

**Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. J. Deckert**

**Genexpression bei der Alzheimer Demenz und dem Morbus Parkinson**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Nicole Cremer  
aus Erfurt  
Würzburg, März 2012**

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

**Korreferent:** Herr Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch

**Dekan:** Herr Prof. Dr. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 26.02.2013

**Die Promovendin ist Ärztin**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Neurodegenerative Erkrankungen.....	1
1.2	Epidemiologie von Demenzen, der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson.....	5
1.3	Einteilung der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson.....	7
1.4	Klinik der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson.....	8
1.4.1	Klinik der Alzheimer Demenz.....	8
1.4.2	Klinik des Morbus Parkinson.....	10
1.4.3	Schnittpunkte der klinischen Symptomatik der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson.....	11
1.5	Neuropathologie.....	13
1.5.1	Grundlagen der Neuropathologie neurodegenerativer Erkrankungen.....	13
1.5.2	Histopathologische Stadieneinteilung der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson.....	19
1.6	Pathogenese der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson.....	23
1.7	Schnittpunkte der Pathogenese der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson.....	25
1.7.1	Das Alter.....	25
1.7.2	Oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion.....	26
1.7.3	Das Ubiquitin-Proteasom-System.....	29
1.7.4	Inflammation.....	30
1.8	Risikofaktoren neurodegenerativer Erkrankungen.....	32
1.8.1	Risikofaktoren der Alzheimer Demenz.....	32
1.8.2	Risikofaktoren des Morbus Parkinson.....	34
1.9	Genetik der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson.....	35
1.9.1	Genetische Faktoren der Alzheimer Demenz.....	35
1.9.2	Genetische Faktoren des Morbus Parkinson.....	36
1.10	Aufgaben- und Zielstellung.....	38
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>42</b>
2.1	Materialien.....	42
2.1.1	Geräte und Laborbedarf.....	42

2.1.2	Chemikalien .....	42
2.1.3	Kits.....	43
2.1.4	Programme.....	43
2.1.5	Probenmaterial .....	43
2.1.6	Primer.....	46
2.2	Methoden.....	49
2.2.1	Extraktion von RNA aus Hirngewebe .....	49
2.2.2	Bestimmung der RNA-Konzentration und RNA-Qualität.....	49
2.2.3	Reverse Transkription von RNA in cDNA.....	50
2.2.4	Polymerasekettenreaktion.....	51
2.2.5	Real-Time Polymerasekettenreaktion.....	52
2.2.6	DNA-Isolierung zur Standardherstellung .....	53
2.2.7	Reaktionsansätze der Real-Time Polymerasekettenreaktion.....	55
2.2.8	Quantifizierung des Real-Time PCR-Produktes.....	59
2.2.9	Statistische Auswertung.....	61
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>62</b>
3.1	Genexpression von BACE1 (Beta-site amyloid precursor protein cleaving Enzyme 1).....	63
3.2	Genexpression des Glutamattransporters SLC1A3 (solute carrier family 1, glial high affinity glutamate transporter, member 3).....	64
3.3	Genexpression des Glutamatrezeptors GRINL1A (glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-like 1A) .....	68
3.4	Genexpression von vacuolar protein sorting Protein 35 und 41 .....	71
3.5	Genexpression des olfaktorischen Rezeptors OR10H3 (Olfactory Receptor, Family 10, Subfamily H, Member 3) .....	77
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>80</b>
4.1	Genexpression von BACE1 (Beta-site amyloid precursor protein cleaving Enzyme 1).....	81
4.2	Genexpression des Glutamattransporters SLC1A3 (solute carrier family 1, glial high affinity glutamate transporter, member 3).....	86
4.3	Genexpression des Glutamatrezeptors GRINL1A (glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-like 1A) .....	92

4.4	Genexpression der vacuolar protein sorting Proteine VPS35 und VPS41 .....	95
4.5	Genexpression des olfaktorischen Rezeptors OR10H3 (Olfactory Receptor, Family 10, Subfamily H, Member 3) .....	99
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Schlussfolgerung .....</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>146</b>
7.1	Übersicht - Expressionsdaten signifikanter Gene .....	146
7.2	Danksagung .....	151
7.3	Lebenslauf .....	153

# Abbildungsverzeichnis

## I Abbildungen

Abbildung 1.2-1: Geschätzte Entwicklung der Prävalenz von Demenzerkrankungen in Deutschland .....	5
Abbildung 1.2-2: Epidemiologie der Demenzen.....	6
Abbildung 1.4-1: Verlauf und Symptomatik der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson .....	12
Abbildung 1.5-1: Lokalisation der wichtigsten neurodegenerativen Erkrankungen mit den charakteristischen histologischen Veränderungen.....	14
Abbildung 1.5-2: A $\beta$ -Plaques im temporalen Kortex.....	15
Abbildung 1.5-3: Neurofibrillenpathologie.....	16
Abbildung 1.5-4: Hirnatrophie bei der Alzheimer Demenz.....	17
Abbildung 1.5-5: Depigmentierung der Substantia nigra beim Morbus Parkinson.....	18
Abbildung 1.5-6: Lewy Körperchen in einem pigmentierten Neuron der Substantia nigra.....	19
Abbildung 1.5-7: Histopathologische Stadien der Alzheimer Demenz.....	20
Abbildung 1.5-8: Stadieneinteilung des Morbus Parkinson.....	22
Abbildung 1.6-1: Übersicht zur Pathogenese der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson.....	25
Abbildung 1.7-1: Neuronale Mechanismen und Interaktionen unter oxidativem Stress bei der Alzheimer Demenz und dem Morbus Parkinson.....	29
Abbildung 2.2-1: DNA-Amplifikation während einer Real-Time PCR.....	53
Abbildung 2.2-2: Standardkurve einer Real-Time PCR.....	54
Abbildung 3.1-1: Expression des BACE1-Gens im Hippocampus bei der AD im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	63
Abbildung 3.1-2: Expression des BACE1-Gens im Hippocampus bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	64
Abbildung 3.2-1: Expression des SLC1A3-Gens im Kleinhirn bei der AD im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	65
Abbildung 3.2-2: Expression des SLC1A3-Gens im Kleinhirn bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	66

Abbildung 3.2-3: Expression des SLC1A3-Gens im Hippocampus bei der AD im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	67
Abbildung 3.2-4: Expression des SLC1A3-Gens in allen untersuchten Hirnregionen bei der AD, dem MP und der Kontrollgruppe.....	68
Abbildung 3.3-1: Expression des GRINL1A-Gens im Kleinhirn bei der AD im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	69
Abbildung 3.3-2: Expression des GRINL1A-Gens im Kleinhirn bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	69
Abbildung 3.3-3: Expression des GRINL1A-Gens im Gtm bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	70
Abbildung 3.3-4: Expression des GRINL1A-Gens in allen untersuchten Hirnregionen bei der AD, dem MP und der Kontrollgruppe.....	71
Abbildung 3.4-1: Expression des VPS35-Gens und des VPS41-Gens im Kleinhirn bei der AD im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	72
Abbildung 3.4-2: Expression des VPS35-Gens und des VPS41-Gens im Kleinhirn bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	73
Abbildung 3.4-3: Expression des VPS35-Gens und des VPS41-Gens im Hippocampus bei der AD im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	74
Abbildung 3.4-4: Expression des VPS41-Gens im Hippocampus bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	74
Abbildung 3.4-5: Expression des VPS41-Gens im Gtm bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	75
Abbildung 3.4-6: Expression des VPS35-Gens im Gtm bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	76
Abbildung 3.4-7: Expression des VPS35-Gens in allen untersuchten Hirnregionen bei der AD, dem MP und der Kontrollgruppe.....	76
Abbildung 3.4-8: Expression des VPS41-Gens in allen untersuchten Hirnregionen bei der AD, dem MP und der Kontrollgruppe.....	77
Abbildung 3.5-1: Expression des OR10H3-Gens im Hippocampus bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	78
Abbildung 3.5-2: Expression des OR10H3-Gens im Hippocampus bei der AD im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	78

Abbildung 3.5-3: Expression des OR10H3-Gens in allen untersuchten Hirnregionen bei der AD, dem MP und der Kontrollgruppe.....	79
Abbildung 4.1-1: Die APP-Prozessierung.....	82

## II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1-1: Klassifikation neurodegenerativer Erkrankungen nach molekularbiologischen Merkmalen.....	3
Tabelle 1.4-1: FAST-Skala - Klinische Stadieneinteilung der Alzheimer Demenz.....	10
Tabelle 1.4-2: Stadieneinteilung des Morbus Parkinson nach Hoehn und Yahr.....	11
Tabelle 2.1-1: Falldaten.....	44
Tabelle 2.1-2: Primer der Firma Invitrogen.....	46
Tabelle 2.1-3: Primer der Firma QIAGEN.....	48
Tabelle 2.1-4: Primer der Firma QIAGEN für die Haushaltsgene.....	49
Tabelle 2.2-1: Reaktionsansatz für die reverse Transkription mittels „iScript cDNA Synthesis Kit“.....	51
Tabelle 2.2-2: Reaktionsansätze der Real-Time PCR für Primer-Assays.....	55
Tabelle 2.2-3: Reaktionsansätze der Real-Time PCR für selbst hergestellte Primer.....	56
Tabelle 2.2-4: Real-Time PCR Amplifikationsparameter der verwendeten Primer.....	56
Tabelle 7.1-1: Expressionsdaten signifikanter Gene im Kleinhirn.....	146
Tabelle 7.1-2: Expressionsdaten signifikanter Gene im Gyrus frontalis medialis.....	148
Tabelle 7.1-3: Expressionsdaten signifikanter Gene im Gyrus temporalis medialis....	149
Tabelle 7.1-4: Expressionsdaten signifikanter Gene im Hippocampus.....	150



## Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	=	Amyloid- $\beta$ -Peptid
AD	=	Alzheimer Demenz
ADL	=	Aktivitäten des täglichen Lebens ( <i>activity of daily living</i> )
AICD	=	APP intrazelluläre Domäne
ALS	=	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPAR	=	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptoren
ANOVA	=	Varianzanalyse ( <i>analysis of variance</i> )
AON	=	Nucleus olfactorius anterior ( <i>anterior olfactory nucleus</i> )
APH-1	=	Anterior pharynx defective 1
APLP	=	Amyloid precursor like protein
ApoE	=	Apolipoprotein E
APP	=	Amyloid $\beta$ (A4) precursor Protein
AS	=	Aminosäuren
ASCT	=	Glutamate/neutral amino acid transporter
Asp	=	Aspartat
ATP	=	Adenosintriphosphat
AV	=	Autophagozytärer Vesikel
BACE	=	Beta site APP cleaving enzyme
BCRS	=	Brief Cognitive Rating Scale
BO	=	Bulbus olfactorius
bp	=	Basenpaare
CBD	=	Cortikobasale Degeneration
cDNA	=	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHAK	=	Channel Kinase
CJK	=	Creuzfeldt-Jakob-Krankheit
CMA	=	Chaperone mediated autophagy
COMT	=	Catecholamin-O-Methyl-Transferase
Ct	=	Schwellenwert-Zyklus ( <i>threshold cycle</i> )
CTF	=	Carboxy-(C)-terminales Fragment
DA	=	Dopamin
DAT	=	Dopamin-Transporter
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
EAAT	=	Excitatory amino acid transporter
ELS	=	Endosomen-Lysosomen-System
Engl.	=	Englisch
EOAD	=	Early onset Alzheimer disease
ER	=	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	=	Familiäre Alzheimer Demenz

FAST	=	Functional Assessment Staging
FTDP	=	Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus
GABA	=	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GDS	=	Global Deterioration Scale
Gfm	=	Gyrus frontalis medialis
Glu	=	Glutamat
GR	=	Glutamatrezeptoren
GRINL1A	=	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-like 1A
GSH	=	Reduziertes Glutathion
GT	=	Glutamattransporter
Gtm	=	Gyrus temporalis medialis
GVI	=	Gen von Interesse
HD	=	Chorea Huntington
H&Y	=	Hoehn & Yahr
ICD	=	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
IL	=	Interleukin
kDa	=	Kilo Dalton
KG	=	Kontrollgruppe
LB	=	Lewy Körperchen ( <i>Lewy body</i> )
LBD	=	Lewy-Körperchen Demenz
LN	=	Lewy Neurit
LOAD	=	Late onset Alzheimer disease
LRRK2	=	Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2
LTP	=	Langzeitpotenzierung
M	=	Morbus
MAO	=	Monoaminoxidase
MAP	=	Mikrotubuli assoziierte Proteine
MCI	=	Leichte cognitive Beeinträchtigung
mGluR	=	metabotroper Glutamat-Rezeptor
MHC	=	Major histocompatibility complex
MP	=	Morbus Parkinson
MPD	=	Morbus Parkinson mit Demenz
MPP <sup>+</sup>	=	1-Methyl-4-Phenylpyridin
MPTP	=	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
mRNA	=	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger RNA</i> )
MRT	=	Magnetresonanztomographie
MSA	=	Multisystematrophie
MT	=	Mikrotubuli
ND	=	Nicht-Dement
NF	=	Normalisierungsfaktor

NFT	=	Neurofibrillenbündel
NMDAR	=	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren
nNOS	=	neuronale NO-Synthase
NP	=	Neuritische Plaque
NT	=	Neuropilfäden
NTF	=	Amino-(N)-terminales Fragment
OEP	=	Olfaktorisch evozierte Potenziale
OR	=	Olfaktorischer Rezeptor
OR10H3	=	Olfactory Receptor, Family 10, Subfamily H, Member3
OS	=	Oxidativer Stress
PARK	=	Parkinson disease autosomal recessive
PCR	=	Polymerasekettenreaktion
PEN-2	=	Presenilin enhancer 2
PG	=	Patientengruppe
PHF	=	Paarige helikale Filamente
PINK1	=	(PTEN)-induced putative kinase-1
PM	=	Polymerase
PMI	=	Post mortem Intervall
PrP	=	Prion Protein
PS	=	Präsenilin
PSB	=	Progressive supranukleäre Blickparese
REM	=	Rapid eye movement
ROS	=	Reaktive oxidative Spezies
RNS	=	Reaktive Stickstoffspezies
RNA	=	Ribonukleinsäure
RT-PCR	=	Real-time Polymerasekettenreaktion
SCA	=	Spinozerebelläre Ataxie
SD	=	Standardabweichung
Sec	=	Sekunden
SLC	=	Solute carrier family
SN	=	Substantia nigra
SNpc	=	Substantia nigra, pars compacta
SNX	=	Sorting Nexin
SOD	=	Superoxid-Dismutase
TAE	=	Tris-Acetate-EDTA
TGN	=	Trans-Golgi-Netzwerk
TMP	=	Transmembranprotein
Uchl1	=	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1
UPS	=	Ubiquitin-Proteasom-System
UPSIT	=	University of Pennsylvania Smell Identification Test
VMAT2	=	Vesicular monoamine transporter 2
VPS	=	Vacuolar protein sorting

WHO = Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*)  
ZNS = Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen sind eine Gruppe sporadischer oder seltener erblicher Krankheiten vorwiegend des zentralen Nervensystems (ZNS), deren pathologisches Korrelat ein über Jahre fortschreitender Untergang verschiedener neuronaler Systeme, z. B. der Großhirnrinde, der Basalganglien, des Kleinhirns, ist. Sie treten meist im höheren Alter - zwischen dem 50. und 75. Lebensjahr - auf (Jellinger KA 2005, Weih et al. 2009), verlaufen langsam progredient und führen häufig über Sekundärkomplikationen zum Tod. Klinisch gehen sie mit einer Vielzahl neurologischer Symptome einher, häufig sind Bewegungsstörungen und eine dementielle Entwicklung (Jellinger KA 2005).

Die Ätiologie und die molekularbiologischen Mechanismen, die zur Degeneration der neuronalen Zellen führen, sind bisher nicht vollständig bekannt. Ein charakteristisches, gemeinsames Merkmal neurodegenerativer Erkrankungen ist jedoch die Fehlfaltung bestimmter neuronaler Peptide oder Proteine, die mit der pathologischen Aggregation und Akkumulation dieser Proteine im Gewebe einhergeht (Tsigelny et al. 2008). Außerdem treten im Nervensystem der Betroffenen gehäuft inflammatorische Prozesse, Störungen der Transmitterhomöostase, der Synapsen- und Rezeptorfunktion sowie des zellulären Stoffwechsels, z. T. ebenfalls unbekannter Genese, auf (Drzezga 2008).

Die Klassifikation der neurodegenerativen Erkrankungen kann nach verschiedenen diagnostischen Kriterien erfolgen.

Die klassische klinisch-pathologische Einteilung basiert auf den im ZNS betroffenen Systemen mit den entsprechenden klinischen Symptomen und grenzt die Demenzen von den Systematrophien und den Prion-Erkrankungen ab. Einige Krankheiten weisen jedoch sehr ähnliche klinische Phänotypen oder pathophysiologische Überschneidungen auf, die eine exakte Differenzierung und eindeutige Diagnosestellung nach diesem System erschweren.

Die Bestimmung der pathologischen Proteinaggregate anhand molekularbiologischer und biochemischer Kriterien ermöglicht eine exaktere Klassifikation. Danach werden die auch als Proteinopathien bezeichneten neurodegenerativen Erkrankungen u. a. in die Synukleinopathien, die Tauopathien, und in weitere Gruppen eingeteilt.

Tabelle 1.1-1 gibt eine Übersicht der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen anhand ihrer molekularbiologischen Merkmale.

Zusätzlich werden nach genetischen Aspekten die erblichen, durch bekannte Genmutationen hervorgerufenen Formen von den sporadischen Formen, deren Ursache zumeist unbekannt ist, unterschieden (Jellinger KA 2005).

Der Morbus Parkinson (MP) als extrapyramidal-motorische Erkrankung ist nach dem Morbus Alzheimer bzw. der Alzheimer Demenz (AD) die häufigste neurodegenerative Erkrankung. Die AD stellt die häufigste Ursache einer degenerativen Demenz in der westlichen Welt dar (Goedert 1999, Jellinger KA 2005).

Nach der von der WHO (Weltgesundheitsorganisation) erstellten ICD-10 Klassifikation (ICD-10-GM 2009, ICD-10 Code F00-F03) bezeichnet Demenz ein Syndrom als Folge einer meist chronischen oder fortschreitenden Krankheit des Gehirns mit Störung höherer kortikaler Funktionen, einschließlich Gedächtnis, Denken, Orientierung, Auffassung, Rechnen, Lernfähigkeit, Sprache und Urteilsvermögen bei erhaltenem Bewusstsein. Die kognitiven Beeinträchtigungen werden von Veränderungen der emotionalen Kontrolle, der Motivation und des Sozialverhaltens begleitet, gelegentlich treten diese eher auf. Voraussetzung dieser Definition ist ein Verlauf der Erkrankung über mindestens sechs Monate.

