spontan hypertensive Ratten; **Kontrolle**= gesunde Kontrollratten

3.5.4 Verhältnis zwischen der phosphorylierten Glykogensynthase Kinase 3 β und der Glykogensynthase Kinase 3 β

Der Quotient ergab sich aus der mittleren Gesamtkonzentration der GSK 3 β pSer und der mittleren Gesamtkonzentration der GSK 3 β . Im Vergleich zur Kontrollgruppe war der Quotient der SHR um 63 % erhöht und unterschied sich somit im Scheffé- Test signifikant vom Quotienten der Kontrollgruppe (ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $p= 0,0238$, Abb. 24).

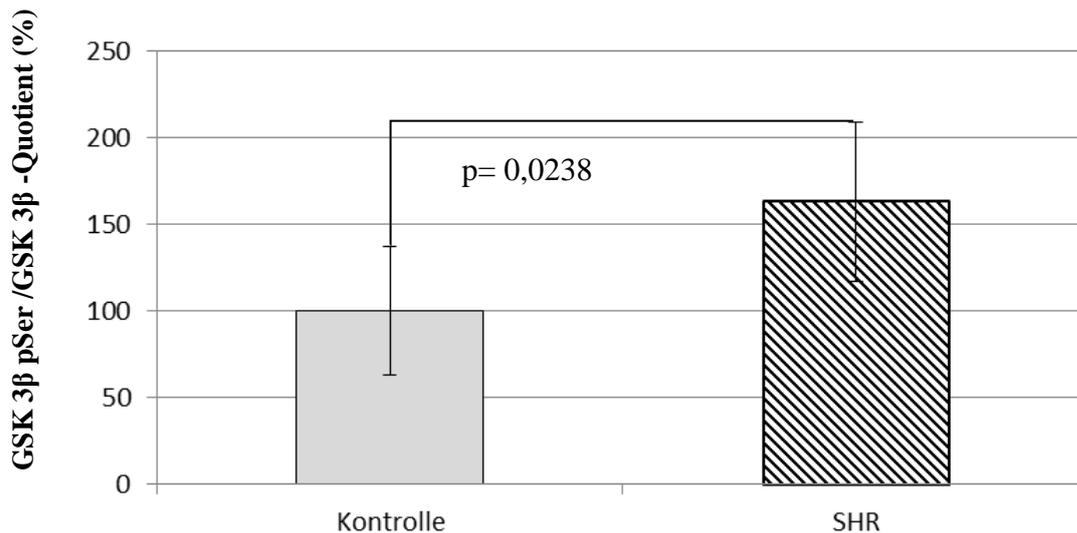


Abb. 24 Quotient aus phosphorylierter Glykogensynthase Kinase 3 β (GSK 3 β pSer) und Glykogensynthase Kinase 3 β (GSK 3 β) der SHR und Kontrollgruppe in Prozent. Die Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt und die Probenwerte der SHR im Verhältnis darauf bezogen. ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $p= 0,0238$, $n(\text{Kontrollratten})= 9$, $n(\text{SHR}) = 10$

In allen untersuchten Hirnregionen war der Quotient der SHR im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Im frontalen Kortex war der Quotient der SHR um rund 100 % erhöht, im Hippokampus betrug der Unterschied 35 %, im Hypothalamus zeigte sich ein ähnliches Ergebnis mit einem Unterschied von 30 %, während im Striatum der größte Unterschied messbar war. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen betrug hier 144 %. Dieser Unterschied erwies sich als signifikant (ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, $p= 0,0292$, Abb. 25).

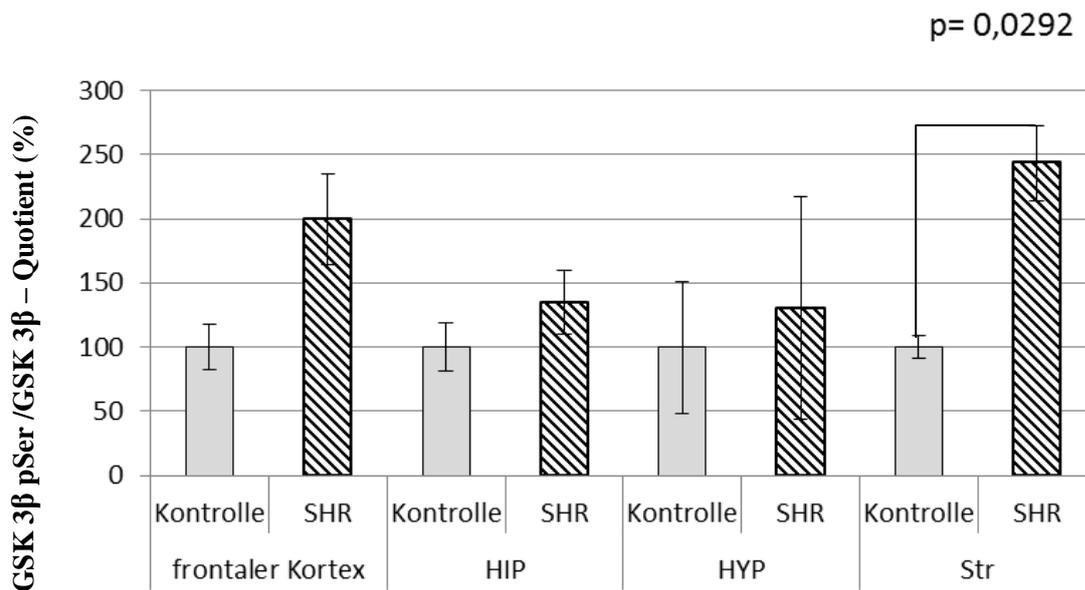


Abb. 25 Quotient aus phosphorylierter Glykogensynthase Kinase 3β (GSK 3β pSer) und Glykogensynthase Kinase 3β (GSK 3β) der Kontrollgruppe und der Spontan Hypertensiven Ratten (SHR) in den einzelnen Hirnregionen in Prozent. Die Kontrollwerte wurden gleich 100% gesetzt und die Probenwerte der SHR im Verhältnis darauf bezogen. ANOVA mit Post-Hoc Scheffé Test, p= 0,0292, n(Kontrollratten)= 9, n (SHR) = 10
HIP= Hippokampus, **HYP**= Hypothalamus, **Str**= Striatum

4. Diskussion

4.1 β-Untereinheit des Insulinrezeptors im Gruppenvergleich

Um den Zusammenhang zwischen Hypertonie und sAD zu untersuchen und festzustellen, ob Hypertonie sich auf den zerebralen Insulinmetabolismus auswirken und somit entscheidend für pathophysiologischen Prozesse einer sAD sein kann, wurden in dieser Studie die Insulinrezeptorkonzentration sowie weitere Bestandteile der zerebralen Insulinrezeptorsignalkaskade (u.a. GSK 3 β, Proteinkinase B) in verschiedenen Hirnregionen von Spontan Hypertensiven Ratten und Kontrollratten im Gruppenvergleich untersucht.