**Tabelle 1.1-1: Klassifikation neurodegenerativer Erkrankungen nach molekularbiologischen Merkmalen**  
(Jellinger KA 2005)

Erkrankung	Gen	Chromosom	Morphologie	Klinik
<b>Tauopathien mit und ohne Amyloidablagerung</b>				
<b>Alzheimer Demenz (AD)</b> - sporadisch - familiär	ApoE ε4 APP, PS1, PS2	19 21 14 1	Amyloid β- Ablagerungen (Plaques, Angiopathie), Hirnatrophie, Tau-Pathologie (Fibrillendegeneration), Synapsen- und Neuronenverlust	Merkfähigkeitsstörung, Ausfall höherer Hirnleistungen, progrediente Demenz
<b>Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus (FTDP)</b>	Tau	17q Mutationen (Exon 10)	Frontotemporale Hirnatrophie, Nigradegeneration, Tau-Pathologie in Neuronen und Astroglia	Demenz, Aphasie, Parkinson-Symptome
<b>Pick-Krankheit</b>	Tau		Frontotemporale Hirnatrophie, Pick- Kugeln, Pick-Zellen	Frontale Demenz
<b>Progressive supranukleäre Blickparese (PSB)</b>	Tau	17 (Exon 10)	Atrophie der Basalganglien und subkortikaler Kerne, Tau-Pathologie	Supranukleäre Blickparese, Stürze, Dysarthrie, Dysphagie, Frontale Demenz
<b>Kortikobasale Degeneration (CBD)</b>	Tau (Exon 10)	Polymorphismus H1/H1- Genotyp	Multisystemdegeneration mit subkortikaler Tau- Pathologie	Parkinson-Syndrom, Blickparese, Demenz, Apraxie
<b>Synukleinopathien</b>				
<b>Morbus Parkinson (MP)</b> - juvenil - familiär - sporadisch	α- Synuklein Parkin1, Uchl1, LRRK2	1, 2, 4, 6, 12	Degeneration des striato- nigralen und anderer u. a. kortikaler Systeme, subkortikale Lewy- Körperchen	Rigor, Akinese, Tremor, Haltungsstörungen, z. T. Demenz,
<b>Lewy Körperchen Demenz (LBD)</b>	α- Synuklein ApoE ε4	?	Kortikale und subkortikale Lewy- Körperchen, Nigradegeneration, Alzheimer-Pathologie	Progrediente Demenz, Parkinson-Symptome
<b>Multisystematrophie (MSA)</b>	α- Synuklein		Degeneration von Striatum und SN, α- Synuklein und Glialeinschlußkörper; Kleinhirn-Brücken- Olivien-Atrophie (Olivo- ponto-cerebelläre Atrophie)	Parkinson-Syndrom (MSA-P), Kleinhirnataxie (MSA- C), Inkontinenz, autonome Störungen

**Tabelle 1.1-1: Klassifikation neurodegenerativer Erkrankungen nach molekularbiologischen Merkmalen**  
(Jellinger KA 2005)

Erkrankung	Gen	Chromosom	Morphologie	Klinik
<b>Polyglutamin-Erkrankungen</b>				
<b>Chorea Huntington (HD)</b> - hereditär	Huntingtin CAG- Repeats	4	Atrophie und Degeneration des Striatum, neuronale Zelleinschlüsse	Choreatiforme Hyperkinesien, Demenz
<b>Spinozerebelläre Ataxien (SCA)</b> - hereditär	Ataxin, SCA 1-19 CAG- Repeats	6, 8, 11, 12, 14, 19	Degeneration der Kleinhirnrinde und der Rückenmarkshinterstränge	Dysarthrie, Ataxie, Kleinhirnsymptome
<b>Friedreich-Ataxie</b>	Frataxin	9	Kleinhirn- und Hinterstrangdegeneration, Spinale Wurzelentmarkung	Dysarthrie, Paraparese, Kardiomyopathie u. a. Symptome
<b>Motorische Systemdegeneration</b>				
<b>Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)</b> - familiär - sporadisch	SOD1, ALS 1-X	2, 9, 15, 18, 21	Degeneration zentraler und peripherer Motoneurone (Vorderhornzellen, Vorderwurzeln, Bulbärkerne), Ubiquitin-, Zell- und Kerneinschlüsse	Spastische Paresen, Bulbäre Symptome
<b>Prionen-Erkrankungen</b>				
<b>Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK)</b> - sporadisch - familiär	PrP- Codon 129	Multiple Mutationen	Spongiforme Enzephalopathie, Prionen-Plaques	Progrediente Demenz, Kleinhirnsymptome, Myoklonien, Kleinhirntaxie
<b>Variante der CJK (vCJK)</b>	PRNP- Codon 129		Spongiforme Enzephalopathie, Astrozyten, PrP-Anhäufung in Lymphknoten	Depression, Angst, Dysarthrie, Demenz

ApoE: Apolipoprotein E, APP: Amyloid  $\beta$  (A4) precursor Protein, LRRK2: leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2, PNPP: PRNP/PrP: Prion-Protein, PS: Präsenilin, SN: Substantia nigra, SOD: Superoxid-Dismutase, Uchl: Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1



## 1.2 Epidemiologie von Demenzen, der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson

Demographische Studien zur Inzidenz und Prävalenz von Demenzerkrankungen, insbesondere der AD, bestätigen kontinuierlich eine Altersabhängigkeit (Hebert et al. 2003, Thies & Bleiler 2011). Es ist also anzunehmen, dass der durch die steigende Lebenserwartung in der westlichen Welt wachsende Anteil älterer Menschen in der Bevölkerung zu einer Zunahme dementieller Erkrankungen führen wird (Jellinger KA 2001, Bickel 2008, Thies & Bleiler 2011). Abbildung 1.2.1 gibt eine Übersicht über die geschätzte Entwicklung der Demenzzahlen in Deutschland bis 2050.

Geschätzte Zunahme der Krankenzahl von 2000 bis 2050		
Jahr	Geschätzte Anzahl von über 65-Jährigen in Millionen	Geschätzte Krankenzahl
2000	13,7	935.000
2010	16,8	1.210.000
2020	18,6	1.545.000
2030	22,2	1.824.000
2040	23,8	2.197.000
2050	23,5	2.620.000

Schätzungen auf der Basis der 11. koordinierten Bevölkerungsvorausschätzung

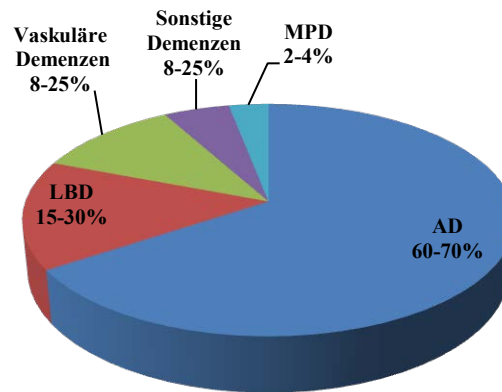
Abbildung 1.2-1: Geschätzte Entwicklung der Prävalenz von Demenzerkrankungen in Deutschland (Bickel 2008).

Im „World Alzheimer Report 2010“ wird die globale Prävalenz von Demenzen mit 36,5 Mio. Menschen beziffert und eine Verdopplung dieser Zahl alle 20 Jahre angenommen (Wimo & Prince 2010). Die jährliche Inzidenzrate wird mit 4,6 Mio. Menschen angegeben (Ferri et al. 2005, Prince 2008).

In Deutschland leiden etwa 1,1 Mio. Menschen über 65 Jahren an einer Demenz (Bickel 2008). Ihre Prävalenz beträgt in der siebten Lebensdekade nur etwa 1 %, in der zehnten Dekade ist rund ein Drittel der Bevölkerung betroffen (Bickel H. 2005, Knapp 2010). In einigen Studien werden sogar Zahlen von etwa 60 % bei den über 95-Jährigen angegeben (Riedel-Heller et al. 2001). Sowohl die Prävalenz- als auch die Inzidenzraten verdoppeln sich alle fünf Jahre ab einem Alter von 65 Jahren bis zur neunten Dekade. Das lebenszeitliche Risiko, an einer Demenz zu erkranken, beträgt für Frauen 45 % und

für Männer 33 % (Jellinger KA 2001). Abbildung 1.2.2 stellt die Epidemiologie der häufigsten Demenzformen in einem Tortendiagramm dar.

### Epidemiologie der Demenzen



**Abbildung 1.2-2: Epidemiologie der Demenzen.** Dargestellt sind die häufigsten dementiellen und mit einer Demenz einhergehenden Erkrankungen. AD: Alzheimer Demenz, LBD: Lewy Körperchen Demenz, MPD: Morbus Parkinson mit Demenz. Zu den sonstigen Demenzen zählen: 1. weitere Formen degenerativer Demenzen (z. B. Frontotemporale Demenzen), 2. Mischtyp aus AD und vaskulärer Demenz, 3. sekundäre Demenzformen (Jellinger KA 2003, Deuschl & Maier 2009).

Die AD verursacht etwa 50 bis 70 % aller Demenzerkrankungen in der westlichen Welt, gefolgt von der Lewy-Körperchen Demenz (LBD, engl. Lewy body dementia) mit 15 bis 30 % und den vaskulären Demenzen mit etwa 2 bis 8 %, z. T. werden hier Werte bis 25 % angegeben (Jellinger KA 2003, Deuschl & Maier 2009). Die Inzidenz der AD in Deutschland beträgt zwischen 120000 bis 160000 Menschen, dabei nehmen die Raten von etwa 0,2 % in der siebten auf 5 bis 10 % in der zehnten Lebensdekade zu (Bickel H. 2005).

Die Prävalenz des MP in Deutschland beträgt etwa 100 bis 250 pro 100000 Einwohner, die Inzidenz 5 bis 26 pro 100000 Einwohner (Poeck & Hacke 2006). Der MP beginnt zwischen dem 40. bis 70. Lebensjahr mit einem Gipfel in der sechsten Dekade. Vor dem 50. Lebensjahr tritt er nur selten auf. Ab dem 60. Lebensjahr steigen Prävalenz und Inzidenz exponentiell an (Lang & Lozano 1998, Van Den Eeden et al. 2003, von Campenhausen S. et al. 2005). Seine Prävalenz nimmt von etwa 1 % im 65. Lebensjahr

auf 4 bis 5 % in der neunten Dekade zu (Dawson & Dawson 2003). Die epidemiologischen Daten zur geschlechtsspezifischen Verteilung des MP sind unterschiedlich, z. T. wird eine leichte Überzahl an erkrankten Männern angegeben (Zhang & Roman 1993, Van Den Eeden et al. 2003). Die Prävalenz für die Entwicklung einer Demenz im Rahmen des MP beträgt etwa 30 % (Reichmann & Sommer 2001, Emre 2003).

### 1.3 Einteilung der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson

Die AD wird anhand der ICD-10 in die EOAD (engl. early onset AD) mit einem frühen Beginn vor dem 65. Lebensjahr und die LOAD (engl. late onset AD) mit einem späten Beginn ab dem 65. Lebensjahr unterschieden.

Pathophysiologisch wird die sporadische Form von den monogenetischen, autosomal dominant vererbten Formen, der familiären AD (FAD), abgegrenzt. Die sporadische Form der AD macht etwa 90 % der Erkrankung aus, die FAD weniger als 10 % (Bertram & Tanzi 2008, Bekris et al. 2010). Etwa 5 % aller AD Fälle beginnen vor dem 65. Lebensjahr, davon sind nur etwa 10 % durch die FAD verursacht (Deuschl & Maier 2009).

Trotz ihres unterschiedlichen zeitlichen Beginns sind die EOAD und LOAD in Klinik, Pathophysiologie und Neurobiologie nicht zu unterscheiden. Die FAD kann von den sporadischen Formen aufgrund der bekannten krankheitsassoziierten Mutationen durch eine genetische Diagnostik differenziert werden.

James Parkinson beschrieb die nach ihm benannte Erkrankung erstmals 1817 in einem Essay mit dem Titel „An essay on the shaking palsy“ (Parkinson 1817). Die Einteilung der Parkinson-Syndrome erfolgt in vier Gruppen. Das idiopathische Parkinson-Syndrom, der Morbus Parkinson, stellt mit 75 bis 80 % die häufigste Entität dar (Storch 2002). Von diesem werden die atypischen Parkinson-Syndrome bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen (z. B. Morbus Wilson), die symptomatischen und die familiären Formen abgegrenzt (Poock & Hacke 2006, Oertel & Reichmann 2008). Die familiären Formen machen etwa 10 % aller Parkinson-Erkrankungen aus (Fahn & Sulzer 2004) und werden monogenetisch vererbt. Die Differenzierung der hereditären

Formen von der idiopathischen Parkinson Erkrankung ist durch eine genetische Diagnostik möglich.

### **1.4 Klinik der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson**

#### **1.4.1 Klinik der Alzheimer Demenz**

Die AD als kortikale Demenz ist durch einen langsamen, chronisch progredienten Verlauf gekennzeichnet (Deuschl & Maier 2009). Sie kann klinisch anhand des Ausmaßes der kognitiven Defizite in ein frühes, ein mittleres und ein spätes Stadium eingeteilt werden. Nach der Diagnosestellung beträgt die mittlere Überlebenszeit der Patienten etwa fünf bis acht Jahre (Schmidtke 2005), seltener bis zu 20 Jahren (Thies & Bleiler 2011).

Als Prodromalphase der AD kann die sogenannte leichte kognitive Beeinträchtigung (MCI, engl. mild cognitive impairment) auftreten und individuell unterschiedlich lange andauern. Die MCI bezeichnet eine erworbene Störung der Merkfähigkeit, der Aufmerksamkeit oder des Denkvermögens, die über die normale altersabhängige Leistungsabnahme hinausgeht, aber noch nicht das Ausmaß einer Demenz erreicht. Die Betroffenen sind in der Ausübung ihrer Alltagstätigkeiten (ADL, engl. activity of daily living) noch nicht eingeschränkt (Petersen et al. 1997).

Anhand der führenden klinischen Symptomatik wird die MCI in verschiedene Formen unterteilt. Die amnestische MCI, die sich vorwiegend mit Gedächtnisstörungen manifestiert, wird dabei von der nicht-amnestischen MCI abgegrenzt. Bei dieser treten definitionsgemäß kognitive Defizite in Hirnleistungsbereichen auf, die nicht das Gedächtnis betreffen. Es wird die nicht-amnestische MCI mit einer Einzeldomäne, d. h. mit Funktionsstörungen eines einzelnen kognitiven Bereiches, von der nicht-amnestischen MCI mit multiplen Domänen, entsprechend Defiziten in mehreren Hirnleistungsbereichen, unterschieden (Tabert et al. 2006).

Jährlich entwickeln etwa 10 bis 20 % der Betroffenen mit einer MCI eine Demenz (Kurz et al. 2004). Die amnestische MCI mündet häufiger in einer AD, die nicht-amnestischen Formen gehen neben der AD auch in andere Demenzen, z. B. die FTDP, die LBD oder eine vaskuläre Demenz, über (Voisin et al. 2003).

Das Leitsymptom der AD selbst ist die progrediente Gedächtnisstörung, die sich bereits sehr früh in einem verzögerten Abruf und in einer beeinträchtigten Ausführung komplexer Aufgaben äußert (Deuschl & Maier 2009). Während der Erkrankung treten Störungen des räumlich visuellen Denkens, von Exekutivfunktionen, der Orientierung, eine Agnosie, eine Aphasie und eine Apraxie bei lang erhaltener Persönlichkeit, außerdem nicht kognitive Veränderungen wie Depressionen, Antriebsmangel, Angst, psychomotorische Unruhe oder Halluzinationen auf. Das Bewusstsein ist dabei ungestört (Poeck & Hacke 2006). Das selbständige Ausführen der ADL wird unmöglich, die Betroffenen werden pflegebedürftig (McKhann et al. 1984). Neurologisch findet man im späteren Verlauf häufig auch motorische Defizite, die sich vorwiegend als Parkinson-Symptome manifestieren (Kurlan et al. 2000). 60 bis 80 % der Patienten entwickeln dabei einen Rigor und eine Akinesie (Sagar 1987).

Zur Evaluation funktioneller und kognitiver Defizite während des normalen Alterns als auch bei der AD entwickelten Reisberg et al. ein klinisches Skalensystem (Sclan & Reisberg 1992). Dieses umfasst die GDS (Global Deterioration Scale) zusammen mit ihren Unterskalen BCRS (Brief Cognitive Rating Scale) und FAST-Skala (Functional Assessment Staging). Die FAST-Skala charakterisiert zusätzlich den Verlauf vom Gesunden zur AD bzw. nimmt eine klinische Einteilung der AD in sieben Stadien mit 11 Unterstadien vor. Tabelle 1.4.-1 gibt eine Übersicht über die klinische Einteilung der AD in Stadien anhand des FAST-Systems nach Reisberg.

**Tabelle 1.4-1: FAST-Skala - Klinische Stadieneinteilung der Alzheimer Demenz (Sclan & Reisberg 1992)**

Fast Stadium	Klinische Charakteristika	Diagnose
1	Keine objektiven oder subjektiven Einschränkungen	Gesund
2	Subjektive Störung der Wortfindung, im Erinnern von Namen, Örtlichkeiten oder Terminen	Altern, gesund
3	Keine objektivierbaren oder manifesten funktionellen Defizite Defizite in Anforderungen des beruflichen und sozialen Lebens - Vergessen wichtiger Termine, Beeinträchtigung von Arbeitsabläufen oder beim Auffinden fremder Örtlichkeiten	Beginnende AD
4	Defizite in der Ausübung komplexer ADL - Einkaufen, Rechnungen bezahlen...	Leichte AD
5	Defizite beim Aussuchen angemessener Kleidung, bei der Durchführung regelmäßiger Körperpflege, Hilfestellung für die unbeeinträchtigte Teilnahme in der Gesellschaft erforderlich	Mäßige AD
6(a-e)	Hilfestellung bei der Ausführung der ADL nötig (Baden, Toilettengang, Anziehen), beginnende Inkontinenz	Mäßige AD
7(a-f)	Progrediente Sprachverarmung, fortschreitende Gangstörung bis zur Gehunfähigkeit, Unfähigkeit zu Sitzen oder den Kopf selbständig zu halten, Unfähigkeit zu Lächeln	Schwere AD

Die Unterstadien 6a-e und 7a-f der FAST-Skala sind hier jeweils unter Stadium 6 und 7 zusammengefasst worden.  
AD: Alzheimer Demenz, ADL: Aktivitäten des täglichen Lebens, FAST: Functional Assessment Staging.

### 1.4.2 Klinik des Morbus Parkinson

Das Parkinson-Syndrom ist eine Konstellation aus den Hauptsymptomen Akinesie bzw. Hypokinesie mit den in unterschiedlicher Gewichtung bestehenden Symptomen Ruhetremor, Rigor und posturale Instabilität. Im Verlauf der Erkrankung können begleitend sensorische (Dysästhesien, Schmerzen), vegetative, psychische und kognitive Symptome hinzukommen. Letztere können sich dabei in Form von frontalen Störungen oder als Demenz manifestieren (Oertel & Reichmann 2008).

Charakteristisch für den idiopathischen MP ist der einseitige Beginn der motorischen Symptomatik mit einer z. T. persistierenden Asymmetrie. Meist sind die motorischen Symptome jedoch nach etwa fünf Krankheitsjahren beidseitig vorhanden (Schmidtke 2005). Weiterhin sind ein progredienter, langer klinischer Verlauf von zehn oder mehr Jahren und das positive Ansprechen der Symptome auf L-Dopa typisch (Oertel & Reichmann 2008).

Bei einem Teil der Betroffenen treten in einer Prodromalphase noch vor der klassischen Parkinson-Symptomatik bereits Persönlichkeitsveränderungen, eine depressive Verstimmung, Schmerzen der Schultergürtel- oder Wirbelsäulenmuskulatur (Schmidtke 2005), autonome Funktionsstörungen oder REM-Schlaf-Verhaltensstörungen auf (Zubenko et al. 2003).

Eine klinische Stadieneinteilung des idiopathischen MP kann anhand der Schwere der Symptomatik nach einer durch Hoehn und Yahr (H&Y) entwickelten Skala erfolgen (Hoehn & Yahr 1967). Tabelle 1.4-2 stellt die Hoehn- und Yahr-Stadien des MP dar.

**Tabelle 1.4-2: Stadieneinteilung des Morbus Parkinson nach Hoehn und Yahr (Hoehn & Yahr 1967)**

<b>Hoehn &amp; Yahr Stadium</b>	<b>Klinische Charakteristika</b>
Stadium 0	Keine Symptomatik
Stadium 1	Einseitige Symptomatik ohne oder mit minimaler funktioneller Beeinträchtigung Bilaterale oder axiale Beteiligung, keine posturale Instabilität
Stadium 2	Leichte bis mäßige Behinderung, Haltungsinstabilität, funktionelle Einschränkung in den Aktivitäten, aber keine Hilfe bei den ADL (Aktivitäten des täglichen Lebens) erforderlich
Stadium 3	Schwere Behinderung, ausgeprägte Gangstörung bei erhaltener Geh- und Stehfähigkeit, Hilfe bei der Verrichtung der ADL nötig
Stadium 4	Pflegebedürftig, rollstuhlpflichtiger oder bettlägeriger Patient

### **1.4.3 Schnittpunkte der klinischen Symptomatik der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson**

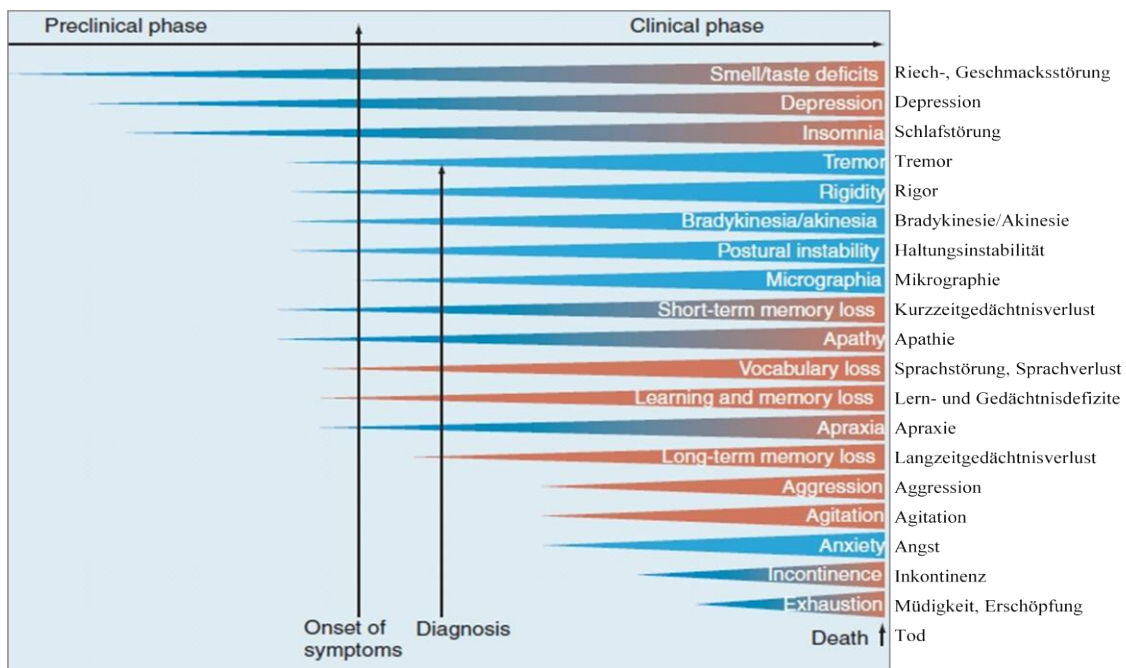
Die AD und der MP weisen klinisch einige Gemeinsamkeiten auf. Beim MP ist eine dementielle Entwicklung mit etwa 30 % häufig (Reichmann & Sommer 2001, Emre 2003, Riedel et al. 2008). Bei ausführlicher neuropsychologischer Testung werden sogar Werte um 40 % angegeben (Klockgether 2004). Dabei scheint die Häufigkeit der Demenz mit dem Alter und der Schwere der körperlichen Beeinträchtigung zuzunehmen (Mayeux et al. 1992, Riedel et al. 2008).