Die physiologische Funktion von Insulin und die Rolle des Insulinstoffwechsels im Gehirn wurde lange Zeit unterschätzt. Mittlerweile wurde bestätigt, dass Insulin für die Lern- und Gedächtnisfunktion, für den APP- Metabolismus und die balancierte Phosphorylierung des Tau Proteins von Bedeutung ist (de la Monte u. Tong et al., 2009, Hoyer et al., 2004, Gasparini et al., 2002; Dou et al., 2005). Diese Erkenntnisse führten schließlich zur Hypothese, dass ein gestörter zerebraler Insulinmetabolismus für die Pathogenese der sAD eine wichtige Rolle spielt (de la Monte et al., 2012).

Die durchgeführten Untersuchungen dieser Arbeit ergaben einen erheblichen Mangel an IR β in den Gesamtproben der SHR in Vergleich zu den Gesamtproben der Kontrollratten. Dabei war die mittlere IR β - Gesamtkonzentration der SHR rund 70% niedriger als die Gesamtkonzentration der Kontrollgruppe (p<0,0001; Abb. 7). Beim Vergleich der einzelnen Hirnregionen der SHR- Gruppe mit den entsprechenden Regionen der Kontrollgruppe waren mit Ausnahme des Hypothalamus in allen anderen Hirnregionen eine deutliche Erniedrigung der IR β - Konzentration nachweisbar (Abb. 8).

Signifikante regionale Konzentrationsunterschiede des phosphorylierten Insulinrezeptors konnten mit Ausnahme des Striatums im Gruppenvergleich anhand der vorliegenden Daten nicht nachgewiesen werden (Abb. 11). Die Gesamtkonzentration des aktivierten

Insulinrezeptors war in der SHR- Gruppe im Durchschnitt 12% niedriger als in der Kontrollgruppe (Abb. 10)

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Veränderungen des zerebralen Insulinhaushaltes in Form eines erheblichen Mangels an IR β decken sich mit den Angaben einer erst kürzlich eingereichten Studie von Grünblatt et al. (eingereicht), in welcher u.a. auch die Auswirkungen von Hypertonie auf den zerebralen Insulinmetabolismus und auf Gedächtnis und Lernprozesse von 3- und 7 Monate alten SHR im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollratten untersucht wurden. Dabei zeigte sich ebenfalls in allen Hirnregionen beider Altersgruppen der SHR, jedoch besonders im Hippokampus und Striatum, eine insgesamt deutlich reduzierte Konzentration an IR β . Dieser nachgewiesene Mangel an IR β könnte bereits einen fehlregulierten zerebralen Insulinhaushalt dieser Tiere widerspiegeln.

Zudem stimmen die in dieser Studie erhobenen Daten mit den in der Literatur gefundenen Angaben über den veränderten Insulinmetabolismus bei sAD überein.

Bei AD-Patienten fanden sich u.a. mehrere Indizien für das Vorliegen einer zerebralen Insulinresistenz und Hypoinsulinämie. In einer Studie von Bartl et al. (2012) konnte im postmortalem Hirngewebe von sAD Patienten eine signifikant erniedrigte Konzentration an IR β - positiven Zellen in allen untersuchten Hirnregionen im Vergleich zur altersparallelisierten Kontrollgruppe festgestellt werden.

Zahlreiche weitere Studien bestätigen und beschreiben den Nachweis einer gestörten zerebralen Insulinsignalweiterleitung bei sAD- Patienten in Form einer zerebralen Insulinresistenz und Hypoinsulinämie. In einer Versuchsreihe konnten Craft et al. (1998) zeigen, dass AD- Patienten im Vergleich zu gesunden Testpersonen einen niedrigeren Insulinspiegel im Liquor und einen erhöhten im Plasma aufwiesen (Craft et al., 1998; Frölich et al., 1998). In einer Studie wiesen Steen et al. (2005) eine Abnahme der hirneigenen Insulinsynthese bei AD- Patienten in Form einer signifikanten Verringerung der Insulin-Gen-Expression in wichtigen Hirnregionen nach.

Um Aussagen über die Aktivität des Insulinrezeptors treffen zu können, wurde der Quotient aus der mittleren Gesamtkonzentration des IR pTyr und der mittleren Gesamtkonzentration des IR β ermittelt. Bei Betrachtung des Verhältnisses aus IR pTyr / IR β fiel interessanterweise ein insgesamt signifikant erhöhter Quotienten der SHR verglichen mit der Kontrollgruppe auf, was für eine deutlich höhere Konzentration an phosphoryliertem IR in der Gruppe der SHR spricht und somit auf eine insgesamt erhöhte Aktivität des zerebralen IR der SHR hindeutet (Abb. 13). Das Gleiche gilt für den Gruppenvergleich in allen untersuchten Hirnregionen, in denen der Quotient der SHR in Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls signifikant erhöht war (Abb.14). Diese erhobenen Daten ähneln wiederum den Ergebnissen von Grünblatt et al. (eingereicht), die in ihrer Studie in allen Hirnregionen der SHR eine deutlich gesteigerte Aktivität des zerebralen IR der SHR in Form eines signifikant erhöhten Quotienten aus IR pTyr / IR β feststellen konnten. Die gesteigerte Aktivität des zerebralen IR der SHR könnte als anfängliche Reaktion und als Kompensationsmechanismus auf den erheblichen Mangel an IR β gedeutet werden (Grünblatt et al., eingereicht).