Umgekehrt treten in späteren Stadien der AD häufig motorische Parkinson-Symptome auf (Chui et al. 1994, Kurlan et al. 2000).

Beide neurodegenerative Krankheiten haben eine präklinische Phase, die sich bei der AD in der MCI, beim MP in den o. g. unspezifischen Symptomen äußern kann

(Zubenko et al. 2003, Schmidtke 2005). Zudem sind bei beiden Erkrankungen Störungen des Riechsystems häufig, die bereits Jahre vor den krankheitsspezifischen Symptomen auftreten können (Mayeux et al. 1992, Hawkes 2003). Insbesondere beim MP gilt die Hyposmie als Frühsymptom (Ansari & Johnson 1975, Mayeux et al. 1992, Oertel & Reichmann 2008).

Auch psychiatrische Symptome kommen bei beiden Erkrankungen vor. Depressionen, die zu vermehrter sozialer Isolierung, Einschränkungen der Alltagsaktivitäten und somit zu stärkerer Behinderung führen können, treten bei 30 bis 50 % der Alzheimer Patienten auf (Zubenko et al. 2003, Starkstein et al. 2005). 25 bis 50 % der Parkinson-Patienten leiden ebenfalls an Depressionen (Grünblatt 2008), die der Diagnosestellung sogar weit vorausgehen können. Abbildung 1.4.1 gibt eine Übersicht über den Verlauf und klinische Symptome der AD und des MP.



**Abbildung 1.4-1: Verlauf und Symptomatik der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson** (Grünblatt 2008). Blau: Typische klinische Symptome des Morbus Parkinson, Rot: Typische Symptome der Alzheimer Demenz, Blau-Rot kombiniert: Gemeinsame Symptome beider Erkrankungen. Der Beginn der Symptomatik der jeweiligen Erkrankung (Onset of symptoms) ist mit einem Pfeil markiert, ebenso der Zeitpunkt der Diagnosestellung (Diagnosis). Clinical phase: Klinische Phase, preclinical phase: Prodromalphase (präklinisches Stadium).



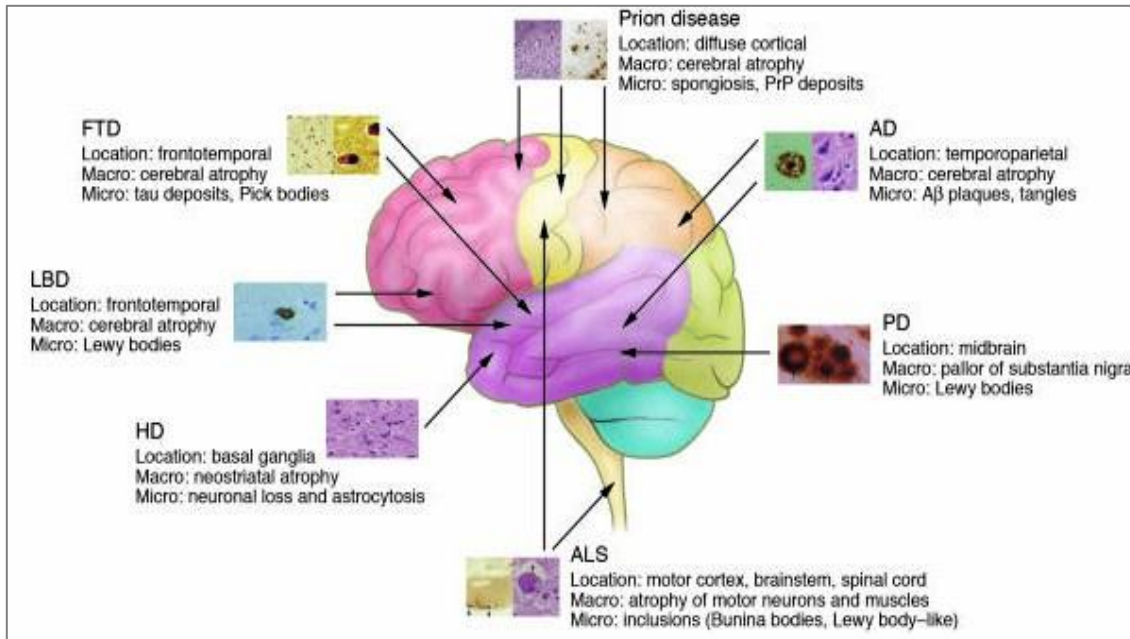
### 1.5 Neuropathologie

#### 1.5.1 Grundlagen der Neuropathologie neurodegenerativer Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen sind durch einen progredienten Neuronenverlust, dessen Ätiologie bisher nicht vollständig bekannt ist, gekennzeichnet. Die fehlerhafte Faltung bestimmter neuronaler Peptide oder Proteine, die eine Aggregation der Proteine zu Oligomeren, d. h. Molekülen aus mehreren strukturell gleichen oder ähnlichen Einheiten, und zu unlöslichen Fibrillen auslösen kann mit der Folge der intra- oder extrazellulären Ablagerung dieser Aggregate im Gewebe, wird als ein möglicher kausaler Mechanismus der Neuronenschädigung diskutiert (Jellinger KA 2001, Jellinger KA 2005, Tsigelny et al. 2008, Irvine et al. 2008). Die extrazellulären, fibrillären Proteinablagerungen häufig mit einer  $\beta$ -Faltblattstruktur, die nach der Färbung mit Kongorot mikroskopisch eine spezifische grüne Doppelbrechung zeigen, werden allgemein als Amyloid bezeichnet (Haass & Selkoe 2007).

Bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen kommen molekularbiologisch und morphologisch Überschneidungen oder gemischte Pathologien vor, die pathologischen Proteinablagerungen sind also nicht immer krankheitsspezifisch (Tsigelny et al. 2008). So werden kortikale A $\beta$ -Ablagerungen neben der AD auch im Hirngewebe von Patienten mit MP und der LBD gefunden (Brooks 2009). Auf der anderen Seite kommen die  $\alpha$ -Synuklein haltigen Lewy-Körperchen (LB, engl. Lewy bodies), die bei der LBD und dem MP im Gehirn abgelagert werden, z. T. auch bei der AD vor (Broe et al. 2005).

Aufgrund der Heterogenität der neurodegenerativen Erkrankungen kann bei einigen eine Bestätigung der klinisch gestellten Diagnose nur durch eine postmortale neuropathologische Untersuchung anhand spezifischer makroskopischer und mikroskopischer Marker im ZNS erfolgen. Abbildung 1.5.1 zeigt die Lokalisation wichtiger neurodegenerativer Erkrankungen mit ihren mikroskopischen und makroskopischen Charakteristika.



**Abbildung 1.5-1: Lokalisation der wichtigsten neurodegenerativen Erkrankungen mit den charakteristischen histologischen Veränderungen.** AD: Alzheimer Demenz, ALS: Amyotrophe Lateralsklerose, FTD: Frontotemporale Demenz, LBD: Lewy Körperchen Demenz, HD: Chorea Huntington, MP: Morbus Parkinson, Prion disease: Prion-Erkrankung, Lokalisation der Erkrankung (Location), makroskopisch (Macro), mikroskopisch (Micro) (Bertram & Tanzi 2005).

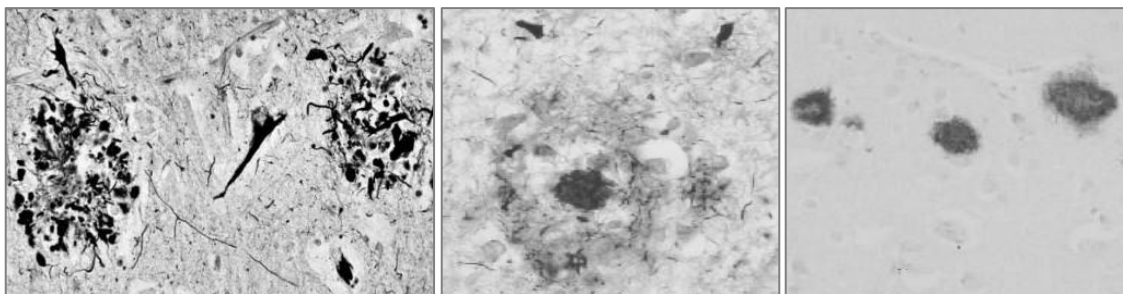
### 1.5.1.1 Neuropathologie der Alzheimer Demenz

Relevanz als Marker für die AD haben die erstmalig durch Alois Alzheimer anhand des Autopsiebefundes von Auguste D. beschriebenen, mikroskopisch nachweisbaren Plaques aus extrazellulären A $\beta$ -Ablagerungen im Hirngewebe und -gefäßen (Glenner & Wong 1984, Masters et al. 1985, Jellinger KA 2003) sowie die intraneuronale Aggregation von abnorm phosphoryliertem Tau-Protein als Neurofibrillenbündel (NFT, engl. neurofibrillary tangles), den sogenannten Alzheimer-Fibrillen (Grundke-Iqbal et al. 1986, Kretzschmar & Neumann 2000).

A $\beta$  ist ein physiologisch ungefaltetes, lösliches Peptid mit einer Länge von 38 (A $\beta_{38}$ ), 40 (A $\beta_{40}$ ) oder 42 (A $\beta_{42}$ ) Aminosäuren (AS), das kontinuierlich von gesunden Zellen produziert wird und im Liquor cerebrospinalis und Plasma nachweisbar ist (Seubert et al. 1992, Haass et al. 1992, Seubert et al. 1993, Sastre et al. 2001). Etwa 90 % sind dabei die A $\beta_{40}$ -Produkte, die A $\beta_{42}$ -Produkte machen nur etwa 10 % des Gesamtpools aus (Sinha & Lieberburg 1999, Hartmann 1999). Lösliches A $\beta$  besteht aus einer  $\alpha$ -

Helix, unlösliches aus einem  $\beta$ -Faltblatt, das Fibrillen bilden kann (Cappai & White 1999). Durch Aggregation der  $A\beta$ -Monomere entstehen zunächst ebenfalls lösliche, diffusionsfähige Oligomere, die sich in den anfänglich diffusen Plaques ablagern. Dort scheint möglicherweise über weitere Zwischenprodukte die Bildung der unlöslichen Fibrillen und der neuritischen Plaques (NP) zu erfolgen (Haass & Selkoe 2007). Das hydrophobere  $A\beta_{42}$ , das aufgrund der zusätzlichen AS-Reste stärker zur Aggregation neigt (Selkoe 2004), wird bei der sporadischen und familiären AD als vorwiegende Komponente der  $A\beta$ -Plaques gefunden (Sinha & Lieberburg 1999). Als Ursache der Neurodegeneration sowie des Synapsen- und Neuronenverlusts bei der AD werden die löslichen, diffusionsfähigen Oligomere des  $A\beta$  in den NP diskutiert (El-Agnaf et al. 2003, Shankar et al. 2007, Walsh & Selkoe 2007).

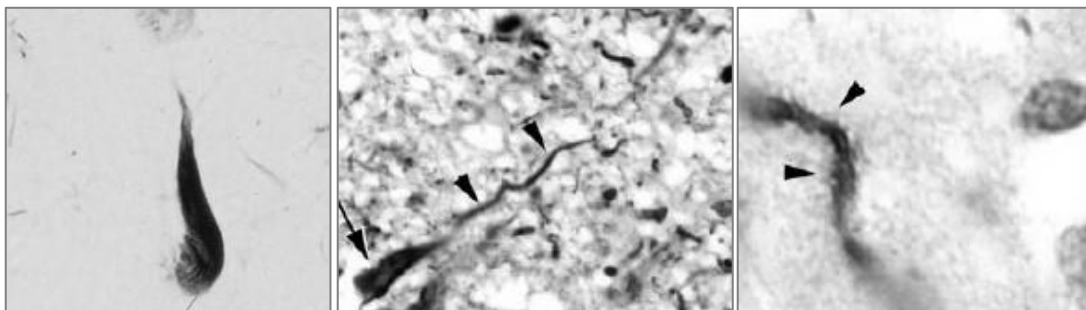
$A\beta$  wird bei der AD in verschiedenen Arten von Plaques gefunden. Diffuse Plaques enthalten homogen verteiltes, nicht fibrilläres  $A\beta$  ohne Umgebungsreaktion. Neuritische Plaques mit vermehrt fibrillärem  $A\beta$  werden von dystrophen Nervenzellfortsätzen mit den darin enthaltenen NFT umgeben. Andere Formen sind z. B. das Core-only-Plaque oder das Fleecy Amyloid (Thal & Braak 2005). Abbildung 1.5.2 stellt die Ablagerung des  $A\beta$ -Peptids in neuritischen und diffusen Plaques mikroskopisch dar.



**Abbildung 1.5-2:  $A\beta$ -Plaques im temporalen Kortex.** Linkes Bild: Zwei neuritische  $A\beta$ -Plaques, in deren Mitte ein Neurofibrillenbündel gelegen ist. Fotomikrographie, modifizierte Bielschowski-Färbung (Perl 2010). Mittleres Bild: Neuritischer  $A\beta$ -Plaques. Rechtes Bild: Diffuse  $A\beta$ -Plaques. Mittleres und rechtes Bild: Gallyas- $A\beta$  (Thal et al. 2000).

Das Tau-Protein als Mikrotubuli (MT) assoziiertes Protein (MAP) ist für den Aufbau, die Polymerisation und die Stabilität der MT verantwortlich (Weingarten et al. 1975, Cleveland et al. 1977). Es ist in großer Anzahl in den Neuronen des peripheren und zentralen Nervensystems lokalisiert und befindet sich dort vorwiegend in den Axonen (Cleveland et al. 1977, Binder et al. 1985, Couchie et al. 1992). Tau ist an der neuronalen Axon- und Dendritenbildung sowie dem neuronalen Transport essentiell

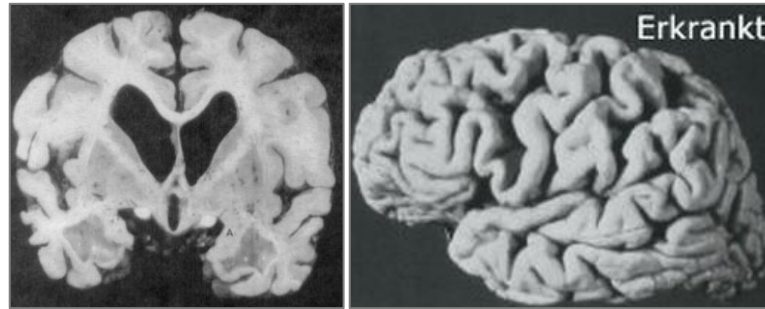
beteiligt (Buee et al. 2000). Unlösliche Aggregate aus abnorm phosphoryliertem Tau in Form von paarigen helikalen Filamenten (PHF) aus zwei sich periodisch umeinander windenden Filamentsträngen sowie in geringerem Ausmaß aus geraden Filamenten sind die Grundbausteine der NFT (KIDD 1963, Brion et al. 1985, Grundke-Iqbal et al. 1986, Goedert et al. 1989, Kosik et al. 1989, Crowther 1991). NFT in Zellfortsätzen werden als Neuropilfäden bezeichnet (Thal & Braak 2005). PHF finden sich in Zellkörpern, in dystrophen Neuriten um NP und im Neuropil. Neben den PHF und den geraden Filamenten in den NFT kommt Tau auch in nicht fibrillärer Form im Zytosol von Neuronen vor (Iqbal et al. 2005). Abbildung 1.5.3 zeigt mikroskopische Aufnahmen von Neurofibrillen.



**Abbildung 1.5-3: Neurofibrillenpathologie.** Linkes und mittleres Bild (siehe Pfeile): Neurofibrillenbündel. Rechtes Bild: Neuropilfäden (siehe Pfeile). Linkes Bild: Gallyas-Silberiodid-Färbung (Thal & Braak 2005). Mittleres Bild: AT8-Antikörper, rechtes Bild: Tau polyklonale Antikörper (Duyckaerts et al. 2009).

Weitere typische, histopathologisch nachweisbare Veränderungen bei der AD sind die Mikrogliaaktivierung, die Astrozytenproliferation, der progrediente Verlust von Synapsen und Neuronen, eine granulovakuoläre Degenerationen, Hirano-Körperchen und Lipofuszin-Akkumulationen in Neuronen (Schlegel 2005). Zudem können  $\alpha$ -Synuklein haltige LB vorkommen (Broe et al. 2005).

Leitbild der makroskopischen Veränderungen mit interindividuell unterschiedlichem Ausmaß ist die innere und äußere Hirnatrophie. In der Großhirnrinde sind speziell der mediale Temporallappen, der Hippocampus und der frontoparietale Kortex betroffen. Die innere Atrophie manifestiert sich in der Erweiterung des Ventrikelsystems (Schlegel 2005). Abbildung 1.5.4 zeigt die makroskopischen Veränderungen bei der AD.

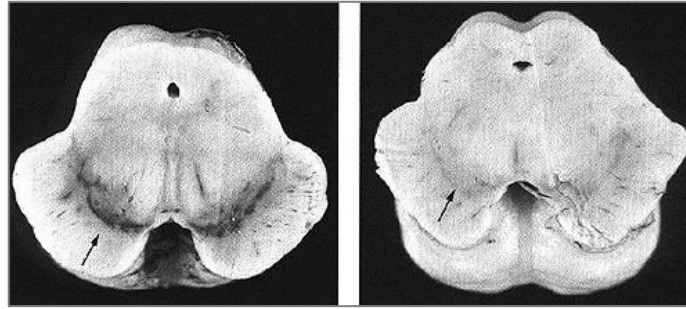


**Abbildung 1.5-4: Hirnatrophie bei der Alzheimer Demenz.** Linkes Bild: Innere Atrophie, die sich in der Verbreiterung der Ventrikel äußert, und äußere Atrophie, die mit einer Verbreiterung der Sulci und Verschmälerung der Gyri der Großhirnrinde einhergeht (Forno 1992). Rechtes Bild: Äußere Atrophie (Quelle: <http://www.aerztezeitung.de/medizin/krankheiten/demenz/article/564890/zwei-neue-alzheimer-gene-identifiziert.html> Zugriff 04/2011).

### 1.5.1.2 Neuropathologie des Morbus Parkinson

Der MP ist durch den Dopaminmangel (DA, Dopamin) striatärer Neurone aufgrund einer progredienten Degeneration melaninhaltiger, dopaminergener Neurone der Substantia nigra, pars compacta (SNpc) mit begleitender Vermehrung der Neuroglia gekennzeichnet. Makroskopisch zeigt sich in der Substantia nigra (SN) eine Depigmentierung (Fahn & Sulzer 2004). Bei der klinischen Manifestation der Erkrankung sind etwa 60 % der dopaminergen Neurone der SNpc degeneriert und DA zu etwa 80 % reduziert (Schulz & Falkenburger 2004).

Die Schädigung der SNpc stellt zwar den pathophysiologischen Marker des MP dar. Die typischen pathologischen Veränderungen und die Neurodegeneration erstrecken sich aber auch auf noradrenerge (Locus coeruleus), serotonerge (Raphekerne), cholinerge (Nucleus basalis Meynert, dorsaler Vagus Kern) Systeme, auf das olfaktorische System speziell den Bulbus olfactorius (BO), und geringer auf den zerebralen Kortex (Hippocampus, Gyrus cinguli, Formatio reticularis). Des Weiteren sind die sympathischen und parasymphatischen Strukturen des Herzens, des Urogenitalsystems und des Gastrointestinaltraktes von den Veränderungen betroffen (Scatton et al. 1983, Braak et al. 1995). Abbildung 1.5.5 stellt die Veränderungen in der SN beim MP dar.

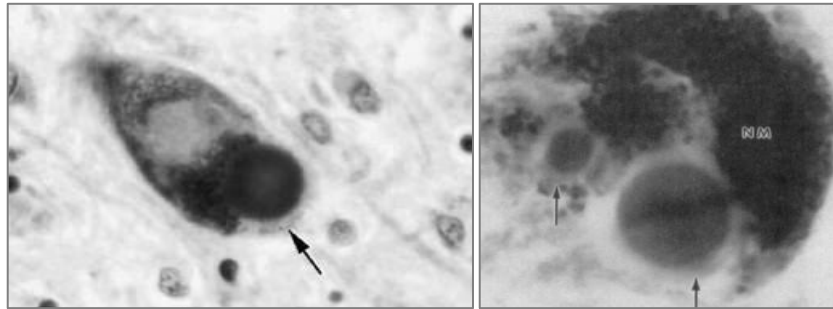


**Abbildung 1.5-5: Depigmentierung der Substantia nigra beim Morbus Parkinson.** Dargestellt sind zwei Gewebeschnitte aus dem Mittelhirn. Linkes Bild: Normale Pigmentierung der SN bei einer gesunden Person (Pfeil). Rechtes Bild: Deutlich reduzierte Pigmentierung der SN bei einem Patienten mit Morbus Parkinson (Pfeil). (Quelle: [http://www.molekulare-neurologie.uk-erlangen.de/e1662/e86/index\\_ger.html](http://www.molekulare-neurologie.uk-erlangen.de/e1662/e86/index_ger.html), Zugriff 04/2011). SN: Substantia nigra.

In den Neuronen der veränderten Hirnregionen und des betroffenen vegetativen Nervensystems sind LB, d. h. zytoplasmatische eosinophile Einschlusskörperchen mit einer dichten Kernstruktur umgeben von einem blassen Halo mit radiär angeordneten Fasern (Spillantini et al. 1998), sowie Lewy Neuriten (LN), längliche Aggregate in Nervenzellfortsätzen (Braak et al. 2003b), vorhanden. LB enthalten Proteinaggregate aus  $\alpha$ -Synuklein, zudem aus Ubiquitin, Synphilin, Parkin und Neurofilamenten (Schulz & Falkenburger 2004). Sie sind jedoch nicht spezifisch für den MP und werden auch nicht bei allen familiären Formen der Erkrankung gefunden.

Das physiologisch ungefaltete, zytosolische  $\alpha$ -Synuklein als Hauptkomponente der LB wird vorwiegend in Neuronen, speziell in der SN, im Nucleus caudatus und der Amygdala, exprimiert und ist dort in Synapsen und Axonendigungen lokalisiert (Trojanowski & Lee 1998). Wie das A $\beta$ -Peptid bei der AD kann es über oligomere Intermediärformen zu Fibrillen aggregieren und wird dann im Gewebe in Form der LB abgelagert (Goldberg & Lansbury, Jr. 2000, Tofaris & Spillantini 2007). Die Abbildung 1.5.6 zeigt mikroskopische Aufnahmen von Lewy-Körperchen.

Die Degeneration der dopaminergen Neurone soll die meisten motorischen Symptome des MP, die der hippocampalen und cholinergen Neurone die mögliche dementielle Entwicklung verursachen (Schulz & Falkenburger 2004). Als kausale Faktoren werden dabei zum einen die  $\alpha$ -Synuklein-Ablagerungen zum anderen das Auftreten von Alzheimer-typischen Veränderungen in betroffenen Neuronen diskutiert (Hu et al. 2010).



**Abbildung 1.5-6: Lewy Körperchen in einem pigmentierten Neuron der Substantia nigra** (markiert mit Pfeilen). Linkes Bild: Ubiquitin-Immunfärbung (Chu et al. 2000). Rechtes Bild: Hematoxylin-Eosin-Färbung, Öl-Immersion (Forno 1992). NM: Neuromelanin.

## 1.5.2 Histopathologische Stadieneinteilung der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson

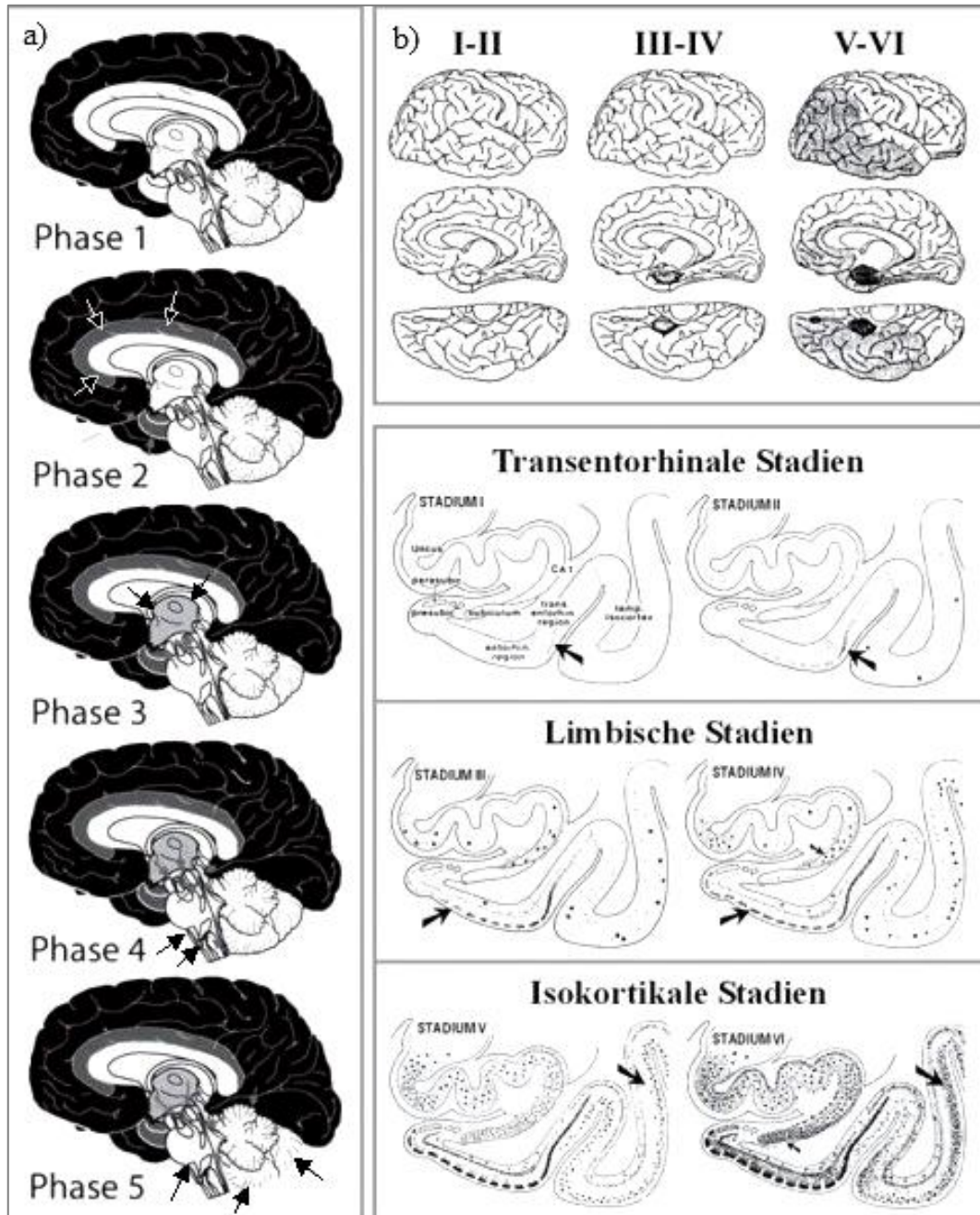
Sowohl bei der AD als auch beim MP beginnen die pathologischen zerebralen Prozesse in prädisponierten Hirnarealen und breiten sich dann in spezifischer, vorhersagbarer Sequenz über verschiedene Neuronensysteme aus.

Das Staging beider Erkrankungen nach dem Braak-System erfolgt anhand dieser typischen histopathologischen Veränderungen jeweils in sechs Stadien (Braak et al. 2003a, Braak et al. 2004, Thal & Braak 2005). Da die initialen Veränderungen bereits Jahre vor der klinischen Manifestation beider Krankheiten auftreten, werden die pathologischen Prozesse zusätzlich jeweils in eine präsymptomatische und eine symptomatische Phase gegliedert.

### 1.5.2.1 Stadieneinteilung der Alzheimer Demenz nach Braak

Die Stadieneinteilung der AD nach Braak erfolgt anhand der Neurofibrillen-Pathologie (NFT-Pathologie) in umschriebenen Hirnregionen (Braak & Braak 1995, Braak & Braak 1997, Braak et al. 2006). Dort wird mit der Silberfärbung nach Gallyas (Gallyas 1971) die Verbreitung der NP, der NFT und der Neuropilfäden detektiert.

Zur morphologischen Diagnosestellung der AD wird die Stadieneinteilung der NFT-Pathologie und die semi quantitative Schätzung der A $\beta$ -Plaqueszahl herangezogen (Thal & Braak 2005). Abbildung 1.5.7 gibt einen Überblick über die histopathologische Stadieneinteilung der AD.



**Abbildung 1.5-7: Histopathologische Stadien der Alzheimer Demenz.** Ausbreitung der a) Aβ-Ablagerungen (s. Pfeile) und b) der Neurofibrillenpathologie. b) Stadieneinteilung der Neurofibrillen-Pathologie anhand des medialen Temporallappens (makroskopisch oben, mikroskopisch unten). Parasub: Parasubikulum, Presub: Präsubikulum, transenthorin. region: transenthorinale Region, entorhin. region: enthorinale Region, temp. isocortex: temporaler Isokortex (Jellinger KA 2003).

Die **Stadien I** und **II** der AD werden als transenthorinale Stadien bezeichnet und sind klinisch asymptomatisch. In geringem Ausmaß sind fast ausschließlich die transenthorinale Region, einige cholinerge Kerne und die Amygdala von der NFT-



Pathologie betroffen. Eine diskrete Ausbreitung beginnt in Stadium II von der transentorhinalen auf die entorhinale Region (Braak et al. 1999, Thal & Braak 2005).

**Stadium III** und **IV** werden als limbische Stadien zusammengefasst. Makroskopisch ist noch keine Atrophie nachweisbar. Im Stadium III nimmt die Aussaat der NFT-Pathologie von der transentorhinalen auf die entorhinale Region weiter zu. Beide Regionen weisen im Verlauf starke Schädigungen auf. Zudem wird der Temporallappen, speziell der Hippocampus betroffen. Im Stadium IV geht die NFT-Pathologie von der entorhinalen Region auf die Assoziationsfelder des Neokortex über (Braak et al. 1999, Thal & Braak 2005).

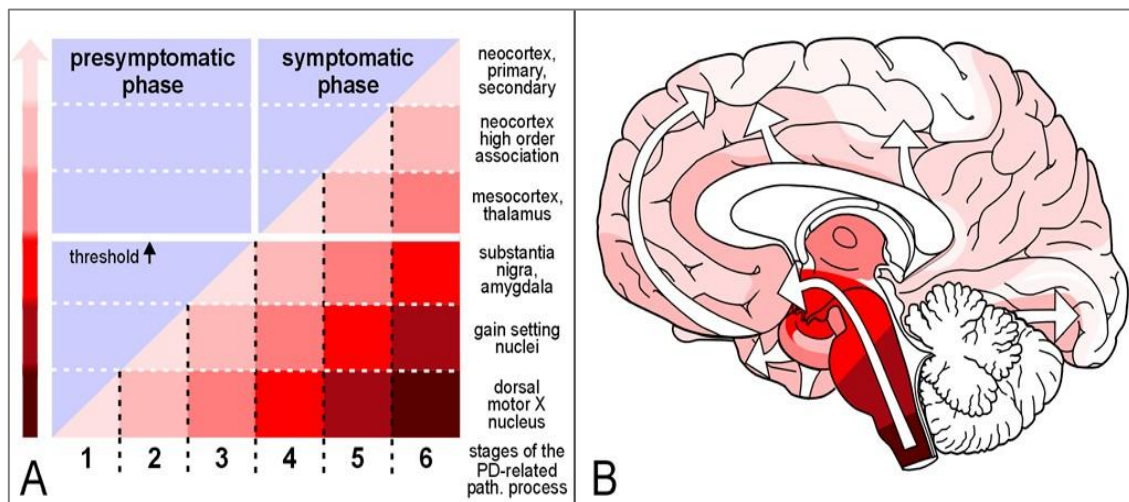
Das Ausbreitungsmuster der neuropathologischen Veränderungen ist für das Auftreten der klinischen Symptome verantwortlich. Die entorhinale und transentorhinale Region fungieren in der Verarbeitung von Prozessen zur Gedächtnis- und Emotionsbildung (Hawkes 2003). Die Läsionen der Projektionen zwischen dem Neokortex und dem Hippocampus führen zu funktionellen Störungen, die sich erstmalig im Stadium III mit dem Nachlassen kognitiver Funktionen und Veränderungen der Persönlichkeit klinisch äußern (Braak et al. 1999).

**Stadium V** und **VI** stellen als neokortikale Stadien die histopathologischen Endabschnitte der AD dar. Die NFT-Pathologie dehnt sich nahezu über den gesamten Neokortex aus, ist in fast allen kortikalen Arealen, insbesondere im Assoziationskortex, vorhanden und betrifft zusätzlich Teile des Hirnstamms sowie subkortikale Kerne. Jetzt sind auch makroskopische Veränderungen mit einer kortikalen Atrophie, der Zunahme der Ventrikelweite und einer verminderten Hirnmasse auffällig (Braak & Braak 1995, Braak et al. 1999, Thal & Braak 2005). Aufgrund der progredienten Neurodegeneration, die mit dem Ausmaß der Demenz korreliert, erfolgt in diesen Stadien meist die klinische Diagnosestellung (Braak et al. 1999, Jellinger KA 2001).

Die Ablagerung des A $\beta$ -Peptids in Plaques wird repräsentativ für das gesamte Gehirn anhand des medialen Temporallappens in einzelne Phasen gegliedert. Dabei nehmen die Plaques in einer Region mengenmäßig kontinuierlich zu und breiten sich gleichzeitig von dort in einer speziellen Sequenz über weitere Hirnareale aus. Als Zeichen der Progredienz der AD sind in den betroffenen Arealen zunächst vorwiegend diffuse Plaques, im Verlauf zunehmend neuritische Plaques nachweisbar (Thal & Braak 2005).

### 1.5.2.2 Stadieneinteilung des Morbus Parkinson nach Braak

Beim MP entwickeln sich die intraneuronalen Läsionen nur in bestimmten Nervenzelltypen prädisponierter Hirnareale und breiten sich in einer spezifischen Sequenz über die graue Substanz aus. Dabei scheint eine positive Korrelation von dem Ausmaß klinischer, speziell motorischer Defizite gemessen an der Hoehn- und Yahr-Skala mit den neuropathologischen Stadien nach Braak, der extrazerebralen sympathischen Denervierung und der kognitiven Beeinträchtigung zu bestehen (Hamada et al. 2003, Saiki et al. 2004). Abbildung 1.5.8 gibt eine Übersicht über das Staging des MP nach Braak.



**Abbildung 1.5-8: Stadieneinteilung des Morbus Parkinson.** A: Präsymptomatische Phase mit dem Vorhandensein von Lewy Körperchen (LB) ohne klinische Symptomatik. Ab Überschreiten der individuellen Schwelle (threshold) der neuropathologischen Veränderungen Beginn der symptomatischen Phase. Die ansteigende Diagonale entspricht der Zunahme der LB, die zunehmende Farbintensität korreliert mit der Schwere der Veränderungen in den betroffenen Hirnregionen. B: Aufsteigende pathologische Prozesse bei MP (weiße Pfeile). Die zunehmende Farbintensität korreliert mit der Schwere der neuropathologischen Veränderungen. MP: Morbus Parkinson, Presymptomatic/symptomatic phase: präsymptomatische/symptomatische Phase; stages of the PD-related path. process: Histopathologische Stadien des MP; dorsal motor X nucleus: Dorsal motorischer Vagus Kern; gain setting nuclei: Locus coeruleus; neocortex high order association: Neokortikale Assoziationsareale; neocortex primary, secondary: primärer, sekundärer Neokortex (Braak et al. 2004).

Im ZNS entstehen die pathologischen Veränderungen in zwei Regionen gleichzeitig. Im asymptomatischen **Stadium 1** sind wenige LB im dorsalen motorischen Kern des N. vagus, der Projektionen zum enterischen Nervensystem enthält, sowie im Bulbus olfactorius (BO) und im Nucleus olfactorius anterior (AON) vorhanden. Außerdem sind

LB bereits extrazerebral im enterischen Nervensystem nachweisbar (Thal et al. 2004, Braak & Del Tredici 2006).

Im **Stadium 2** nehmen die LB im motorischen Vagus Kern zu und breiten sich weiterhin präsymptomatisch in Bereiche der *Formatio reticularis*, der Raphekerne und auf den *Locus coeruleus* aus. In den ersten beiden Stadien bleibt der pathologische Prozess im ZNS neben den olfaktorischen Arealen auf den unteren Hirnstamm beschränkt (Braak et al. 2004, Braak & Del Tredici 2006).

In **Stadium 3** geht die LB-Pathologie auf das Mittel- und Vorderhirn über. Es werden die Stammganglien, insbesondere die SNpc, der Mandelkernkomplex, großzellige Kerne des basalen Vorderhirns, cholinerge pontine Kerne und die Raphekerne befallen (Braak et al. 2004, Thal et al. 2004).

Erstmalig sind in **Stadium 4** Teile der Großhirnrinde, speziell der Mesokortex des Temporallappens mit Verbindung zum entorhinalen Kortex und Hippocampus, betroffen. Die bihemispheriellen Läsionen können die Informationsübertragung und somit die kognitiven Fähigkeiten der Betroffenen beeinträchtigen. Aufgrund des Ausbreitungsmusters manifestiert sich in Stadium 3 und 4 die Erkrankung klinisch (Braak et al. 2004, Braak & Del Tredici 2006).

In den **Endstadien 5 und 6** sind die pathologischen Veränderungen in den bereits betroffenen Hirnregionen, insbesondere in der SNpc, progredient und greifen auf weitere kortikale Areale, u. a. auf die präfrontale Rinde bis zum sensorischen und motorischen Neokortex, über. Jetzt manifestiert sich klinisch das Vollbild des MP (Braak et al. 2004, Thal et al. 2004).

### **1.6 Pathogenese der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson**

Pathogenetisch wird bei der sporadischen AD und dem idiopathischen MP eine Kaskade neurotoxischer Ereignisse mit dem Resultat der fortschreitenden Neurodegeneration, die die klinischen Symptome bedingt, angenommen. Bei der AD führt diese Kaskade, in deren Zentrum die Akkumulation und Ablagerung des A $\beta$ -Peptids zu stehen scheint, zu einem progredienten Synapsen- und Neuronenverlust und in der Konsequenz zur dementiellen Entwicklung (Hardy & Higgins 1992, McLean et al. 1999, Naslund et al. 2000, Hardy & Selkoe 2002). Beim MP resultiert diese Kaskade möglicherweise aus der pathologischen Aggregation des  $\alpha$ -Synukleins und verursacht die Degeneration der

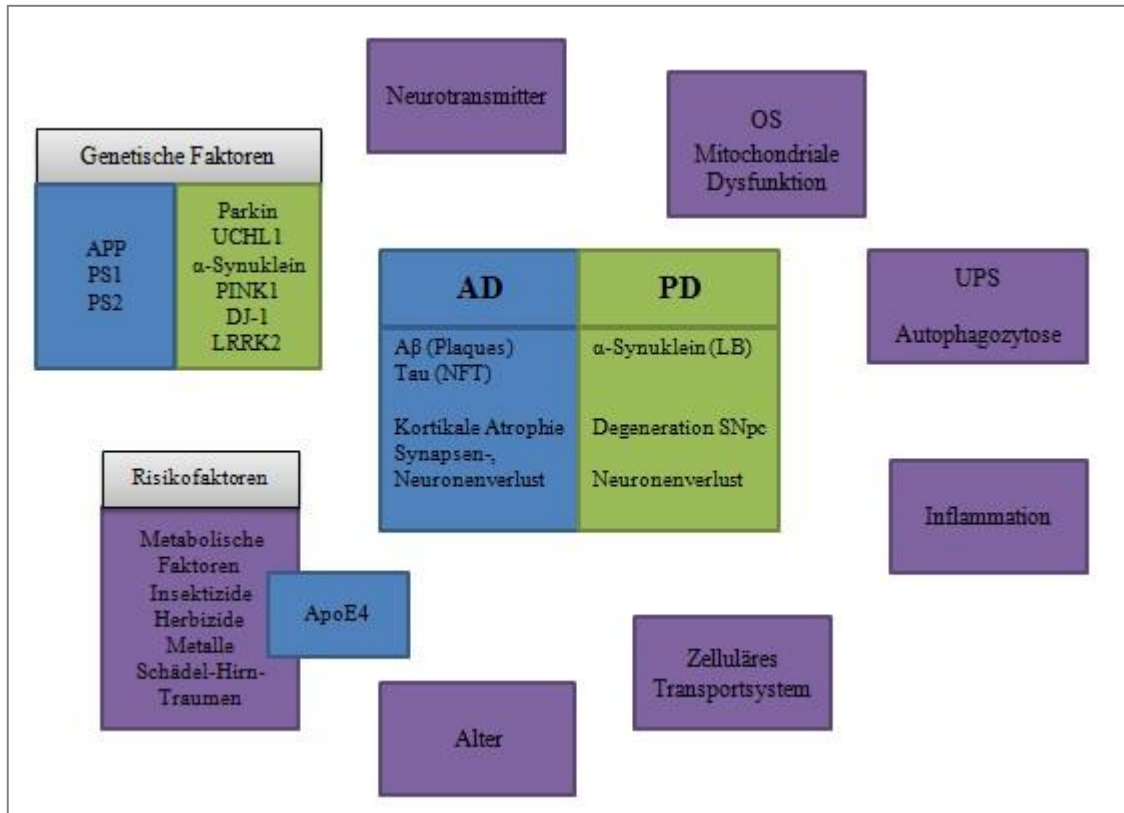
dopaminergen Neurone und anderer Hirnregionen, die die typischen motorischen Symptome hervorruft (Feany & Bender 2000, Goldberg & Lansbury, Jr. 2000, Kirik et al. 2002, Maries et al. 2003, Mandel et al. 2007).