4.2 Proteinkinase B im Gruppenvergleich

Die PKB ist eine weitere wichtige Kinase der Insulinrezeptorsignalkaskade im ZNS, welche die GSK-3 β phosphoryliert und inaktiviert. Auf diese Weise kann eine unkontrollierte Hyperphosphorylierung des Tauproteins durch die GSK-3 β gehemmt werden (Hoyer et al., 2004).

In der Literatur findet man zum Teil widersprüchliche Angaben bezüglich der Aktivität der PKB bei sAD. Rickle et al. (2004) konnten eine signifikant erhöhte PKB- Aktivität im Hirngewebe von AD- Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Als mögliche Erklärung dafür wurde angegeben, dass eine erhöhte Aktivität der PKB dem Einfluss der aktivierten GSK 3 β entgegenwirkt und ausgleicht (Pei et al., 2003; Rickle et al., 2004), da

diese bei AD- Patienten ebenfalls in signifikant hoher Konzentration nachgewiesen wurde (Steen et al., 2005, Bhat et al., 2002, Rickle et al. 2004).

Im Gegensatz dazu fanden Steen et al. (2005) im Hirngewebe von AD- Patienten eine deutlich reduzierte PKB- Aktivität und erhöhte Konzentrationen an aktivierter GSK 3 β . Steen et al. (2005) schreiben, dass die Ergebnisse früherer Studien bezüglich der PKB- Aktivität bei sAD eher auf erhöhten oxidativen Stress zurückzuführen seien als auf einen gestörten zerebralen Insulinstoffwechsel. PKB könne bei AD unter anderem auch durch Stressfaktoren wie oxidativen Stress und oxidative Schäden aktiviert werden, um möglicherweise diesen Stressfaktoren entgegenzuwirken und neuroprotektiv zu wirken (Steen et al. 2005; Lin et al., 2004; Chin et al., 2004). In vielen anderen Studien wurden Ratten als experimentelles Modell für die sAD verwendet, die i.c.v. mit Streptozotocin behandelt wurden. In einer Studie von Salkovic-Petrisic et al. (2006) wurden Veränderungen bezüglich einiger Bestandteile der Insulinrezeptorsignalkaskade in Rattenhirnen, die i.c.v. mit Streptozotocin behandelt wurden, untersucht. Drei Monate nach Behandlung konnte eine tendenzielle Abnahme der PKB- und GSK 3 β pSer- Konzentration im Hirngewebe der behandelten Ratten beobachtet werden (Salkovic-Petrisic et al., 2006). Diese Studie unterstützt die Annahme, dass der veränderte Insulinhaushalt bei sAD möglicherweise zu einer verminderten Aktivität der PKB führen kann.

Die erhobenen Daten dieser Arbeit ergaben beim Vergleich beider Gesamtgruppen eine insgesamt um 25% verminderte PKB- Konzentration der SHR (Abb. 15). Dieser Unterschied verfehlte nur sehr knapp das Signifikanzniveau. Beim Gruppenvergleich in den einzelnen Hirnregionen fiel auf, dass es bezüglich der Konzentration der aktivierten PKB deutliche regionale Unterschiede gab. Im Hippokampus war ein eindeutig signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen beiden Gruppen auffallend (Abb. 16). Die PKB- Konzentration der SHR war in dieser Hirnregion um 61% niedriger als in der gleichen Hirnregion der Kontrollgruppe. Im Striatum der SHR war die Konzentration der phosphorylierten PKB im Vergleich zur Kontrollgruppe relativ unverändert, im frontalen Kortex dagegen leicht erhöht. Diese Auffälligkeiten ähneln den Ergebnissen von Salkovic-Petrisic et al. (2006), die ebenfalls im Hippokampus von Streptozotocin behandelten, drei Monate alten Ratten eine verminderte Konzentration der PKB, im frontalen Kortex eine leicht zunehmende Konzentration fanden.

Trotz der regionalen Konzentrationsunterschiede zeigte sich insgesamt eine deutlich reduzierte Gesamtkonzentration der aktivierten PKB im Hirngewebe der SHR (Abb. 15). Zudem korreliert dieses Ergebnis mit dem ebenfalls in dieser Arbeit nachgewiesenen gestörten Insulinhaushalt der SHR. Laut Steen et al. (2005) hätte ein gestörter Insulinmetabolismus bei sAD Konsequenzen auf die anderen Enzyme der Signalweiterleitungskaskade, im Fall der PKB wurde in anderen Versuchsreihen eine insgesamt reduzierte Aktivität nachgewiesen (Salkovic-Petrisic et al., 2006; Steen et al., 2005). Insofern stimmen die in dieser Arbeit nachgewiesenen Veränderungen der aktivierten PKB der SHR mit den in der Literatur gefundenen Angaben überein.

4.3 Glykogensynthase Kinase 3 β im Gruppenvergleich

Ein weiteres Enzym, welches an der intrazellulären Insulinsignalweiterleitungskaskade beteiligt ist und für die Pathogenese der AD eine wichtige Rolle spielt, ist die GSK, von der es zwei Isoformen gibt: GSK 3 α und GSK 3 β .

Zu den wichtigen neuropathologischen Kennzeichen der AD zählen Neurofibrillenbündel, die durch Hyperphosphorylierung von Tauproteinen entstehen. Mittlerweile hat sich herausgestellt, dass GSK-3 β zu den Kinasen gehört, welche die Stellen am Tauprotein phosphorylieren, die auch bei der AD abnormal hyperphosphoryliert sind (Bhat et al., 2002). Eine Studie von Phiel et al. (2003) konnte wiederum nachweisen, dass die Regulation des APP- Metabolismus und die Produktion von A β größtenteils durch die GSK-3 α erfolgt.

Verschiedene Autoren berichten, dass ein gestörter Ablauf der Signalwege des zerebralen Insulinrezeptors zu Veränderungen der Aktivität anderer Enzyme führt, die daran beteiligt sind, darunter auch GSK 3 β (Steen et al., 2005). Diese veränderten Signalwege könnten eine Enthemmung der GSK-3 α und GSK-3 β zur Folge haben, aus der eine unkontrollierte Phosphorylierung von Tauprotein durch GSK-3 β und ein gestörter APP- Metabolismus durch GSK-3 α resultieren könnte.