Ätiologisch wird bei beiden Krankheiten eine Kombination aus genetischen und Umwelt assoziierten Faktoren, die die degenerativen Prozesse auslösen, angenommen. Insbesondere beim MP wird ein multifaktorielles Geschehen aus einer variablen genetischen Prädisposition, u. a. mit den auch bei den familiären Formen beteiligten Genen, und dem Zusammenwirken von Endo- und Exotoxinen diskutiert (Gille & Reichmann 2005, Mandel et al. 2007).

Gemeinsame oder ähnliche Veränderungen auf neuronaler und biochemischer Ebene, die Assoziation zu bestimmten Risikofaktoren und klinische Überschneidungen der AD und des MP lassen annehmen, dass partiell gleiche oder zumindest ähnliche pathophysiologische Prozesse bei beiden Erkrankungen ablaufen. In unterschiedlicher Gewichtung scheinen an der Pathogenese beider Erkrankungen oxidativer Stress (OS), mitochondriale Dysfunktion, die Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen, das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), Autophagozytose-, Inflammations- und Apoptosevorgänge, Veränderungen von Enzymaktivitäten, des zellulären Milieus und des Elektrolythaushaltes, Störungen des Zytoskeletts, des Neurotransmittersystems und von Transportvorgängen beteiligt zu sein (Schulz & Falkenburger 2004, Facheris et al. 2004, Haass & Selkoe 2007, Egert et al. 2007). Der Ursprung dieser pathologischen Veränderungen ist meist unbekannt, sie scheinen aber zum Progress der Neurodegeneration beitragen zu können (Drzezga 2008).

Die initialen Mechanismen sowie der Ablauf der Vorgänge, die schließlich zum Neuronenuntergang führen und die Art der Verknüpfung genetischer und anderer Faktoren bei beiden Erkrankungen sind bislang nicht bekannt. Schnittpunkte als auch mögliche gemeinsame Strecken sind daher Bestandteil vielfältigster Studien.

Abbildung 1.6.1 stellt die an der Pathogenese der AD und des MP beteiligten Faktoren in einer Übersicht dar.



**Abbildung 1.6-1: Übersicht zur Pathogenese der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson.** Im Zentrum beider Erkrankungen steht die Fehlfaltung und pathologische Aggregation von Proteinen, bei der AD Aβ in Plaques und Tau als Neurofibrillenbündel (NFT), beim MP α-Synuklein in Lewy Körperchen (LB). Pathogenetische Faktoren bei der AD sind blau, bei MP grün markiert. Violett kennzeichnet gemeinsame Faktoren der AD und des MP. AD: Alzheimer Demenz, ApoE4: Apolipoprotein E ε4-Allel, APP: Amyloid β (A4) precursor Protein, LRRK2: leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2, MP: Morbus Parkinson, OS: Oxidativer Stress, PINK1: PTEN-induced putative kinase-1, PS: Präsenilin, SNpc: Substantia nigra pars compacta, Uchl: Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1, UPS: Ubiquitin-Proteasom-System.

## 1.7 Schnittpunkte der Pathogenese der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson

### 1.7.1 Das Alter

Das Alter gilt als einer der wichtigsten Risikofaktoren, an der AD oder dem MP zu erkranken (Van Den Eeden et al. 2003, von Bernhardt et al. 2010).

Während des normalen Alterns treten vielfältige Veränderungen im zellulären Stoffwechsel auf, die sich u. a. in einer veränderten Genexpression, zunehmenden DNA-Schädigung (DNA, Desoxyribonukleinsäure) und vermehrtem OS äußern. Die Akkumulation freier Radikale treibt die Alterungsprozesse weiter voran. Im ZNS

nehmen in geringem Ausmaß die Synapsendichte und das neuronale Volumen ab, die Funktion bestimmter Enzyme, z. B. zur Synthese von Neurotransmittern, ist reduziert. Zudem werden in geringem Maße inflammatorische Prozesse aktiviert. Einige dieser Veränderungen, insbesondere die Abnahme des zerebralen Volumens, sind bei neurodegenerativen Krankheiten viel ausgeprägter. Die Prozesse des Alterns könnten möglicherweise allein, im Zusammenspiel oder assoziiert mit anderen Faktoren die neuronale Integrität stören und das Auftreten oder das Fortschreiten neurodegenerativer Erkrankungen begünstigen (von Bernhardt et al. 2010).

### 1.7.2 Oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion

OS bezeichnet die Schädigung von Zellsystemen durch Sauerstoff, reaktive oxidative Spezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS). OS entsteht, wenn die physiologische Produktion von ROS im Stoffwechsel die Kapazität der zelleigenen antioxidativen Systeme übersteigt.

Zu den ROS gehören u. a. Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und die hoch reaktiven freien Radikale, wie das Superoxid-Radikal-Anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) oder das Hydroxyl-Radikal ( $\text{OH}^-$ ), zu den RNS Stickstoffmonoxid (NO) oder Peroxynitrit.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , das eigentlich enzymatisch zu Wasser und Sauerstoff zerlegt und unschädlich wird, kann in der durch Eisen katalysierten Fenton-Reaktion zu  $\text{OH}^-$  umgewandelt werden. Peroxynitrit entsteht durch die Reaktion von NO mit  $\bullet\text{O}_2^-$  (Fahn & Sulzer 2004).

Physiologisch werden ROS und RNS hauptsächlich in den Mitochondrien an der Atmungskette aus Sauerstoff, zudem durch eine Vielzahl von Enzymen (Gibson & Shi 2010) oder bei inflammatorischen Prozessen produziert (Valko et al. 2007). Sie besitzen physiologische Funktionen bei der Signalweiterleitung, in Stoffwechselwegen (u. a. bei der Modifikation von Transportern und Rezeptoren) und bei der Induktion von Apoptose. Zum anderen haben ROS viele schädliche Effekte, z. B. kann ihre oxidative Schädigung zellulärer Strukturen den Zelltod durch Apoptose oder Nekrose einleiten (Fahn & Sulzer 2004, Valko et al. 2007).

Mit dem Alter oder bei Erkrankungen wird das Gleichgewicht aus Bildung und Abbau der ROS beeinträchtigt, OS nimmt zu. Die Prozesse des normalen Alterns, die das

Gehirn für neuronale Schädigungen anfällig machen, scheinen bei neurodegenerativen Erkrankungen stärker ausgeprägt zu sein (Lotharius & Brundin 2002, Valko et al. 2007). Es gibt vielfältige Hinweise, dass OS an der Pathogenese der AD und des MP beteiligt ist. Die oxidative Schädigung der Neurone scheint dabei zwar zum Progress der degenerativen Prozesse beitragen zu können, ob sie einen kausalen oder sekundären Faktor darstellt, ist aber nicht geklärt (Koutsilieri et al. 2002, Moreira et al. 2005, Swerdlow et al. 2010).

Nigrale dopaminerge Neurone sind bereits unter physiologischen Bedingungen aufgrund ihres DA-Metabolismus in besonderem Maße OS ausgesetzt. Mit dem Alter nimmt zudem die Aktivität der Monoaminoxidase (MAO), also der DA-Umsatz, und so OS zu. Beim MP könnte OS also bereits früh in die Pathogenese involviert sein und zudem die neurodegenerativen Prozesse begünstigen (Koutsilieri et al. 2002).

Durch Reaktion von ROS mit Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden werden diese strukturell verändert, geschädigt und sind dann als Indikatoren für OS im Gewebe nachweisbar. Sowohl bei der AD als auch beim MP werden diese Indikatoren in den Gehirnen Betroffener gefunden, beim MP bereits in frühen Krankheitsstadien (Lyras et al. 1997, Pratico et al. 1998, Smith et al. 1998, Zhu et al. 2005, Lovell & Markesbery 2007). Bei der AD gibt es zudem Hinweise auf gesteigerten OS im Gesamtorganismus (Mecocci et al. 1998).

Auch die pathologischen Proteine, das A $\beta$  und das Tau-Protein bei der AD sowie das  $\alpha$ -Synuklein beim MP, werden mit OS in Verbindung gebracht. Zum einen scheinen diese, z. B. durch die Synthese von ROS oder über die Initiierung von oxidativen Vorgängen an Zellbestandteilen, OS erzeugen oder steigern zu können (Harris et al. 1995, Butterfield 1997, Martin et al. 2004, Tamagno et al. 2006). Zum anderen scheint OS, u. a. durch die Aktivierung der Produktion oder durch oxidative Modifikationen der pathologischen Proteine, deren Aggregation und Akkumulation zu erhöhen (Schulz & Falkenburger 2004, Gille & Reichmann 2005, Zhu et al. 2005). Außerdem kann OS den Abbau der Proteine reduzieren. Beim MP wird in Zusammenhang mit OS eine funktionelle Beeinträchtigung des UPS beschrieben (Martin et al. 2004).

Bei der AD und dem MP gibt es zudem Hinweise auf eine Dysfunktion der Mitochondrien. Diese sind aufgrund ihrer ATP-Produktion (ATP, Adenosintriphosphat) über die aus fünf Komplexen bestehende Atmungskette die Energielieferanten der Zelle, wovon Neurone in besonderem Maße abhängig sind.

Die Hemmung der Atmungskettenkomplexe minimiert die zelluläre Energiesynthese und steigert die Bildung von ROS und RNS. In synaptischen Mitochondrien führt bereits eine etwa 25%ige Hemmung von Komplex I zu einer signifikanten Minderung der ATP-Synthese, zu einem Anstieg von ROS kommt es bereits bei einer Hemmung um etwa 15 bis 20 %. Zudem sind funktionell eingeschränkte Mitochondrien empfindlicher gegenüber der Exposition mit ROS und RNS, die wiederum die Reaktionen an der Atmungskette und die Komplexe selbst inhibieren. Die geschädigten Mitochondrien können dann Kaskaden einleiten, die zum Zelltod führen (Rhein & Eckert 2007).

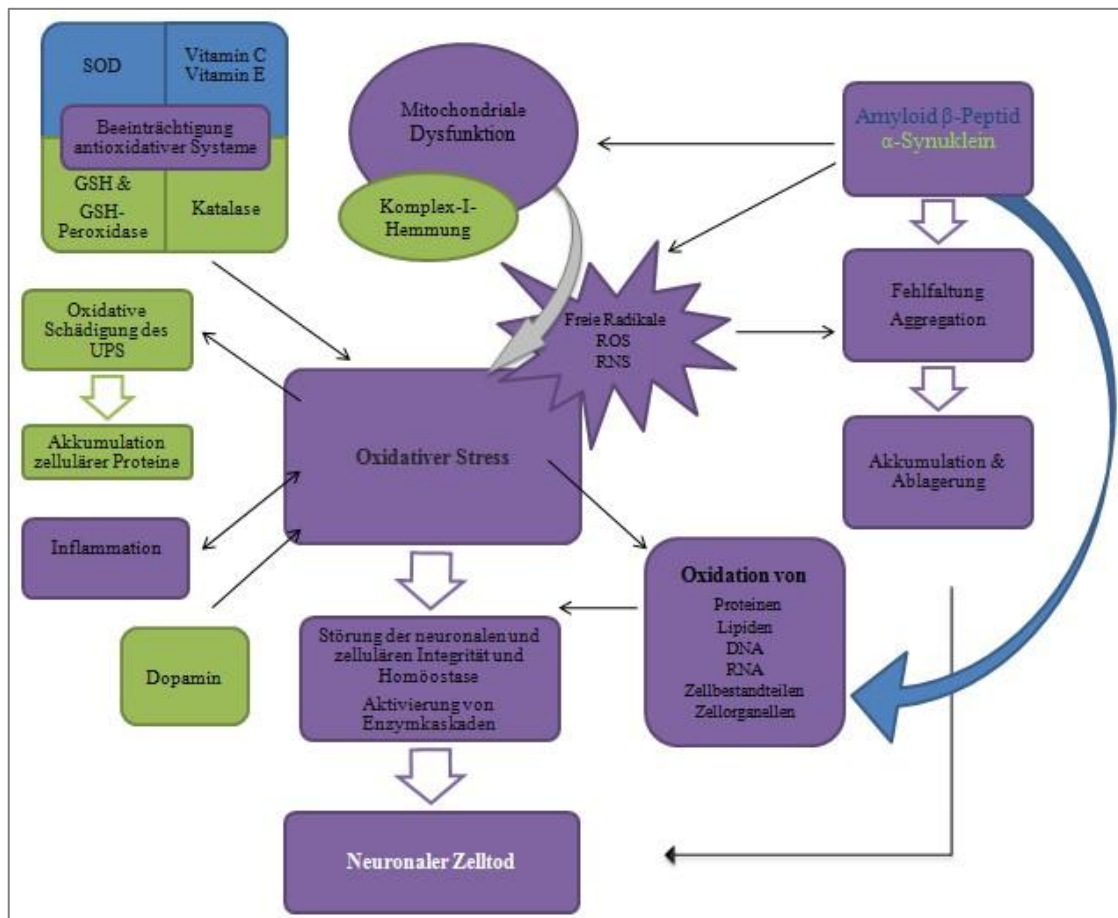
In der SNpc von bis zu 80 % der Patienten mit idiopathischem MP besteht eine selektive Komplex I-Hemmung um etwa 20 bis 40 % (Janetzky et al. 1994, Reichmann & Janetzky 2000). In Kombination mit dem in der SN durch den DA-Metabolismus herrschenden prooxidativen Milieu könnte so OS potenziert und der Untergang von Neuronen initiiert werden (Gille & Reichmann 2005).

Bei der AD werden strukturelle Veränderungen der Mitochondrien, Funktionsstörungen der Atmungskette und ihrer Enzyme (z. B.  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase, Cytochrom C Oxidase) beschrieben, für die u. a. A $\beta$  und das Tau-Protein verantwortlich sein sollen (Parker, Jr. et al. 1990, David et al. 2005, Rhein & Eckert 2007).

Die antioxidativen Systeme der Zelle umfassen u. a. die Katalase, reduziertes Glutathion (GSH), die Superoxid-Dismutase (SOD) und die GSH-Peroxidase (Gille & Reichmann 2005). Bei beiden Erkrankungen werden enzymatische Funktionsminderungen, z. B. der SOD bei der AD sowie der GSH, GSH-Peroxidase und Katalase beim MP, und bei der AD zusätzlich eine Reduktion der Antioxidantien Vitamin C und E beschrieben (Mecocci et al. 2002, Rinaldi et al. 2003, Gerlach M. et al. 2007).

Abbildung 1.7.1 zeigt eine Übersicht über die Mechanismen und Interaktionen bei der AD und dem MP, die bei OS auftreten bzw. OS initiieren können.





**Abbildung 1.7-1: Neuronale Mechanismen und Interaktionen unter oxidativem Stress bei der Alzheimer Demenz und dem Morbus Parkinson.** Die farbige Hinterlegung kennzeichnet neuronale Prozesse bzw. zelluläre Substanzen, die mit OS und den neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind. Grün stellt diese entsprechend beim MP, blau bei der AD dar. Violett entspricht neuronalen Veränderungen, die mit beiden Erkrankungen assoziiert sind. Die Zuordnung der pathologischen Proteine erfolgt farblich:  $\beta$ -Amyloid Peptid (AD) blau,  $\alpha$ -Synuklein-Protein (MP) grün. Der blaue Pfeil kennzeichnet die Prozesse, die durch A $\beta$  realisiert werden. AD: Alzheimer Erkrankung, DA: Dopamin, GSH: Glutathion, MP: Morbus Parkinson, ROS: reaktive oxidative Spezies, RNS: reaktive Stickstoffspezies, SOD: Superoxid-Dismutase, UPS-Ubiquitin-Proteasom-System.

### 1.7.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das UPS dient neben der Regulation biologischer Vorgänge, wie dem Zellzyklus, der Modulation von Rezeptoren und der Antigenpräsentation, dem Abbau inkorrekt gefalteter, beschädigter oder alter Proteine. Diese werden mit Hilfe des als Ubiquitin-Ligase fungierenden Parkins mit Ubiquitin markiert, als Polyubiquitinketten zum Proteasom transportiert und dort energieabhängig abgebaut. Ubiquitin wird anschließend enzymatisch aus den Polyubiquitinketten wieder zur Verfügung gestellt (Giasson & Lee 2003).

Die Leistungsfähigkeit des UPS kann durch Inhibierung seiner Komponenten oder durch ein Energiedefizit, z. B. bei einer eingeschränkten mitochondrialen Aktivität, beeinträchtigt werden. Die dann vermindert abgebauten Proteine akkumulieren, aggregieren und schädigen wiederum das UPS. Das Proteasom scheint Proteinaggregate zudem nicht effektiv abbauen zu können. Eine zelluläre Proteinüberladung kann durch Aktivierung bestimmter Signalwege den Zelltod einleiten (Shastry 2001, Eriksen et al. 2005).

Tierexperimentell wurde nachgewiesen, dass Funktionsstörungen des Proteasoms die Integrität dopaminerger Neurone beeinträchtigen und sowohl morphologisch als auch klinisch Parkinson Symptome hervorrufen können. In der Pathogenese des MP besteht daher möglicherweise eine besondere Assoziation zum UPS. Beim familiären MP scheint eine funktionelle Beeinträchtigung des UPS durch die Kenntnis der Mutationen im Parkin- oder Uchl1-Gen (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1) sicher zu sein (McNaught & Jenner 2001). In der SN von Patienten mit dem idiopathischen MP ist eine verminderte Proteasomaktivität bekannt. Dies lässt annehmen, dass auch bei der sporadischen Form das UPS an den neurodegenerativen Vorgängen beteiligt ist (McNaught et al. 2004).

Bei der AD werden ebenfalls funktionelle Beeinträchtigungen des UPS in Verbindung mit der Neurodegeneration vermutet (Song & Jung 2004).

Es gibt Hinweise, dass die Proteine A $\beta$ , Tau und  $\alpha$ -Synuklein das Proteasom inhibieren und für Aktivitätsminderungen des UPS bei der AD und dem MP verantwortlich sein könnten. Bei beiden Erkrankungen werden bestätigend Ubiquitin oder ubiquitinierte Proteine in den pathologischen Ablagerungen, den LB oder den A $\beta$ -Plaques, gefunden (Giasson & Lee 2003, Song & Jung 2004).

Ob die bekannten Beeinträchtigungen des UPS in der Pathogenese der AD und des MP kausal relevant sind oder erst im Verlauf der Erkrankungen auftreten, ist bislang jedoch nicht geklärt.

### **1.7.4 Inflammation**

Die Gliazellen, zu denen die Astrozyten und die Mikrogliazellen gehören, als nicht neuronale Zellen des Nervensystems fungieren als Stützgerüst für die Neurone, bei der

Regulation des Stofftransports und des Flüssigkeitshaushaltes zur Aufrechterhaltung der zerebralen Homöostase und bei der Signaltransduktion. Die Mikroglia macht etwa 10 % der Zellen im menschlichen Nervensystem aus, sie dient vorwiegend der Immunabwehr, wird aber auch bei neurodegenerativen und anderen neurologischen Erkrankungen, z. B. bei Schlaganfällen oder zerebralen Tumoren, aktiviert. Aktivierte Mikrogliazellen initiieren inflammatorische Prozesse, die eine gesteigerte Expression von MHC-Molekülen (engl. major histocompatibility complex), Zyto- und Chemokinen, Komplementfaktoren, die Freisetzung von RNS und ROS bewirken, neuronale Funktionsstörungen und den Zelltod induzieren können (Sastre et al. 2006). Reaktive Astrozyten produzieren nach ihrer Aktivierung ebenfalls proinflammatorische Moleküle (Akiyama et al. 2000).

Als Zeichen inflammatorischer Vorgänge bei der Neurodegeneration finden sich in experimentellen Modellen und bei Patienten mit AD und MP aktivierte MHC-II positive Mikrogliazellen und erhöhte Mengen inflammatorischer Mediatoren in den am stärksten betroffenen Hirnarealen. Bei der AD sind sie vorwiegend im Bereich der senilen Plaques und NFT, beim MP um dystrophe Neuriten und dopaminerge Neurone in der SN und im Striatum lokalisiert (McGeer et al. 1988, Sheng et al. 1998, Nagatsu & Sawada 2005). Ob die Inflammation Ursache oder Resultat der pathologischen zerebralen Prozesse ist, ist bei beiden Krankheiten bislang nicht sicher geklärt.

Bei der AD wird die Bedeutung der durch die Mikrogliaaktivierung vermittelten Entzündungsreaktion kontrovers diskutiert, meist werden ihr toxische Effekte auf die umgebenden Zellen und Neurone zugeschrieben (Sastre et al. 2006). Die Lokalisation der inflammatorischen Prozesse und ihr frühes Auftreten bei der AD führte zu der Hypothese, dass das fibrilläre A $\beta$  oder seine Intermediärformen in den Plaques den Ursprung dieser Entzündung darstellen könnten (Sastre et al. 2006, Eikelenboom et al. 2010). Die NFT scheinen allerdings ebenfalls Mikrogliazellen zu aktivieren (Akiyama et al. 2000).

Astrozyten und Mikrogliazellen scheinen bei der AD aber auch protektiv zu wirken, indem sie A $\beta$ -Ablagerungen in Plaques phagozytieren und abbauen (Akiyama et al. 2000). Astrozyten besitzen zudem eine Barrierefunktion zwischen den A $\beta$ -Deposit

und Neuronen (Sastre et al. 2006). Die Phagozytose des in den Plaques deponierten A $\beta$  ist aufgrund seiner fibrillären Struktur möglicherweise erschwert, so dass die reaktive Gliose ein zur Phagozytose und zum enzymatischem Abbau alternativer Versuch der A $\beta$ -Elimination sein könnte, der durch die Freisetzung toxischer Substanzen in der Folge Neurodegeneration bewirken könnte (Walker & Lue 2005).

Beim MP wird gestützt durch das MPTP-Modell (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin) eine vorwiegend degenerative Rolle der aktivierten Mikrogliazellen angenommen (Teismann & Schulz 2004, Logroscino 2005). Auch beim MP wird allerdings eine Umkehr möglicherweise anfänglich protektiver Gliaeffekte im Krankheitsverlauf diskutiert (Sawada et al. 2006). Die bei MP nur gering ausgeprägte Astrozytenproliferation soll hingegen protektiv wirken, da Astrozyten über die MAO-B und COMT (Catecholamin-O-Methyl-Transferase) DA abbauen, ROS und RNS eliminieren und so den in der SN erhöhten oxidativen Stress reduzieren (Teismann & Schulz 2004).

### **1.8 Risikofaktoren neurodegenerativer Erkrankungen**

Verschiedene Risikofaktoren, eine neurodegenerative Erkrankung zu entwickeln, sind bekannt. Die häufigsten sind das Alter und genetische Polymorphismen (Strittmatter et al. 1993, Van Den Eeden et al. 2003, Mandel et al. 2007, von Bernhardt et al. 2010). Zudem werden u. a. Geschlecht, Sozialstatus, Rauchen, OS, Hirntraumata, Infektionen, Diabetes mellitus, andere metabolische Störungen und die Exposition gegenüber Chemikalien diskutiert (Stern 1991, Brown et al. 2005).

#### **1.8.1 Risikofaktoren der Alzheimer Demenz**

Die neben dem Alter am besten dokumentierten Risikofaktoren der sporadischen AD sind eine familiäre Belastung (Fratiglioni et al. 1993, Raber et al. 2004) und das Down Syndrom (Brown et al. 2005). Als potentielle Risikofaktoren werden auch metabolische Faktoren, insbesondere ein erhöhter Cholesterinspiegel und Störungen des Insulinstoffwechsels, diskutiert (Tseng et al. 2004). Zudem dokumentieren einige epidemiologische Studien Umweltfaktoren, z. B. bestimmte Pestizide und die zerebrale

Belastung mit Metallen (z. B. Aluminium, Zink, Eisen), als Risikofaktoren der AD (Brown et al. 2005, Mandel et al. 2008).

Gene mit Assoziation zur bzw. einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer Erkrankung gelten als Suszeptibilitätsgene. Bei der sporadischen AD scheinen mehr als 20 Gene über die Beeinflussung des APP- und A $\beta$ -Stoffwechsels, der Tau-Funktion, von Signal- und Transportprozessen als Suszeptibilitätsgene zu wirken (Bertram & Tanzi 2008).

Das Apolipoprotein E,  $\epsilon$ 4-Allel (ApoE4) ist der bedeutendste genetische Risikofaktor der AD (Saunders et al. 1993, Strittmatter et al. 1993). Das ApoE, das im menschlichen Stoffwechsel als Transportprotein für Lipide im Blut wirkt, wird im ZNS vorwiegend von Astrozyten synthetisiert und ist dort auch an der Synaptogenese sowie an Wachstums- und Regenerationsprozessen beteiligt (Mahley 1988, Strittmatter et al. 1993). Die drei Isoformen des ApoE (ApoE2 bis ApoE4) werden durch die drei Allele  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 und  $\epsilon$ 4 desselben Gens kodiert.

Das  $\epsilon$ 4-Allel ist ein normaler Polymorphismus des Proteins, der das Risiko, an den spät beginnenden Formen der sporadischen und familiären AD zu erkranken, stark erhöht (Saunders et al. 1993, Strittmatter et al. 1993, Raber et al. 2004). Zudem senkt es das Erkrankungsalter. Dabei ist sein Einfluss von der Anzahl der  $\epsilon$ 4-Allele abhängig und am stärksten bei Homozygotie ausgeprägt (Corder et al. 1993, Locke et al. 1995).

Das  $\epsilon$ 2-Allel hingegen scheint vor der AD zu schützen (Corder et al. 1994, Locke et al. 1995, Selkoe 1999).

Im ZNS wird ApoE bei chronischem Stress oder Verletzungen vermehrt auch durch Neurone exprimiert. Dieses ApoE kann dann auf zellulärer Ebene über die Schädigung des Zytoskeletts, der Mitochondrien und des Glukosemetabolismus die Zellintegrität beeinträchtigen (Zhong & Weisgraber 2009, Huang 2010). Des Weiteren inhibiert es die Synaptogenese und die hippocampale Neurogenese, was die in Assoziation mit dem  $\epsilon$ 4-Allel beobachteten Defizite in Gedächtnis und Lernen erklären könnte (Huang 2010).

Pathogenetisch scheint zudem die Interaktion des ApoE mit A $\beta$  eine wichtige Rolle zu spielen. Bei der AD wird ApoE4 im Bereich der extrazellulären A $\beta$ -Plaques, der intrazellulären NFT und der amyloidogen veränderten Gefäße gefunden. ApoE4 ist

dabei mit einer erhöhten Dichte der Veränderungen assoziiert, die von der Anzahl der  $\epsilon 4$  Allele abhängig zu sein scheint (Namba & Ikeda 1991, Tiraboschi et al. 2004).

### 1.8.2 Risikofaktoren des Morbus Parkinson

Das Risiko, am idiopathischen MP zu erkranken, wird sehr häufig mit dem Einfluss von Umweltfaktoren in Zusammenhang gebracht. Dabei könnten vor allem Faktoren mit langer Wirklatenz eine wichtige Rolle spielen.

Das MPTP-Modell zeigt die Potenz, den MP durch bestimmte Umweltfaktoren auszulösen. MPTP, ein Nebenprodukt der unsachgemäßen Herstellung von synthetischem Heroin, rief in den 1980er Jahren bei einigen Suchtkranken ein akutes schweres Parkinson-Syndrom hervor. Nach seiner selektiven Aufnahme in dopaminerge und andere katecholaminerge Neurone des Gehirns wird MPTP in den Mitochondrien durch die MAO zu seinem aktiven Metaboliten MPP<sup>+</sup> (1-Methyl-4-Phenylpyridin) umgewandelt und inhibiert Komplex I der Atmungskette. Nach der Aufnahme in dopaminerge Vesikel durch den VMAT2 (vesicular monoamine transporter 2) setzt es DA frei (Lotharius & Brundin 2002). MPTP steigert so OS. Zudem führt es zu einer erheblichen Aktivierung der Mikroglia und löst in der SN einen progredienten Zelluntergang aus (Logroscino 2005), was sich klinisch in den typischen Parkinson Symptomen äußert.

Als besondere Risikofaktoren für den MP werden einige Pestizide, Herbizide (z. B. Rotenon, Paraquat), Infektionen, Metalle (z. B. Mangan, Eisen) und bestimmte Medikamente (Neuroleptika, Antidepressiva) angesehen (Brown et al. 2005, Logroscino 2005, Mandel et al. 2008). Außerdem scheinen Personen, die in der Landwirtschaft arbeiten, häufiger zu erkranken (Gorell et al. 1998, Priyadarshi et al. 2001, Chade et al. 2006), z. T. wird ein nahezu dreifach erhöhtes Risiko angegeben (Gorell et al. 1998). Dieser Zusammenhang wird jedoch nicht in allen Untersuchungen bestätigt (Firestone et al. 2010).

Aufgrund einiger epidemiologischer Studien wird ein protektiver Effekt von Kaffeeconsum und Rauchen auf die Entwicklung des MP diskutiert (Logroscino 2005).

## 1.9 Genetik der Alzheimer Demenz und des Morbus Parkinson

### 1.9.1 Genetische Faktoren der Alzheimer Demenz

Krankheitsauslösend bei der FAD sind Mutationen in drei Genen, dem APP (Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) precursor Protein) (Goate 2006) sowie den Genen für Präsenilin 1 (PS1) (Sherrington et al. 1995) und Präsenilin 2 (PS2) (Levy-Lahad et al. 1995, Rogaev et al. 1995), die eine gesteigerte Produktion des A $\beta$ -Peptids zur Folge haben.

Aktuell sind 32 pathogene Mutationen im APP-Gen, 185 Mutationen im PS1-Gen und 13 Mutationen im PS2-Gen bekannt (AD & FDMD 2012).

Das Gen des APP, welches das Vorläuferprotein des A $\beta$ -Peptids ist, liegt auf Chromosom 21. Die Mutationen im APP verursachen mit weniger als 0,1 % den geringsten Anteil der FAD (Selkoe 2000, Bettens et al. 2010).

Die bekannten Punktmutationen im APP-Gen, die sich entweder in der A $\beta$  kodierenden Region befinden oder die Schnittstellen der  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Sekretasen flankieren, steigern die A $\beta$ -Synthese erheblich (Hardy & Selkoe 2002, Finckh 2006) und gehen möglicherweise mit einer Verschiebung zum A $\beta_{42}$  einher (Schellenberg 1995). Mutationen innerhalb der A $\beta$ -Sequenz fördern die amyloidogenen Eigenschaften des A $\beta$ -Peptids (Haass 2004).

Mutationen in der Promoterregion erhöhen die APP-Expression (Theuns et al. 2006).

Die autosomal dominant vererbten Duplikationen des APP-Gens bedingen eine Form der EOAD, die häufig mit einer erheblichen Amyloidangiopathie einhergeht (Rovelet-Lecrux et al. 2006, Sleegers et al. 2006).

Bei der Trisomie 21 (Down-Syndrom) führt die erhöhte Gendosis zu einer Überexpression des APP und einer verstärkten A $\beta_{42}$ -Produktion. Dies äußert sich pathophysiologisch in der Ablagerung diffuser A $\beta_{42}$ -Plaques bereits im ersten und zweiten Lebensjahrzehnt, in der frühen Bildung neuritischer Plaques und NFT sowie mit inflammatorischen Prozessen im Gehirn; klinisch mit kognitiven Defiziten und einer dementiellen Entwicklung, die zum Teil bereits im vierten Lebensjahrzehnt beginnen (Selkoe 2000).

Die PS sind Transmembranproteine (TMP), die mit dem Nicastrin, PEN-2 (presenilin enhancer 2) und APH-1 (anterior pharynx defective 1) den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex bilden. Ähnlich dem APP werden sie in nahezu allen Zellen exprimiert und vermitteln neben der Prozessierung des APP auch die Spaltung des Notch-Rezeptors (Bettens et al. 2010). Es sind Punktmutationen, Insertionen und Deletionen der PS bekannt, die die Funktion der  $\gamma$ -Sekretase beeinträchtigen. Dies resultiert in einem erhöhten  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Verhältnis entweder durch eine gesteigerte  $A\beta_{42}$ -Produktion oder durch eine reduzierte  $A\beta_{40}$ -Synthese (Bettens et al. 2010).

### 1.9.2 Genetische Faktoren des Morbus Parkinson

In der Pathogenese des idiopathischen MP wird zunehmend eine Assoziation zu genetischen Faktoren vermutet. Veränderungen in der Expression von Genen, die bei der Signaltransduktion, inflammatorischen Prozessen, dem dopaminergen und energetischen Metabolismus, der Zytoskelettorganisation und der Proteinmodifikation mitwirken, sind bekannt. Häufig scheint die Expression von Proteinen mit Funktionen im zellulären Transport, insbesondere dem Vesikeltransport, und bei der synaptischen Übertragung verändert zu sein (Mandel et al. 2007).

Bislang sind 15 Genloci (PARK 1-15, engl. Parkinson disease, autosomal recessive) und 11 mit dem familiären MP assoziierte Gene bekannt, die autosomal dominant oder rezessiv vererbt werden. Ihre klinische Signifikanz ist jedoch umstritten. In Zwillingsstudien konnte nur eine geringe Konkordanz für die Entwicklung eines MP mit typischem Beginn nach dem 50. Lebensjahr bei Veränderungen in diesen Genen gezeigt werden. Genetische Faktoren sollen bei einem frühen Krankheitsbeginn eine entsprechend größere Bedeutung haben (Siderowf & Stern 2003).

Die Funktionen der einzelnen Gene und ihre Bedeutung für die Ätiologie der Erkrankung sind bisher nicht vollständig verstanden. Einzelne der kodierten Proteine scheinen zwar funktionell zu interagieren und könnten bestimmte pathogenetische Pfade verbinden. Die Genmutationen erklären die Pathophysiologie des MP aber nicht gänzlich. Neben der Beteiligung an der Genese der familiären Formen wird auch das potentielle Mitwirken von Mutationen dieser Gene an der Entwicklung des idiopathischen MP diskutiert. (Hatano et al. 2009).



Eine Auswahl der mit dem hereditären MP assoziierten Gene wird im Folgenden beschrieben.

PARK1, das  $\alpha$ -Synuklein-Gen auf Chromosom 4, wird autosomal dominant vererbt. Drei Mutationen, die mit einem frühen Krankheitsbeginn, einer raschen Progression, kognitiven und vegetativen Störungen einhergehen, sind bekannt. Es sind 12 Familien mit einer Alanin53Threonin Substitution (Polymeropoulos et al. 1997), eine Familie mit einer Glutamin46Lysin (E46K) Mutation (Zarranz et al. 2004) und eine Familie mit einer Alanin30Prolin Substitution (Kruger et al. 1998) beschrieben. Zudem wurde eine autosomal dominant vererbte Triplikation entdeckt, die als PARK4 bezeichnet wird und klinisch ein idiopathisches Parkinson-Syndrom hervorruft (Singleton et al. 2003). Die Triplikation zeigt, dass neben strukturellen Veränderungen auch die gesteigerte Synthese von unverändertem  $\alpha$ -Synuklein den MP auslösen kann.

Mutationen im PARK2, dem Parkin-Gen auf Chromosom 6, werden autosomal rezessiv vererbt (Kitada et al. 1998) und führen zu einem Funktionsverlust oder zur verminderten Expression des Enzyms (Gille & Reichmann 2005). Sie bedingen bei etwa 50 % der familiären und 15 bis 20 % der sporadischen Erkrankungen einen frühen Beginn vor dem 50. Lebensjahr. Dies scheint von der Häufigkeit der Allele abzuhängen. Bei Heterozygotie ist eine asymptomatische Trägerschaft oder ein Beginn nach dem 50. Lebensjahr mit milder Symptomatik möglich (Fahn & Sulzer 2004).

Parkin fungiert als Ubiquitin E3-Ligase, die Ubiquitin an Proteine bindet, um diese für den Abbau durch das UPS zu kennzeichnen. Mutiertes Parkin verliert diese Funktion (Zhang et al. 2000). Zudem gibt es Hinweise auf antioxidative Effekte des intakten Proteins (Eriksen et al. 2005). Substrate des Parkins sind u. a.  $\alpha$ -Synuklein und Synphilin-1 (Hatano et al. 2009).

PARK6, das PINK1-Gen ([PTEN]-induced putative kinase-1) auf Chromosom 1, kodiert für eine ubiquitär exprimierte, u. a. in Mitochondrien lokalisierte, Proteinkinase. Die autosomal rezessiven Mutationen verursachen klinisch ein idiopathisches Parkinson-Syndrom mit frühem Beginn (Zhang et al. 2000, Valente et al. 2004).

Intaktes PINK1 scheint vor mitochondrialer Dysfunktion und stressinduzierter Apoptose zu schützen, es soll mit DJ-1 und Parkin interagieren (Mayeux et al. 1992).

Deletions- und Missense-Mutationen im PARK7, dem DJ-1 Gen, mit autosomal rezessiver Vererbung verursachen etwa 1 bis 2 % der Erkrankungen mit sehr frühem Krankheitsbeginn, langsamer Progression und gutem Ansprechen auf L-Dopa (Bonifati et al. 2003). DJ-1 ist vorwiegend in der Glia lokalisiert. Es scheint physiologisch Mitochondrien vor OS zu schützen und mit zytosolischer RNA (Ribonukleinsäure), dem Parkin und nukleären Transkriptionsfaktoren zu interagieren (Hatano et al. 2009). In der Funktion als Chaperon kann es die Proteinfaltung kontrollieren und die Aggregation ungefalteter Proteinketten verhindern (Gille & Reichmann 2005).

Mutationen in PARK8, dem LRRK2-Gen (Leucine-rich repeat kinase-2, Dardarin) auf Chromosom 12, scheinen familiäre und sporadische Formen des MP mit spätem Beginn und gutem Ansprechen auf L-Dopa zu verursachen (Paisan-Ruiz et al. 2004, Di Fonzo et al. 2005). Intaktes LRRK2 besitzt eine Kinase-Aktivität, interagiert mit Zytoskelett- und Transportproteinen, es scheint im zellulären Transportsystem und bei Signalwegen zu fungieren (Hatano et al. 2009).

### **1.10 Aufgaben- und Zielstellung**

Perspektivisch wird aufgrund der steigenden Lebenserwartung in der westlichen Welt der Anteil der Bevölkerung, der eine neurodegenerative Erkrankung entwickelt, deutlich zunehmen (Jellinger KA 2005, Bickel 2008, Thies & Bleiler 2011). Die AD und der MP sind die häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen (Jellinger KA 2005). Sie führen zu schwerer körperlicher oder kognitiver Behinderung, zu Pflegebedürftigkeit und meist über Komplikationen zum Tod der Betroffenen. Ihr langer Verlauf stellt nicht nur für die Betroffenen und Angehörigen sondern auch für das Gesundheitssystem eine enorme Belastung dar.

Die Krankheitsprogression, die Ausbildung der klinischen Vollbilder und damit die Komplikationsraten, die Notwendigkeit von Pflege und stationären Behandlungen könnten durch eine frühe, effektive, z. B. medikamentöse, Therapie reduziert werden und den Patienten zu mehr Lebensqualität verhelfen. Beim MP sind verschiedene auch

über Jahre effektive Therapiestrategien vorhanden. Diese haben aber z. T. spät auftretende, erhebliche Nebenwirkungen oder können im Verlauf der Erkrankung ihre Wirkung verlieren (Poewe 2009). Bei der AD sind die medikamentösen Optionen bisher limitiert (Ballard et al. 2011).

Da die ätiologischen Mechanismen der meisten neurodegenerativen Krankheiten bisher im Einzelnen nicht bekannt sind und zudem phänotypische Überschneidungen, z. B. der AD oder des MP mit der LBD, auftreten, sind trotz vorhandener diagnostischer Leitlinien die Möglichkeiten einer eindeutigen Diagnosestellung eingeschränkt. Häufig ist dies erst postmortal möglich (Kretzschmar & Neumann 2000, Jellinger KA 2001). Um eine Therapie beim Auftreten der ersten klinischen Symptome, in der Prodromalphase oder sogar noch eher beginnen zu können, also eine Voraussage der Erkrankungen zu ermöglichen, ist aber eine sensitive und validierte Frühdiagnostik nötig.

Die Messung von bestimmten biochemischen oder molekularen Größen, sogenannten Biomarkern, dient der Abschätzung des Erkrankungsrisikos, der Diagnosestellung und Abgrenzung gegenüber Differentialdiagnosen, der Bestimmung des Schweregrades einer Krankheit und der Ermittlung der therapeutischen Effektivität. Bislang gibt es für Erkrankungen mit komplexem Hintergrund, wie sie die AD und der MP sind, nur wenige Biomarker. Dies ist durch die Heterogenität der klinischen Bilder und durch ihre multifaktorielle Ätiologie zu erklären (Scharnagl et al. 2008, Nicotera & Hampel 2011, Mattsson 2011).