In der vorliegenden Arbeit ergab sich eine signifikante Erniedrigung der GSK 3 β -Gesamtkonzentration der SHR in Vergleich zur Kontrollgruppe. Die GSK 3 β - Konzentration der SHR war dabei insgesamt um die Hälfte niedriger als die der Gesamtkontrollgruppe (Abb. 18). Der Vergleich der einzelnen Hirnregionen der SHR- Gruppe mit den entsprechenden Regionen der Kontrollgruppe führte in allen vier Hirnregionen zu ähnlichen Ergebnissen, wobei der größte Konzentrationsunterschied im frontalen Kortex und Striatum messbar war (Abb. 19). Die GSK 3 β pSer- Gesamtkonzentrationen der SHR war im Gegensatz zur Gesamtkontrollgruppe insgesamt nur leicht erniedrigt (Abb. 21), beim Vergleich der vier verschiedenen Hirnregionen zeigten sich jedoch keine signifikanten und richtungsführenden regionalen Konzentrationsunterschiede (Abb. 22).

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten bezüglich der GSK 3 β - Konzentrationen korrelieren mit den Ergebnissen von Grünblatt et al. (eingereicht). In dieser Studie zeigten sich sowohl im frontalen Kortex, Hippocampus und Striatum signifikant erniedrigte GSK 3 β – Konzentrationen der 3 Monate alten SHR in Vergleich zur älteren SHR – Gruppe. Beim Gruppenvergleich der Kontrollratten konnte im Hippokampus eine signifikante Reduktion der GSK 3 β – Gesamtkonzentration der 3 Monate alten Kontrollratten in Vergleich zur älteren Gruppe nachgewiesen werden.

Allerdings finden sich bezüglich der Aktivität der GSK 3 β bei sAD in der Literatur auch unterschiedliche Angaben. Während Swatton et al. (2004) in ihrer Studie ebenfalls von einer signifikant erniedrigten GSK- Aktivität im Hirngewebe von AD Patienten berichten, konnten Hooper et al. (2008) in einer Studie dagegen eine deutlich erhöhte Konzentration und Aktivität der GSK 3 β bei AD Patienten nachweisen. Andere postmortale Analysen von AD Patienten ergaben sowohl eine erheblich höhere Konzentration an aktivierter GSK-3 β als auch erhöhte Konzentrationen an hyperphosphorylierten Tauproteinen (Bhat et al., 2002; Steen et al., 2005).

Die in dieser Studie nachgewiesene, verhältnismäßig erniedrigte Konzentration an aktivierter PKB und phosphorylierten GSK 3 β würde für eine erniedrigte Aktivität der PKB und erhöhte GSK 3 β Aktivität sprechen. Ein Befund, den auch Steen et al. (2005) in ihrer Studie bei AD-Patienten nachweisen konnten. Jedoch war die Gesamtkonzentration der aktivierten GSK 3 β der SHR im Vergleich zur Kontrollgruppe auffälliger Weise insgesamt und in allen Hirnregionen erheblich erniedrigt.

Im Rahmen dieser Studie wurde zudem der Quotient aus der mittleren Gesamtkonzentration der GSK 3 β pSer und der mittleren Gesamtkonzentration der GSK 3 β berechnet, um daraus indirekt Rückschlüsse über die Aktivität der GSK 3 β zu ziehen. Das Verhältnis aus GSK 3 β pSer/ GSK 3 β der SHR war im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl insgesamt als auch durchgehend in allen untersuchten Hirnregionen deutlich erhöht, was auf eine höhere Konzentration an inaktivierter GSK 3 β hinweist (Abb. 24, 25).

Grünblatt et al. (eingereicht) stellten in ihrer Studie einen signifikant erniedrigten Quotienten aus GSK 3 β pSer/ GSK 3 β bei 7 Monate alten SHR in Vergleich zu den jüngeren, 3 Monate alten SHR fest, was für eine deutlich erhöhte Aktivität der GSK 3 β spricht. Dieses Ergebnis könnte indirekt ein Hinweis darauf sein, dass erst mit zunehmenden Alter der SHR die Aktivität der GSK 3 β deutlich zunimmt (Grünblatt et al., eingereicht). Im Gegensatz dazu wiesen Salkovic-Petrisic et al. (2006) schon bei drei Monate alten, mit i.c.v. Streptozotocin behandelten Ratten ein erniedrigtes Verhältnis GSK 3 β pSer/ GSK 3 β nach; ein Ergebnis, dass bereits eine erhöhte Aktivität der GSK 3 β widerspiegelt.

Eine weitere Auffälligkeit ist, dass sich die Ergebnisse bezüglich der Konzentrationen der PKB und GSK 3 β - pSer in den einzelnen Hirnregionen nicht eindeutig miteinander korrelieren. Während es für die Konzentration der aktivierten PKB eindeutige regionale Auffälligkeiten gab, nämlich eine signifikante Erniedrigung im Hippokampus im Gegensatz zu den anderen Regionen, ergab sich für die GSK 3 β pSer-Konzentration stattdessen nur im Striatum eine auffällige Konzentrationsveränderungen in Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erhobenen Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Störungen im Insulin/ Insulinrezeptorsystem der SHR im Zusammenhang mit arterieller Hypertonie bestimmte Veränderungen für die Aktivität der GSK 3 β pSer und GSK 3 β hervorrufen, die mit den in der Literatur gefundenen Angaben übereinstimmen und darüber hinaus auch zum Teil in der Literatur bei AD- Patienten beschrieben werden. Es finden sich jedoch im Hirngewebe der SHR auch gewisse Auffälligkeiten, dazu zählt die erniedrigte Konzentration und Aktivität der aktivierten GSK 3 β im Gegensatz zur phosphorylierten Form, aber auch die zum Teil fehlende Korrelation zwischen der PKB und GSK 3 β pSer. Es wäre möglich, dass es sich bei den veränderten Abläufen in der Insulinrezeptorsignalkaskade der SHR um vorerst akute Reaktionen auf die metabolische Entgleisung im System handeln könnte. Es wäre aber auch denkbar, dass auch noch andere Faktoren bei der Regulation dieser ablaufenden Signalwege beteiligt sind. Andere Autoren erwähnen in diesem Zusammenhang auch zahlreiche andere Kinasen, die in der Lage sind GSK 3 β zu phosphorylieren (Chen et al. 1992; Millward et al.1999; Benneceib et al. 2000; Hoyer and Frölich 2005).

4.4 Korrelationen

Wie bereits geschildert wurde, ist bei vielen AD- Patienten eine zerebrale Insulinresistenz und Hypoinsulinämie nachgewiesen worden. Diese Veränderung im Gehirn von Patienten mit sporadischer AD entspricht dabei der peripheren Insulinresistenz, die beim Diabetes mellitus Typ II vorkommt (Hoyer et al. 2004). Inzwischen ist bekannt, dass Patienten mit Diabetes mellitus vom Typ II und der damit verbundenen Insulinresistenz ein deutlich höheres Risiko haben an AD zu erkranken als gesunde Vergleichspersonen (de la Monte et al., 2012; Gasparini et al., 2002). Ott et al. kamen in der Rotterdam- Studie zu dem Ergebnis, dass das Risiko einer Alzheimer-Demenz bei Diabetikern etwa doppelt so hoch war wie bei Nicht-Diabetikern (Ott et al., 1999). Bei einer weiteren Studie, die diese Annahme unterstützt, wurden 50 AD Patienten und eine Kontrollgruppe, bestehend aus 75 gesunden Probanden, untersucht. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe, wiesen AD Patienten ein deutlich größeres Verhältnis von Taillen- zu Hüftumfang, ein erhöhtes BMI, veränderte Blutfettwerte und erhöhte Blutzuckerwerte auf. Aufgrund dieser Ergebnisse vermutet man, dass zwischen dem metabolischen Syndrom und AD ein Zusammenhang besteht (Vilalta-Franch j. et al., 2008). Eine aktuelle Studie bestätigt ebenfalls, dass schwere Hypoglykämien das Risiko eines Diabetikers erhöhen, im Alter an einer Demenz zu erkranken (Whitmer et al., 2009).

Um diese Hypothese zu überprüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen metabolischem Syndrom (wie Insulinresistenz und Hypertonie) und AD gibt, wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl bei den SHR als auch bei den Kontrollratten der Nüchtern- Blutzuckerspiegel, der Blutzuckerspiegel 30 Minuten nach Glukosetoleranztest und das jeweilige Körpergewicht gemessen und die Abhängigkeit der Insulinrezeptorkonzentrationen und der anderen Bestandteile der Insulinrezeptorsignalkaskade von diesen drei Parametern überprüft (Abb. 9,12,17,20,23).

Ein statistischer Zusammenhang zwischen dem IR pTyr- Spiegel, dem Blutzuckerspiegel und dem Körpergewicht konnte nicht nachgewiesen werden, die Resultate für den GSK 3 β pSer- und PKB-Spiegel fielen ähnlich aus.

Lediglich für den IR β - und GSK-3 β - Spiegel ergaben sich einige Korrelationen. Zwischen der GSK-3 β - Konzentration und dem Körpergewicht zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang, ebenso wie für den IR β - Spiegel und dem Körpergewicht und Nüchtern-

Blutzuckerspiegel. Weitere richtungsweisende Korrelationen konnten für die anderen Bestandteile der Insulinrezeptorkaskade jedoch nicht erhoben werden.

Ein möglicher Grund wäre, dass die in dieser Arbeit nachgewiesenen veränderten Abläufe der Insulinrezeptorsignalkaskade der SHR eine frühe Phase widerspiegeln. Ein möglicher Einfluss bzw. eindeutige Korrelationen zwischen Körpergewicht und Blutzuckerspiegel könnten deshalb noch nicht eindeutig messbar sein.

Zwar konnten inzwischen zahlreiche post-mortem -und tierexperimentelle Studien gemeinsame Merkmale zwischen sAD, Diabetes vom Typ 2 und Übergewicht und den damit verbundenen veränderten Blutzucker- und Blutfettwerten aufzeigen (Winocur G, Greenwood et al., 2005, Moroz N, Tong M et al., 2008), eine direkte Verbindung beider Krankheiten konnte jedoch bis jetzt nicht bewiesen werden (de la Monte et al. 2012).

4.5 Schlussfolgerung: Hypertonie als Risikofaktor für Morbus Alzheimer?

In der vorliegenden Arbeit konnten in den Gesamtproben der SHR signifikante Störungen in der Signaltransduktion des Insulin/ Insulinrezeptorsystem nachgewiesen werden, die in der Literatur für sAD als typisch beschrieben werden. Zu diesen Störungen zählen vor allem der deutliche Mangel an IR β , das veränderte Verhältnis IR pTyr / IR β , ebenso wie die insgesamt erniedrigte Konzentration der aktivierten PKB sowie die Konzentrationsveränderungen der GSK 3 β pSer und GSK 3 β .

Betrachtet man die einzelnen Hirnregionen, fallen regionale Unterschiede auf. Die festgestellten Veränderungen im zerebralen Insulin/ Insulinrezeptorsystem waren in den einzelnen Hirnregionen unterschiedlich stark ausgeprägt und anhängig vom gemessenen Enzym oder Rezeptor jeweils andere Hirnregionen betroffen.

Bezüglich der GSK- 3 β und IR β waren in allen Hirnregionen Auffälligkeiten feststellbar, wobei in beiden Fällen im frontalen Kortex und im Striatum im Gruppenvergleich die größten Unterschiede zu verzeichnen waren. Dagegen konnten sowohl bei der GSK- 3 β pSer und als auch beim IR pTyr nur im Striatum deutliche Unterschiede im Gruppenvergleich gefunden werden. Bezüglich der PKB waren wiederum andere Hirnregionen betroffen, in diesem Fall konnten im Hippokampus und im frontalen Kortex Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass nur sehr wenige Aussagen über den Hypothalamus gemacht werden konnten, da aufgrund der sehr begrenzten Anzahl des zur Verfügung stehenden Gewebes und anhand dieser wenigen Daten nicht immer eine statistische Auswertung möglich war.

Auf der anderen Seite muss erwähnt werden, dass alleine anhand dieser nachgewiesenen Veränderungen im Insulin/ Insulinrezeptorsystem der SHR eine direkte Verbindung zwischen Hypertonie und sAD nicht bewiesen werden kann.