Immer häufiger werden genetische Faktoren, nicht nur bei den familiären sondern auch bei den sporadischen Formen, in Zusammenhang mit der Pathogenese der AD und des MP gebracht (Grünblatt et al. 2007). Veränderungen der Expression von Genen mit Assoziation zu den Erkrankungen könnten als Biomarker dienen und über ihre Bestimmung aus dem Blut oder Liquor cerebrospinalis diagnostisch verwendet werden. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war also die Bestimmung der Expressionsprofile von Genen mit möglicher Assoziation zur AD, zum MP bzw. zu beiden Erkrankungen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe, um mögliche Gene, die als Biomarker der Erkrankungen fungieren könnten, herauszufiltern.

Dafür wurden mittels Real-Time Polymerasekettenreaktion 44 Gene untersucht. Zuvor war eine Analyse der Expressionsprofile von 44760 Genen bei Patienten mit der AD, dem MP und gesunden Probanden in verschiedenen Hirnregionen mit dem Affymetrix Gene Chip® Microarray durchgeführt und bei diesen Genen krankheitsassoziiert Veränderungen detektiert worden (Grünblatt et al. 2007).

Pathogenetisch weisen die AD und der MP einige Gemeinsamkeiten auf. Zu diesen gehören u. a. die Fehlfaltung bestimmter Proteine, OS als auch der Einfluss genetischer Faktoren (Facheris et al. 2004, Schulz & Falkenburger 2004, Haass & Selkoe 2007). Bisher scheint es kaum Studien zu geben, die die Expression an beiden Erkrankungen potentiell beteiligter Gene im Vergleich untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden insbesondere die Genexpressionsprofile vergleichend untersucht, um Unterschiede oder Gemeinsamkeiten der beiden neurodegenerativen Erkrankungen aufzudecken, die Rückschlüsse auf ihre Pathogenese geben könnten.

Beim MP ist die Affektion der Stammganglien für die motorischen Symptome verantwortlich. Die Demenz bei der AD wird durch die schwere Beeinträchtigung hippocampaler Neurone verursacht. Allerdings sind bei beiden Erkrankungen auch das limbische System sowie kortikale Hirnareale betroffen (Thal & Braak 2005, Braak & Del Tredici 2006). Beim MP sind die Expressionsstudien jedoch zumeist auf die SN und das Striatum beschränkt (Grünblatt et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde also des Weiteren die Genexpression in vier verschiedenen, im Verlauf der Erkrankungen betroffenen Hirnregionen untersucht, um zu klären, ob regionale Besonderheiten in der Genexpression bestehen.

Die AD und der MP besitzen eine asymptomatische Phase, in der ohne klinische Symptome bereits pathologische Prozesse ablaufen. Diese präsymptomatische Phase kann Jahre andauern. Die klinische Manifestation der Erkrankungen tritt erst bei Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes ein (Braak et al. 2003a, Braak et al. 2004, Thal & Braak 2005, Braak et al. 2006). Danach verlaufen beide Erkrankungen weiter chronisch progredient. Um eine möglichst frühe und validierte Diagnose stellen zu können, ist die Kenntnis möglicher krankheitsspezifischer Biomarker und ihres

Verhaltens im Verlauf der Erkrankungen nötig. Insbesondere das Auffinden von Markern, die bereits in den frühesten Krankheitsstadien verändert sind, ist dabei essentiell. Die Untersuchung stadienabhängiger Veränderungen in der Expression der Gene bei der AD und dem MP, um zeitliche Verläufe aufzeigen und möglicherweise früh einsetzbare diagnostische Marker bestimmen zu können, war entsprechend ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte und Laborbedarf

Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Handschuhe und weiterer Laborbedarf wurde bei den Firmen Eppendorf, Sarstedt und Kimberly-Clark bestellt.

Folie (fluoreszenzdurchlässig)	Sarstedt, Nümbrecht
Gelelektrophoresekammer	Peqlab, Erlangen
iCycler thermocycler	Bio-Rad, München
Küvetten (UVetten)	Eppendorf, Hamburg
Micropipettierplatten (96 Well-skirted Reaction Plate)	Peqlab, Erlangen
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (Vortex MicroSpin FV-2400)	BioSan, Riga
UV-Tisch (Fluolink)	MWG-Biotech, Ebersberg
Waage, Mettler PM300	Mettler-Toledo, Giessen
Zentrifuge (1000U/min)	Heinse+Ziller, Würzburg

#### 2.1.2 Chemikalien

DEPC-H <sub>2</sub> O (DEPC, Diethylpyrocarbonat)	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fluorescein Calibration Dye (Kat.-Nr.170-8780)	Bio-Rad, München
Isopropanol	
iQ <sup>TM</sup> Supermix (Kat.-Nr. 170-8862)	Bio-Rad, München
iQ <sup>TM</sup> SYBR® Green Supermix (Kat.-Nr. 170-8882)	Bio-Rad, München
LTK-008 Desinfektionsspray	biodelta, Löhne
6xOrange Loading Dye Solution (Kat.-Nr. R0631)	Fermentas, St. Leon-Rot

O'RangeRuler™ 50bp DNA Ladder (Kat.-Nr. SM0613)	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase freies Wasser	QIAGEN, Hilden
SAKEM Agarose-Pulver	Biozym, Hessisch-Oldendorf
TAE-Puffer (Tris-Acetate-EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Terralin liquid Desinfektionsspray	Schülke und Mayr, Norderstedt
Uracil-DNA Glykosylase (Kat.-Nr. EN0361)	Fermentas, St. Leon-Rot

### 2.1.3 Kits

iScript™cDNA Synthesis Kit (Kat.-Nr. 170-8891)	Bio-Rad, München
MinElute Gel Extraction Kit (Kat.-Nr. 28604)	QIAGEN, Hilden
QuantiTect™ Probe PCR Kit (Kat.-Nr. 204343)	QIAGEN, Hilden
QuantiTect™ SYBR Green PCR Kit (Kat.-Nr. 204143)	QIAGEN, Hilden

### 2.1.4 Programme

geNorm	Universität Gent, Gent (Belgien)
iQ™ Optical System Software 3.1	Bio-Rad Laboratories, München (Dtl.)
IrfanView 4.10	Irfan Skiljan, Wien (Österreich)
Microsoft Excel, Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
StatView	SAS Institute Inc., Cary (USA)

### 2.1.5 Probenmaterial

Die Expression der in der vorliegenden Arbeit untersuchten 44 Gene wurde anhand aus dem Hirngewebe extrahierter RNA bestimmt. Dazu wurde post mortem Gewebe der Regionen Gyrus frontalis medialis (Gfm), Gyrus temporalis medialis (Gtm), Hippocampus und Kleinhirn von 31 Personen verwendet.

Die Proben der untersuchten Personen stammten von der Netherlands Brain Bank (Amsterdam, Niederlande) und vom Brain-Net Deutschland. Sämtliche Arbeitsschritte sind durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg genehmigt worden.

Die Stichprobenmenge umfasste 13 Patienten mit AD, 9 Patienten mit MP sowie 9 gesunde Personen. Die Personen waren zum Zeitpunkt ihres Todes zwischen 48 und 94 Jahre alt.

Die Alzheimer und Parkinson Patienten wurden zudem nach Krankheitsstadien in jeweils zwei Untergruppen eingeteilt, die die frühen und die späten Stadien repräsentieren. Die Zuordnung der Alzheimer Patienten erfolgte entsprechend der histopathologischen Kriterien nach Braak (Braak & Braak 1995, Braak et al. 1999, Thal & Braak 2005) in die Stadien III/IV (n = 5) und V/VI (n = 8). Die Zuteilung der Parkinson Gruppe nach der klinischen Hoehn & Yahr Klassifikation (Hoehn & Yahr 1967) erfolgte in die Stadien 2/3 (Mittel der Stadien 1 bis 4, n = 6) und in die Stadien 5/6 (Mittel der Stadien 5 und 6, n = 3). Die Falldaten sind in Tabelle 2.1-1 aufgelistet.

**Tabelle 2.1-1: Falldaten**

Fall-Nummer	Diagnose	Stadium der Krankheit	Alter	Geschlecht	PMI (Stunden)	Todesursache
RZ199	MP	3/4 (H&Y)	73	F	19	MP, Niereninsuffizienz
RZ218	MP	3/4 (H&Y)	87	F	48	Nicht angegeben
RZ47	MP	3/4 (H&Y)	75	M	24	MP, Pneumonie
083/01	MP	3 (H&Y)	70	M	22	Herzversagen
S97/130	MP	1 (H&Y)	83	F	3,75	MP, Kachexie
S99/152	MP	1 (H&Y)	79	F	5,33	MP, Nierenversagen mit kardialer Dekompensation,
<b>Mean (+/-SD)</b>		<b>2/3</b>	<b>77,8 (6,3)</b>	<b>M/F=0,5</b>	<b>20,35 (16,02)</b>	
RZ238	MP	5/6 (H&Y)	79	F	17	MP, Herzversagen
092/00	MP	5 (H&Y)	65	M	69	MP, Herzversagen
093/00	MP	5 (H&Y)	78	F	29	MP, Herzversagen
<b>Mean (+/-SD)</b>		<b>5/6</b>	<b>74 (7,8)</b>	<b>M/F=0,5</b>	<b>38 (26,6)</b>	
241/99	AD	III (B)	75	F	20	Herzversagen
RZ109	AD	III/IV (B)	89	F	24	Nicht angegeben
RZ155	AD	III (B)	85	F	24	Pneumonie



Tabelle 2.1-1: Falldaten

Fall-Nummer	Diagnose	Stadium der Krankheit	Alter	Geschlecht	PMI (Stunden)	Todesursache
RZ181	AD	IV (B)	94	M	24	Sepsis
S97/287	AD	IV (B)	75	F	3,42	Demenz, Kachexie, Pneumonie
<b>Mean (+/- SD)</b>		<b>III/IV (B)</b>	<b>83,6 (8,4)</b>	<b>M/F=0,25</b>	<b>19,08 (8,9)</b>	
007/00	AD	V (B)	85	F	17	Herz-, Lungenversagen
173/00	AD	V (B)	63	M	24	AD, Lungenversagen
S99/223	AD	V (B)	79	M	3,75	Demenz, Dehydratation, Parkinson-Syndrom
S00/183	AD	VI (B)	70	F	4,5	AD, Atemstillstand
S98/018	AD	VI (B)	75	F	3,83	Kachexie, kardiale Dekompensation
S99/317	AD	VI (B)	76	F	3,67	AD, Herzstillstand
RZ170	AD	V (B)	94	F	24	Nicht angegeben
RZ171	AD	V/VI (B)	73	F	24	Herzversagen
<b>Mean (+/- SD)</b>		<b>V/VI</b>	<b>76,9 (9,4)</b>	<b>M/F=0,33</b>	<b>13,09 (10,1)</b>	
138/00	Kontrolle		75	M		Toxisches Herzversagen
139/00	Kontrolle		85	M		Linksherzversagen
RZ133	Kontrolle		85	M		Herzversagen
RZ140	Kontrolle		88	M		Akute Niereninsuffizienz
RZ92	Kontrolle		72	M		Kammerflimmern
RZ145	Kontrolle		86	F		Niereninsuffizienz
S97/382	Kontrolle		48	M		Euthanasie, Diabetes mellitus Typ I mit sekundärem Organversagen
S98/091	Kontrolle		87	M		Herzstillstand
S98/200	Kontrolle		74	F		Intestinale Nekrose dd bei Thrombose dd Aneurysma, instabile Angina pectoris
<b>Mean (+/- SD)</b>			<b>77,8 (12,8)</b>	<b>M/F=3,5</b>	<b>19,76 (12,97)</b>	

AD: Alzheimer Demenz, B: Braak-Stadium, F: weiblich, H&Y: Hoehn & Yahr Klassifikation, M: männlich, Mean: Mittelwert, MP: Morbus Parkinson, PMI: Post mortem Intervall (Intervall bis zur Gewebeentnahme), SD: Standardabweichung.

### 2.1.6 Primer

Ein Teil der als Primer verwendeten Oligonukleotide der analysierten Gene wurde bei der Firma Invitrogen bestellt, die Sequenzen wurden mit dem Internetprogramm Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) geplant. Für die Auswahl war die Sequenzspezifität der Primer wichtig, die Primerlänge sollte 19 bis 25 Basenpaare (bp), der GC-Gehalt über 50 % und die spezifische Schmelztemperatur zwischen 55-60 °C betragen. Primer-Assays zur Analyse der weiteren Gene (QuantiTect® Primer Assays) wurden bei der Firma QIAGEN bestellt.

Tabelle 2.1-2 listet die verwendeten Primer der Firma Invitrogen auf. Tabelle 2.1-3 listet die verwendeten Primer der Firma QIAGEN auf. Tabelle 2.1-4 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primer für die Haushalts-Gene.

**Tabelle 2.1-2: Primer der Firma Invitrogen**

Gen (Primer)	Gen (Symbol)	Accession-Nummer	Vorwärtsprimer Sequenz 5'→3'	Rückwärtsprimer Sequenz 3'→5'	Produkt Größe (bp)
Transferrin	TF	NM_001063	GAGGCCACTAA GTGCCAGAG	TCAGGTATTG GGAGCCAAG	190
Catalase	CAT	NM_001752	GCCTGGGACCC AATTATCTT	GAATCTCCGCA CTTCTCCAG	203
Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 7	SLC1A7	BC000651	ACCCAACGACTT CCACTCAC	CACACACGGAG AACATTTGG	266
Human myelin basic Protein	MBP	M13577	CCGTAGTCCACT TCTTCAAG	CAACTCCGCAG GCATTAG	384
Ferritin, Heavy polypeptide 1	FTH1	NM_002032	CTGGAGCTCTAC GCCTCCTA	CACACTCCATT GCATTCAGC	232
Diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-CoA binding protein)	DBI	NM_020548	GAGCTGAAAGG GACTTCCAA	TTAGAGCCGTA TGGTGAGCA	226
Heme oxygenase (decycling) 1	HMOX1	NM_002133	GCCAGGTGACC CGAGACG	GGAAGTAGACA GGGGCGAAGAC	120
Caspase 1, Interleukin-1 beta convertase	CASP1	M87507	GTGCAGGACAA CCCAGCTAT	CGCTGTACCCC AGATTTTGT	250
Kruppel-like factor 12	KLF12	NM_016285	CAGTCGGTGCCT GTTGTCTA	AAGGTCACATT TGGCAGGTC	179
Channel Kinase 2	CHAK2	AF350881	GCACTCGCACTT CATCCTGTC	CGGCACGCCTT GTCTTGAG	130

Tabelle 2.1-2: Primer der Firma Invitrogen

Gen (Primer)	Gen (Symbol)	Accession-Nummer	Vorwärtsprimer Sequenz 5'→3'	Rückwärtsprimer Sequenz 3'→5'	Produkt Größe (bp)
Chediak-Higashi Syndrome protein short isoforme - lysosomal trafficking regulator	LYST	U84744	ATTCCGAGGTTT CTGTGGTG	GATCCTGGCTT CTGTTACAGC	194
5-Hydroxy-tryptamine (Serotonin) receptor 4	HTR4	AJ131724	GGTTTCGGTGCT GGTGATG	GCAGATGGCGT AATACCTATCC	166
Olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 3	OR10H3	NM_013938	ATGCCTGGTCAG AAC	CAGATGATGTC TTGCTC	144
Amyloid beta (A4) precursor protein	APP	BC004369	GATGCGGAGGA GGATGAC	TCTGTGGCTTCT TCGTAGG	203
Sorting Nexin 2	SNX2	NM_003100	AGAAGACTCAT CATCCACTG	AGACCAAGGCT TCAACAC	326
Tubulin, beta 2A	TUBB	NM_001069	CACCTTCATCGG CAACAG	TTCCACATCATT ACATCAACAG	375
Neugrin, neurite outgrowth associated	NGRN	AF225423	CATGGAGCAGA TACGGTATTTAC	TCTTCGGATCA CATCATCAGTG C	100
Component of oligomeric golgi complex 2	COG2	NM_007357	TCCTCACCATTG CCGCCTTC	CCCACTGCCG TTCCAATCTTC	228
Oligophrenin 1	OPHN1	NM_002547	AATTAACATCGC TGAATCC	TGAAGACAGGT GTAAGTG	220
Synapsin II	SYN2	AW139618	CATACTGCTGTC ATAGTG	GTCATACCTGT GTTACTG	223
Cytochrome b5 type A (microsomal)	CYB5A	NM_001914	GCTACTGAGAA CTTTGAGG	AATTTGAGCGC AGAAAGG	436
Monoamine oxidase A	MAOA	BT006651	TAAGGAATGAG CATGTTGATTAC G	CTTCACTTGGTC TCCGAGGA	554
Monoamine oxidase B	MAOB	M69177	ACCCAGAATCGT ATCTTGAGA	TATGATTTGCC CTTTACATGGT	101
Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	NFKB1	M58603	TGGGTATACTTC ATGTGACAAAG A	CACCAAGAGTC CAGGATTATAG C	98
Histone cluster 1, H3e	HIST1H3E	NM_003532	GGTGCGAGAAA TAGCTCAGG	GGGCAAGCTGG ATGTCCTTA	173
Histone cluster 1, H4c, member G	HIST1H4C	NM_003542	ACTTGCAAACAC CCTTCCAC	ATACAAACTTG GCGGACCTG	172

Tabelle 2.1-3: Primer der Firma QIAGEN

Gen (Primer)	Gensymbol	Accession-Nummer	Katalog Nummer
Insulin receptor substrate 4	IRS4	NM_003604	QT00209125
Beta-site APP-cleaving enzyme 1	BACE1	NM_012104	QT00084777
Glutathione S-transferase mu 1	GSTM1	NM_000561	QT00046417
Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-like 1A	GRINL1A	NM_015532	QT00065107
Glutamate receptor, ionotropic, kainate 4	GRIK4	NM_014619	QT00099897
Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 4	GRIA4	NM_000829	QT00072240
Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2	SLC1A2	NM_004171	QT00083559
Cannabinoid-receptor 2 (Macrophage)	CNR2	NM_001841	QT00012376
Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 6	CHRNA6	NM_004198	QT00017458
Glial fibrillary acidic protein	GFAP	NM_002055	QT00081151
Synaptotagmin I	SYT1	AV731490 NM_005639	QT00037597
Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 3	APBA3	AI141541	QT00075278
Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3	SLC1A3	NM_004172	QT00069874
Vacuolar protein sorting 41 homolog (S. cerevisiae)	VPS41	NM_014396	QT00028322
Vacuolar protein sorting 35 homolog (S. cerevisiae)	VPS35	NM_018206	QT00068649
Insulin-degrading enzyme	IDE	NM_004969	QT00080773
Insulin-like growth factor 1 receptor	IGF1R	NM_000875	QT00005831
Synaptotagmin IV	SYT4	NM_020783	QT00003269

Tabelle 2.1-4: Primer der Firma QIAGEN für die Haushaltsgene

Gen/Primer	Gensymbol	Accession-Nummer	Katalog Nummer
18S ribosomal 1 RNA	RRN18S1	V01270	QT00199367
Homo sapiens actin, beta	ACTB	NM_001101	QT00095431
Aminolevulinate, delta-, synthase 1	ALAS1	NM_000688	QT00073122
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	NM_002046	QT00079247
Ribosomal protein L13a	RPL13A	NM_012423	QT 00089915
Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	PPIA	NM_021130	QT00052311

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Extraktion von RNA aus Hirngewebe

Die verwendete RNA stand zu Beginn der vorliegenden Arbeit bereits zur Verfügung. Die Extraktion der RNA aus dem Hirngewebe war zuvor von einer Mitarbeiterin des Neurochemischen Labors der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Würzburg mit einem Phenol-Chloroform-Guanidinisothiocyanat-Reagenz (peqGOLD TriFast™, PeQLabGmbH, Erlangen, Deutschland) durchgeführt worden (Grünblatt et al. 2007, Jacob et al. 2007). Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -70 °C.

### 2.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und RNA-Qualität

Durch spektrophotometrische Messung wurde im ersten Arbeitsschritt die Qualität und Konzentration der RNA bestimmt. Dazu wurde die RNA mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:79 verdünnt und die Absorption (A) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

Für die Konzentrationsberechnung gilt:  $A_{260} = 1$  entspricht 44 µg/ml RNA  
 $A_{260} = 1$  entspricht 40 µg/ml DNA.

Zur Überprüfung der Reinheit bzw. der Qualität der Probe wurde zusätzlich die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen als Zeichen für das Fehlen von DNA oder Proteinresten in der RNA-Probe. Nur dann wurde die jeweilige RNA-Probe weiter verwendet.

### 2.2.3 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Für die Messung der Genexpression wurde in der vorliegenden Arbeit die vorhandene RNA mit der real-time reverse transcription PCR (RT-PCR), einer speziellen Form der Polymerasekettenreaktion (PCR), untersucht.

Bei der PCR eingesetzte Polymerasen, sogenannte DNA-Polymerasen, sind DNA-spezifisch und können RNA nicht amplifizieren. Daher muss die RNA zuerst mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase, in DNA umgeschrieben werden. Dieser Vorgang wird als reverse Transkription bezeichnet.