Aus diesem Grund wäre es sehr interessant und sinnvoll, ergänzend zu dieser Arbeit dieselbe Studie mit älteren SHR und mit zusätzlich histopathologische Untersuchung durchzuführen, um bestätigen zu können, dass ein veränderter Insulinstoffwechsel im Zusammenhang mit arterieller Hypertonie tatsächlich Degenerationsvorgänge der AD vorausgeht und möglicherweise ursächlich daran beteiligt ist.

Allerdings lässt sich die Tatsache nicht abstreiten, dass die in dieser vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigen, dass das metabolische Syndrom, wie arterielle Hypertonie, eine Anzahl von typischen Veränderungen im zerebralen Insulin/ Insulinrezeptorsystem hervorrufen kann, die in anderen Studien auch bei AD- Patienten gefunden wurden und pathogenetisch bedeutsam für die Entwicklung einer sAD sein können. Aus diesem Grund unterstützen die erhobenen Befunde dieser Arbeit die Hypothese, dass arterielle Hypertonie für sAD ein wichtiger Risikofaktor sein kann.

5. Zusammenfassung

Die Demenz vom Alzheimer Typ ist eine primär degenerative Erkrankung des Gehirns, die heutzutage die häufigste Ursache für eine Demenzerkrankung darstellt. Sie ist pathologisch gekennzeichnet durch typische histologische fassbare zerebrale Veränderungen, Neurofibrillenbündel und amyloide Plaques, und einer ausgeprägten, kortikal betonten Hirnatrophie gekennzeichnet. Zu den wichtigsten klinischen Leitsymptomen zählen Gedächtnis- und Wortfindungsstörungen sowie eine zeitliche und örtliche Orientierungsstörung. Es werden zwei Formen unterschieden: Die seltene familiär autosomal-dominant vererbte Form mit frühem Beginn (Beginn vor dem 65. Lebensjahr) und die häufigste, die sporadische Form (Beginn nach dem 65. Lebensjahr), deren Ursache bis heute nicht vollständig geklärt ist.

Zu den wichtigsten Risikofaktoren der sAD zählt neben einer positiven Familienanamnese vor allem das Alter. Mittlerweile konnten immer mehr Studien auch ein deutlich hohes Risiko für AD besonders für Patienten mit unbehandelter Hypertonie belegen. Inzwischen mehren sich seit längerer Zeit die Hinweise, dass ein wichtiger Zusammenhang zwischen der Entstehung von sAD und arterieller Hypertonie besteht.

Ausgehend von der Hypothese, dass ein gestörter zerebraler Insulinmetabolismus pathogenetisch bedeutsam für die Entwicklung einer sAD ist, werden in der Literatur zudem gehirnspezifische Veränderungen in der Insulin/ IR-Signalkaskade bei sAD beschrieben, die daraufhin deuten, dass es sich bei sAD um eine neuroendokrine Störung handelt.

Die vorliegende Studie beschäftigt sich nun mit der Frage, ob ein Zusammenhang zwischen metabolischen Syndrom (wie arterielle Hypertonie und Insulinresistenz) und sAD nachweisbar ist und ob Hypertonie gehirnspezifische Veränderungen in der in der Insulin/ IR-Signalkaskade hervorrufen und somit auf diesen Weg pathophysiologischen Prozesse einer sAD fördern kann.

Um diesen Zusammenhang zu überprüfen, wurden in dieser Studie erstmals Spontan Hypertensive Ratten (SHR) als experimentelles Modell ausgewählt. Dabei wurden Veränderungen bezüglich der Insulinrezeptorkonzentration sowie weiterer Bestandteile der Insulin/ IR-Signalkaskade in Gehirnen von drei Monate alten SHR und altersentsprechenden Kontrollratten mittels Enzym- Linked-Immuno-Sorbent Assays (ELISA) untersucht und miteinander verglichen.

In dieser Studie war sowohl insgesamt als auch in allen untersuchten Regionen mit Ausnahme des Hypothalamus eine Erniedrigung der IR β - Konzentration und damit ein deutlicher Mangel an IR β im Hirngewebe der SHR nachweisbar. Die Resultate des IR pTyr –fielen mit einer insgesamt tendenziellen Reduktion der IR pTyr – Konzentration der SHR ähnlich aus, wobei es innerhalb der Hirnregionen regionale Konzentrationsunterschiede gab. Bezüglich der aktivierten PKB ergab sich eine erniedrigte Gesamtkonzentration im Hirngewebe der SHR, allerdings war beim Gruppenvergleich in den einzelnen Hirnregionen nur im Hippokampus ein eindeutig signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen beiden Gruppen zu verzeichnen. Die GSK 3 β - Gesamtkonzentration der SHR zeigte sowohl insgesamt als auch in Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutliche Erniedrigung. Im Gegensatz hierzu war die GSK- 3 β pSer- Gesamtkonzentrationen der SHR insgesamt leicht erniedrigt, beim Vergleich der vier verschiedenen Hirnregionen zeigten sich jedoch keine signifikanten regionalen Konzentrationsunterschiede.

Ein eindeutiger statistischer Zusammenhang zwischen den Nüchtern- Blutzuckerspiegel, den Blutzuckerspiegel 30 Minuten nach Glukosetoleranztest und den jeweiligen Körpergewicht der SHR und den Bestandteilen der Insulinrezeptorsignalkaskade konnte in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den Gesamtproben der SHR signifikante Störungen in der Signaltransduktion des Insulin-/ Insulinrezeptorsystem nachgewiesen werden konnten, die in der Literatur für sAD als typisch beschrieben werden.

Dies untermauert wiederum die Hypothese, dass es sich bei der sAD um eine neuroendokrine Störung mit gehirnspezifischen Fehlfunktionen in der Insulinrezeptorsignalkaskade handelt. Des Weiteren lässt diese Arbeit den Schluss zu, dass es einen möglichen Zusammenhang zwischen metabolischem Syndrom (wie arterielle Hypertonie und Insulinresistenz) und sAD gibt und Hypertonie ein bedeutsamer Risikofaktor für die Entwicklung einer sAD sein kann. Eine direkte Verbindung zwischen beiden Erkrankungen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Weiterführende und ergänzende Untersuchungen mit zum Beispiel älteren SHR und zusätzlichen histopathologischen Untersuchungen werden jedoch notwendig sein, um diese Aussage zu bestätigen.

6. Literaturverzeichnis

Bartl J, Monoranu C-M, Wagner A-K, Kolter J, Riederer P, Grünblatt E: „ Alzheimer’s disease and type 2 diabetes: Two diseases, one common link?”. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 2012: 1-8

Bayer T A, Wirths O: Alzheimer- Demenz. *Molekulare Pathologie, Tiermodelle und Therapiestrategien*“. *Nervenarzt* 2008

Bhat R V, Budd S L: „ GSK 3 β Signalling: Casting a Wide Net in Alzheimer’s Disease. *Neurosignals* 11: 251-261 (2002)

Blennow K., de Leon M J, Zetterberg H: Alzheimer’s disease. *The Lancet* Vol. 368, Issue 9533: 387-403 (2006)

Chin P C, Liu L, Morrison B E, Siddiq A, Ratan R R, Bottiglieri T, D’Mello S R: “ The c-Raf inhibitor GW5074 provides neuroprotection in vitro and in an animal model of neurodegeneration through a MEK-ERK and Akt-independent mechanism”. *Journal of Neurochemistry*, Volume 90: S. 595–S. 608, (2004)

Craft S, Peskind E, Schwartz M W, Schellenberg G D, Raskind M, Porte D: Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer’s disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurology* 50: S.164–S.168, (1998)

De la Monte S M, Wands J R:” Review of insulin and insulin- like growth factor expression, signaling and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer’s disease. *J Alzheimer’s Disease* 7 (1): 45-61. 2005

De la Monte S M: ”Brain Insulin resistance and Deficiency as Therapeutic Targets in Alzheimer’s Disease.” *Current Alzheimer Research*: S. 35-66, (2012)

Devore EE, Grodstein F, van Rooij FJ, Hofman A, Stampfer MJ, Witteman JC, Breteler MM: „ Dietary antioxidants and long-term risk of dementia”. *Arch Neurol.*; Vol. 67(7): S. 819-25, (2010)

Dou J-T, Chen M, Dufour F, Alkon D L, Zhao W-Q: „ Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning”. *Learning Memory*, 12: S. 646–S. 655, (2005)

Gasparini L, Netzer W J, Greengard P, Xu H: „ Does insulin dysfunction play a role in Alzheimers’s disease”? *Trends in Pharmacological Sciences* Vol. 23, No.6: 288-292 (2002)

Gasparini L, Xu H: Potential roles of insulin and IGF- 1 in Alzheimer’s disease. *Trends in Neurosciences* Vol.26, No.8 (2003)

Gray SL, Anderson ML, Crane PK, Breitner JC, McCormick W, Bowen JD, Teri L, Larson E: “Antioxidant vitamin supplement use and risk of dementia or Alzheimer's disease in older adults”. *Journal of the American Geriatrics Society* Vol.56 (2): S. 291-5 (2008).

Grünblatt E, Bartl J, Iuhos D-I, Knezovic, Riederer P, Walitza S, Salkovic- Petrisic M: "Brain insulin receptor involvement in spontaneously hypertensive rats: its relation to cognition." Behaviour Brain Research Journal, (eingereicht)

Herholz K, Salmon E, Perani D, Baron J-C, Holthoff V, Frölich L, Schönknecht P, Ito K, Mielke R, Kalbe E, Zündorf G, Delbeuck X, Pelati O, Anchisi D, Fazio F, Kerrouche N, Desgranges B, Eustache F, Beuthien-Baumann B, Menzel C : „ Discrimination between Alzheimer dementia and controls by automated analysis of multicenter FDG PET ”. NeuroImage, Volume 17, Issue 1: S. 302-S. 316, (2002)

Hooper C, Killick R and Lovestone S: The GSK 3 hypothesis of Alzheimer's disease. Journal of Neurochemistry 104: 1433-1439 (2008)

Hoyer S: Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer's disease. European Journal of Pharmacology Vol. 490, Issues 1-3: 115-125 (2004)

Hoyer S, Riederer P: „ Pathomechanismen und hypothesengeleitete Therapieoptionen bei der Spätform der Alzheimerkrankheit“. Fortschr. Neurol. Psychiatr. 71: S. 16–S. 26, (2003)

Knecht S, Berger K: „Einfluss vaskulärer Faktoren auf die Entwicklung einer Demenz“. Deutsches Ärzteblatt 101, Heft 31-32: 2185- 2189 (2004)

Launer L J, Webster Ross G., Petrovitch H, Masaki K, Foley D, White LR, Havlik R J: „ Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu- Asia aging study“. Neurobiology of Aging, Volume 21, Issue 1: 49-55 (2000)

Lin HJ, Wang X, Shaffer K M, Sasaki C Y, Ma W: „ Characterization of H₂O₂-induced acute apoptosis in cultured neural stem/progenitor cells, FEBS Lett 570, 102–106, (2004)

Mayeux R, Stern Y: „ Epidemiology of Alzheimer Disease”. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine (2012)

Moroz N, Tong M, Longato L, Xu H, de la Monte SM :” Limited Alzheimer-type neurodegeneration in experimental obesity and Type 2 diabetes mellitus”. J Alzheimers Dis 15(1):29-44 (2008).

Ott A, Stolk R P, van Harskamp F, Pols H A P, A. Hofman, M M , Breteler B: „Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study”. Neurology 53: S. 1937–S. 1942 (1999)

Pei J-J, Khatoon S, An W-L, Nordlinder M, Tanaka T, Braak H, Tsujio I, Takeda M, Alafuzoff I und Winblad B: “ Role of protein kinase B in Alzheimer's neurofibrillary pathology”. Acta Neuropathologica, Volume 105: S. 381–S. 392, (2003)

Petrovitch H, Whitea L R, Izmiriliand G, Rossa G W, Havlikd R J, Markesberg W, Nelsonf J, Davisg D G, Hardmanc J, Foleyd D J: Midlife blood pressure and neuritic plaques, neurofibrillary tangles, and brain weight at death: the HAAS *1. Neurobiology of Aging, Volume 21, Issue 1, January-February 2000: S.57-S.62

Plassman BL, Havlik RJ, Steffens DC, Helms MJ, Newman TN, Drosdick D, Phillips C, Gau BA, Welsh-Bohmer KA, Burke JR, Guralnik JM, Breitner JC: “ Documented head injury in

early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias." *Neurology* 24; 55(8): S. 1158-66, (2000)

Rickle A, Bogdanovic N, Volkman I, Winblad B, Ravid R, Cowburn R F.: "Akt activity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders". *Neuroreport* 15: S. 955–S. 959, (2004)

Salkovic-Petrisic M, Tribl F, Schmidt M, Hoyer S, Riederer P: „Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. *Journal of Neurochemistry*, Volume 96: S.1005– S. 1015, (2006)

Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, Brickman AM, Cosentino S, Tang MX, Stern Y: "Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease". *The Journal of the American Medical Association* Vol. 302(6): S. 627-372, (2009).

Scheid R, Voigt H: Arterielle Hypertonie und Demenz. *Nervenarzt* 76: 143-153 (2004)

Schneider J A, Bennett D A: „Where vascular meets neurodegenerative disease". *Stroke* 41: S. 144–S. 146 , (2010)

Skoog I, Gustafson D: „Hypertension and Related Factors in the Etiology of Alzheimer's Disease". *New York Academy of Sciences* 977: 29-36 (2002)

Solfrizzi V, Scafato E, Capurso C, D'Introno A, Colacicco AM, Frisardi V, Vendemiale G, Baldereschi M, Crepaldi G, Di Carlo A, Galluzzo L, Gandin C, Inzitari D, Maggi S, Capurso A, Panza F, Italian Longitudinal Study on Ageing Working Group: "Metabolic syndrome and the risk of vascular dementia: the Italian Longitudinal Study on Ageing." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* Vol.81 (4): S. 433-40, (2010)

Steen E, Terry B M, Rivera E J, Cannon J L, Neely T R, Tavares R, Xu X J, Wands J R, de la Monte S M: Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease – is this type 3 diabetes? *Journal of Alzheimer's Disease*, Volume 7, Number 1/2005: S. 63–S. 80, (2005)

Sundelöf J, Kilander L, Helmersson J, Larsson A, Rönnekaa E, Degerman-Gunnarsson M, Basun H, Lannfelt L, Basu S:" Systemic inflammation and the risk of Alzheimer's disease and dementia: a prospective population-based study". *J Alzheimers Dis*. Vol. 18(1): S. 79-87, (2009)

Swatton J E, Sellers L A, Faull R L M, Holland A, Iritani S, Bahn S: "Increased MAP kinase activity in Alzheimer's and Down syndrome but not in schizophrenia human brain". *European Journal of Neuroscience*, Volume 19, Issue 10: S. 2711–S. 2719, (2004)

Tan ZS, Beiser AS, Vasan RS, Roubenoff R, Dinarello CA, Harris TB, Benjamin EJ, Au R, Kiel DP, Wolf PA, Seshadri S:" Inflammatory markers and the risk of Alzheimer disease: the Framingham Study." *Neurology* Vol. 68 (22): S. 1902-8, (2007)

Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol*. 2003;70:1-32.

Vilalta-Franch J, López-Pousa S, Garre-Olmo J, Turon-Estrada A, Pericot-Nierga I: “Metabolic syndrome in Alzheimer's disease: clinical and developmental influences”. *Revista Neurologia*, Volume 46: S. 13-S. 17, (2008)

Waeber B, Feihl F: “ Arterielle Hypertonie und Demenz”. *Schweiz Med Forum* 10: 43-44 (2010)

Wallesch C- W, Hans Förstl: „Demenzen“. Georg Thieme Verlag (2005)

Whitmer R A, Karter A J, Yaffe K, Quesenberry C P, Selby J V: „ Hypoglycemic episodes and risk of dementia in older patients with type 2 diabetes mellitus”. *The Journal of the American Medical Association*, Volume 301, No. 15: S. 1565–S. 1572, (2009)

Xu WL, Atti AR, Gatz M, Pedersen NL, Johansson B, Fratiglioni L:” Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk: a population-based twin study”. *Neurology*, 76(18): S. 1568–1574, (2011)

Yang YH, Roe CM, Morris JC: “ Relationship between late-life hypertension, blood pressure, and Alzheimer's disease”. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. Vol. 26(6): S. 457-62 (2011)

Zhu X, Lee H G, Raina A K, Perry G, Smith M A: “The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease”. *Neurosignals* 11: S. 270–S. 281, (2002)

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Deckert danke ich für die Möglichkeit, an seiner Klinik dissertieren zu können.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Riederer bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Mein Dank gilt besonders Frau PD Dr. med. Grünblatt für die Überlassung des Promotionsthemas, für die hervorragende Betreuung und Hilfsbereitschaft und auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens.

Herrn Prof. Dr. med. Reif, Herrn PD Dr. Herrmann und Prof. Dr. med. Lesch danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Außerdem möchte ich mich nochmals ganz herzlich bei Frau Dr. Jasmin Bartl und bei Frau Miryame Hofmann für die ausgezeichnete Einarbeitung im Labor, die Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen und für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten bedanken. Ihre Anleitung und nette Betreuung waren mir bei der Durchführung dieser Arbeit immer eine große Hilfe.

Herzlichen Dank auch an alle anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Riederer für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre hilfreiche Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung danken.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Diana-Iulia Iuhos
geb. am 03.07. 1985 in Gheorghe- Gheorghiu- Dej,
Rumänien

Schulbildung

09/1992- 07/1996
09/1996- 06/2005
29.06.2005

Österfeldgrundschule, Stuttgart- Vaihingen
Königin- Charlotte- Gymnasium, Stuttgart- Möhringen
Abitur

Hochschulstudium

10/2005- 06/2012

Studium der Humanmedizin, Julius- Maximilians-
Universität Würzburg

08/2007

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2008- 2009

Famulaturen:

Plastische Chirurgie und Handchirurgie,
Innere Medizin,
Gefäßchirurgie

08/2010- 07/2011

Praktisches Jahr:

Klinik für Chirurgie- Missionsärztliche Klinik Würzburg
Zentrum für Innere Medizin- Universitätsklinikum
Würzburg

Institut für Röntgendiagnostik - Universitätsklinikum
Würzburg (Wahlfach)

06/2012

Approbation als Ärztin

10/12- 06/13

Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik und
Poliklinik, Universitätsklinikum Würzburg

seit 07/13

Assistenzärztin in der Klinik für Diagnostische und
Interventionelle Radiologie am Universitätsklinikum
Ulm