Die Herstellung der cDNA (c, engl. complementary) aus der RNA erfolgte mit dem „iScript cDNA Synthesis Kit“ der Firma Bio-Rad. Das Kit enthält Oligo(dT)- und random Hexamer Primer sowie die Reverse Transkriptase, eine MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transkriptase) mit einer RNase H<sup>+</sup>-Aktivität.

Bei der Verwendung des „iScript cDNA Synthesis Kit“ wird zur Produktion von cDNA nur 1 µg RNA benötigt.

Die Berechnung des einzusetzenden Volumens ( $V_{\text{Ziel}}$ ) RNA aus der Konzentration (C) der RNA geschieht wie folgt:

$$V_{\text{Ziel}} \text{ RNA } \mu\text{l} = 1000 \text{ ng/C RNA ng}/\mu\text{l}$$

Um einen Reaktionsansatz von 20 µl zu erhalten, wurden, wie in Tabelle 2.2-1 angegeben, der „iScript Reaktionsmix“ mit der „iScript Reverse Transkriptase“ und dem berechneten Volumen RNA gemischt und die Differenz mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Im Anschluss wurde entsprechend dem Reaktionsprotokoll der Reaktionsansatz inkubiert. Die gewonnene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.2-1: Reaktionsansatz für die reverse Transkription mittels „iScript cDNA Synthesis Kit“

Reaktionskomponenten	Volumen/Reaktion (µl)
„iScript Reaktionsmix“	4
„iScript Reverse Transkriptase“	1
Nuklease freies-Wasser	x
RNA (1 µg)	x (berechnet, wie o. a.)
Gesamtvolumen	20

### 2.2.4 Polymerasekettenreaktion

Die PCR, die 1983 von Kary Mullis entwickelt wurde, ist eines der sensitivsten und flexibelsten Verfahren zum Nachweis von DNA-Abschnitten mit spezifischer Sequenz in vitro. Ihr Prinzip ist die Amplifikation von DNA in einem sich stetig wiederholenden Zyklus aus drei Reaktionsschritten.

Für die Durchführung einer PCR werden mehrere Komponenten im Reaktionsansatz benötigt. Dies ist zum einen die Original-DNA, welche die zu amplifizierende Sequenz enthält und deren optimale Länge maximal 100 bp betragen sollte. Als Bausteine für den zu synthetisierenden Strang sind Desoxyribonukleotide essentiell. Nötig sind zudem die als Primer verwendeten Oligonukleotide mit einer bekannten Sequenz, die als Initiationsstellen den zu amplifizierenden Bereich auf der DNA eingrenzen und den Start für die Replikation durch die DNA-Polymerase (PM) bieten. Als PM werden oft hitzestabile sogenannte Taq-PM des *Thermus aquaticus* eingesetzt.  $Mg^{2+}$ -Ionen dienen als Kofaktor der PM und stabilisieren die Bindung der Primer an die DNA-Matrize. Spezielle Pufferlösungen (Sublime) schaffen ein optimales chemisches Milieu für die PM (Bustin 2000).

Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf ca. 95 °C der als Matrize verwendete DNA-Doppelstrang in zwei komplementäre Einzelstränge getrennt. Das Absenken der Temperatur auf ca. 55-60 °C führt zur Hybridisierung der als Primer verwendeten Oligonukleotide an den komplementären DNA-Abschnitt. Anschließend kann bei einer Temperatur von ca. 72 °C die Extension der DNA durch die PM erfolgen.

Durch den repetitiven Ablauf dieses Zyklus, ca. 30-40fach, wird die DNA exponentiell vervielfältigt und es entstehen am Ende theoretisch  $2^n$  Amplifikationsprodukte (Hoffmann-La Roche AG 2006).

Bei der konventionellen qualitativen PCR wird anschließend das Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch anhand seiner Größe identifiziert (Hoffmann-La Roche AG 2006).

### 2.2.5 Real-Time Polymerasekettenreaktion

Zur Analyse der Expression des Zielgens wurde in der vorliegenden Arbeit die real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) verwendet.

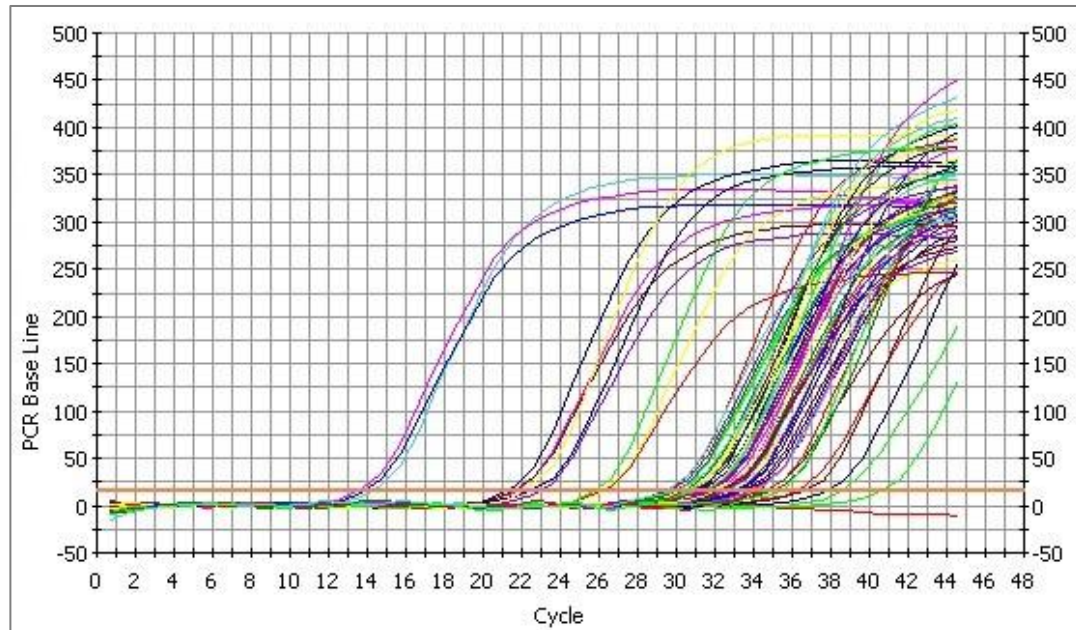
Die RT-PCR bietet die Möglichkeit, die vorhandene DNA-Menge während der PCR-Reaktion, also in Echtzeit, zu messen. Daher wird sie auch als quantitative oder Real-Time quantitative PCR bezeichnet. Die Detektion der DNA erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen am Ende jedes PCR-Zyklus, wobei das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge der amplifizierten DNA zunimmt. Im Gegensatz zur konventionellen PCR ist eine gelelektrophoretische Bestimmung der Produkte nicht nötig, wodurch die Kontaminationsgefahr der Proben verringert wird.

Zur Quantifizierung der Probenmenge wird der Ct (Schwellenwertzyklus) zur Hilfe genommen. Der Ct-Wert einer Probe ist der Schwellenwert, also der PCR-Zyklus, an dem ihre Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt (Bustin 2000).

Die Amplifikation der DNA während der RT-PCR wird in drei oder auch vier Phasen eingeteilt. In Phase 1, unterhalb des Ct, ist die Probenmenge zu gering für eine optimale Amplifikation. In Phase 2 tritt eine exponentielle Amplifikation ein. Phase 1 und 2 werden häufig als exponentielle Phase zusammengefasst. In Phase 4, der Plateauphase, tritt durch den Verbrauch der Reaktionskomponenten, die Produkthemmung und die temperaturbedingte Zerstörung der PM eine Stagnation der Nukleinsäuresynthese ein. In Phase 3, der linearen Phase oberhalb des Ct, findet durch ein ausgewogenes Verhältnis aller Reaktionskomponenten die lineare Amplifikation statt. Man spricht auch von der log linearen Phase der RT-PCR, die etwa 30 Zyklen anhält. Es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der DNA-Ausgangsmenge und dem Ct (Pfaffl 2004a, Yuan et al. 2006).



Abbildung 2.2.1 zeigt die DNA-Amplifikation einer RT-PCR der vorliegenden Arbeit.



**Abbildung 2.2-1: DNA-Amplifikation während einer Real-Time PCR**, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde. Die horizontale Linie (orange) markiert den Ct (Schwellenzyklus). Cycle: Zyklus, PCR: Polymerasekettenreaktion.

### 2.2.6 DNA-Isolierung zur Standardherstellung

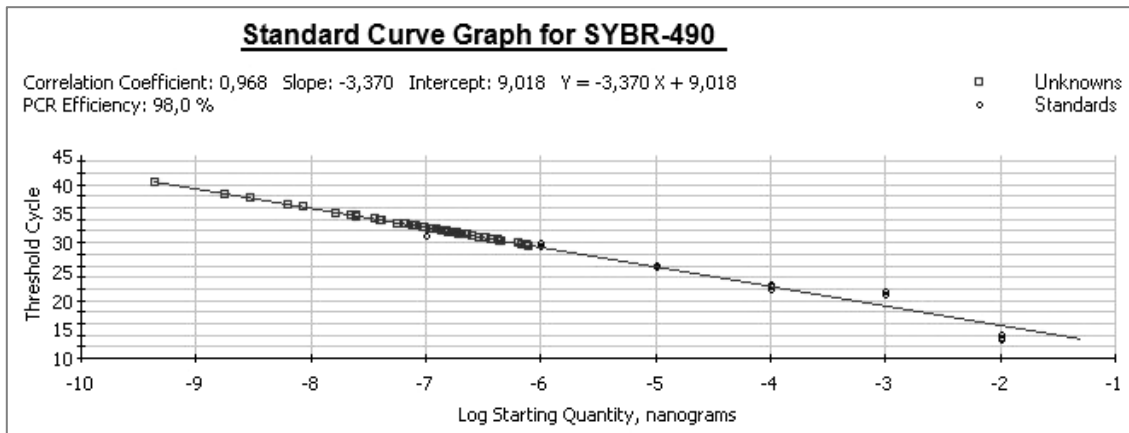
In jeder RT-PCR läuft eine Verdünnungsreihe aus Standards neben der Ziel-DNA mit. Der Einsatz von Standards bei einer RT-PCR dient der Berechnung der Effizienz der PCR sowie der Ausgangskonzentration der cDNA. Über die Standardreihe kann zudem die Qualität mehrerer RT-PCR Platten eines Gens kontrolliert werden (Larionov et al. 2005). Jede Nukleinsäure kann als Standard eingesetzt werden, sofern ihre Konzentration und Länge bekannt ist (Bustin 2000).

Durch Auftragen des Ct gegen den Logarithmus der Standardkonzentration wird eine Standardkurve erstellt. Über die Steigung (m) der Standardkurve kann die Effizienz (E) der PCR bestimmt werden:

$$\text{Effizienz } E = 10^{-1/m}$$

Die Effizienz von 100 % (E=2) entspricht der Verdopplung der Amplifikationsprodukte in jedem PCR-Zyklus (Pfaffl 2004b).

Abbildung 2.2.2 bildet die Standardkurve einer in der vorliegenden Arbeit durchgeführten RT-PCR ab.



**Abbildung 2.2-2: Standardkurve einer Real-Time PCR.** Durch Auftragen des Ct gegen den Logarithmus der Ausgangskonzentration der Standards wird die Standardkurve generiert. An dieser kann anhand der Ct-Werte der Ziel-DNA deren Ausgangskonzentration bestimmt werden. Correlation Coefficient: Korrelationskoeffizient, DNA: Desoxyribonukleinsäure, PCR: Polymerasekettenreaktion, PCR-Efficiency: PCR-Effizienz, Slope: Steigung, Threshold Cycle: Schwellenzyklus (Ct), Unknowns: „Unbekannte“ (entspricht der Ziel-DNA).

Die Herstellung der Standards für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte RT-PCR erfolgte nach dem „MinElute Gel Extraction Kit“ Protokoll der Firma QIAGEN. Dazu wurden zunächst die Primer des entsprechenden Gens durch die RT-PCR amplifiziert und mittels Gelelektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt.

Zur Herstellung des Agarosegels wurde 1,5 g Gelpulver auf 100 ml TAE-Puffer verdünnt, dann erhitzt, mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt und zum Auskühlen in einen mit einem Probentaschenkamm vorbereiteten Gelschlitten gegossen. In die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer wurde ebenfalls 5 µl Ethidiumbromid gegeben und das präparierte Agarosegel hinzugefügt. Je 20 µl Primerproben wurden, im Verhältnis 1:4, mit je 5 µl Orange Loading Dye versetzt und in die Taschen des Agarosegels gefüllt. Das Gel lief bei 120 Volt etwa 40 Minuten.

Anschließend wurde die gesuchte Bande unter UV-Kontrolle ausgeschnitten und gewogen und anhand des „MinElute Gel Extraction Kit“ Protokolls weiterverarbeitet. Das erhaltene Eluat entspricht dabei der gereinigten DNA, die in der vorliegenden Arbeit nach spektrophotometrischer Bestimmung ihrer Konzentration schrittweise von  $10^0$  (ng/µl) auf  $10^{-6}$  (ng/µl) verdünnt und in Form von Duplets oder Triplets als Standardreihe verwendet wurde.

Aus der Konzentration (C) kann auch die Kopienzahl der DNA bestimmt werden:

$$(C \text{ g}/\mu\text{l} / [\text{Länge PCR-Produkt in bp} \times 660]) \times 6.022 \times 10^{23}$$

### 2.2.7 Reaktionsansätze der Real-Time Polymerasekettenreaktion

Zur Quantifizierung des Zielgens wurden Fluoreszenzfarbstoffe, SYBR-Green- oder TaqMan-Sonden, eingesetzt. Die quantitative RT-PCR mit TaqMan-Sonden wurde mit dem „iQ™ Supermix“, bei Verwendung von SYBR-Green Fluoreszenzfarbstoff mit dem „iQ™ SYBR® Green Supermix“ durchgeführt.

Die Amplifikation des Genproduktes mittels RT-PCR erfolgte mit dem „QuantiTect™ SYBR Green PCR Kit“, die der Haushalts-Gene mit dem „QuantiTect™ Probe PCR Master Mix“. Es wurde ein Reaktionsvolumen von 25 µl entsprechend der in Tabelle 2.2-2 und 2.2-3 angegebenen Reaktionsansätze pipettiert. Die verwendete DNA-Menge betrug für die Primer-Assays 1 µl DNA pro Reaktionsansatz, für die selbst hergestellten Primer ebenfalls 1 µl DNA, in einigen Ansätzen war eine Menge von 3 µl DNA nötig.

Die cDNA wurde dafür im ersten Schritt in die Reaktionsplatte pipettiert, der Ansatz aus den restlichen Komponenten gemischt und anschließend zur cDNA pipettiert. Für jede Probe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Bei Verwendung von SYBR-Green Fluoreszenzfarbstoff wurde im Anschluss an die Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse zum Nachweis des spezifischen Genproduktes durchgeführt, bei der Anwendung von TaqMan-Sonden war diese nicht nötig. Für die Primer galten die in Tabelle 2.2-4 aufgeführten Amplifikationsparameter.

Tabelle 2.2-2: Reaktionsansätze der Real-Time PCR für Primer-Assays

Reaktionskomponenten	Volumen/Ansatz (µl)	Reaktionskomponenten	Volumen/Ansatz (µl)
QuantiTect™ SYBR Green PCR Master Mix	12,5	QuantiTect™ Probe PCR Master Mix	12,5
Primer Assay	2,5	10xQuantiTect Assay Mix	2,5
Fluorescein	0,25	Optional: UNG	0,52
RNase freies Wasser	8,75	RNase freies Wasser	7-9
cDNA-Matrize	1	cDNA-Matrize	1
Assay	x	Haushalts-Gen	x
Gesamtvolumen	25	Gesamtvolumen	25

**Tabelle 2.2-3: Reaktionsansätze der Real-Time PCR für selbst hergestellte Primer**

Reaktionskomponenten	Volumen/Ansatz (µl)	Reaktionskomponenten	Volumen/Ansatz (µl)
iQ™ SYBR® Green Supermix	12,5	iQ™ Supermix	12,5
Primer F	0,5	Primer F	0,5
Primer R	0,5	Primer R	0,5
-	-	Sonde	1
RNase freies Wasser	8,5-10,5	RNase freies Wasser	7,5-9,5
cDNA-Matrize	1-3	cDNA-Matrize	1-3
SYBR-Green	x	TaqSonde	x
Gesamtvolumen	25	Gesamtvolumen	25

**Tabelle 2.2-4: Real-Time PCR Amplifikationsparameter der verwendeten Primer**

Primername	Denaturierung		Annealing		Extension	Schmelzpunkt	Zyklen
	Temp (°C)	Dauer (sec)	Temp (°C)	Dauer (sec)	Temp/Dauer (°C/sec)	Temp (°C)	
NM_001752	95	15	62	45	84/10	88	40-45
BC000651	95	15	55,2	45	83	85,5	45
NM_001063	95	15	60	45		86,5	40
NM_003542	95	15	64	45		83,5	35-40
NM_020548	95	15	63	45		83	30-40
NM_002032	95	15	64	45		84,5	30
M87507	95	15	63	45		85,5	40
NM_016285	95	15	64	45		86	38
NM_003532	95	15	63	45	85/10	89	40
NM_001841	94	15	55	30	72/30	81	45

PCR: Polymerasekettenreaktion, sec: Sekunden, Temp: Temperatur.

Tabelle 2.2-4: Real-Time PCR Amplifikationsparameter der verwendeten Primer

Primername	Denaturierung		Annealing		Extension Temp/Dauer (°C/sec)	Schmelz- punkt Temp (°C)	Zyklen
	Temp (°C)	Dauer (sec)	Temp (°C)	Dauer (sec)			
NM_004198	94	15	55	30	72/30		45
AJ131724	95	20	67	55	81/10	85,5	40-45
NM_013938	95	20	58	55		88	40-45
AF350881	95	20	61	55		84	40
BC004369	95	20	61	45		86	35
NM_003100	95	20	52	45	81/10	84,5	38
NM_001069	95	20	61	55	87/10	91	43-45
AF225423	95	20	63	45		85,1	40-45
NM_004172	94	15	55	30	72/30		45
NM_020783	94	15	55	30	72/30		45
NM_001914	95	20	60	55	84/5	89	45
NM_002547	95	20	60	55		83,5	35-45
AW139618	95	20	60	55		85,5	38
NM_002133	95	20	60	55	85/10	87,5	40
M13577	95	20	66	55		89	45
NM_002055	94	15	55	30	72/30	85-86	45
AI141541	94	15	55	30	72/30		45
NM_004171	94	15	55	30	72/30		45
BT006651	95	20	57,5	30		91,4	45
M69177	95	20	57,5	30		83,7	45
M58603	95	20	63	30		82,2	45

Tabelle 2.2-4: Real-Time PCR Amplifikationsparameter der verwendeten Primer

Primername	Denaturierung		Annealing		Extension Temp/Dauer (°C/sec)	Schmelz- punkt Temp (°C)	Zyklen
	Temp (°C)	Dauer (sec)	Temp (°C)	Dauer (sec)			
U84744	95	15	64	45		85,5	40
NM_003604	94	15	55	30	72/30	82-83	45
NM_000561	94	15	55	30	72/30		45
AV731490 / NM_005639	94	15	55	30	72/30	81	45
NM_014619	94	15	60	30	72/30	87	45
NM_000829	94	15	55	30	72/30	87	45
NM_015532	94	15	55	30	72/30	79-80	45
NM_014396	94	15	60	30	72/30		45
NM_018206	94	15	55	30	72/30		45
NM_004969	94	15	55	30	72/30		45
NM_0 07357	95	20	61	55		83,5	38-45
NM_001101	94	15	56	30	76/30		40
NM_012104	94	15	60	30	72/30		45
NM_000875	94	15	55	30	72/30		45
NM_000688	94	15	56	30	76/30		40
NM_002046	94	15	56	30	76/30		40
NM_012423	94	15	56	30	76/30		35
V01270	94	15	56	30	76/30		36
NM_021130	94	15	56	30	76/30		40

### 2.2.8 Quantifizierung des Real-Time PCR-Produktes

Die Quantifizierung des DNA-Produkts einer RT-PCR kann durch unterschiedliche Methoden erfolgen. Bei der absoluten Quantifizierung wird anhand der Standardkurve die genaue Anzahl der in einer Probe vorhandenen DNA berechnet. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens auf interne Referenzgene, die sogenannten Haushaltsgene (engl. Housekeeping gene), bezogen (Pfaffl 2004b).

#### 2.2.8.1 Absolute Quantifizierung

Die Bestimmung der genauen Anzahl an DNA-Kopien im Reaktionsansatz wird über die Ermittlung der Standardkurve geführt. Nach der Amplifizierung der Standards durch die RT-PCR erfolgt durch den iCycler die Berechnung der Standardkurve und der Effizienz der RT-PCR. Über die Ct-Werte der Ziel-DNA kann an der Standardkurve die absolute Menge der Ziel-DNA berechnet werden.

Standardkurven sind in hohem Maße reproduzierbar und erlauben so die Generierung sensitiver und spezifischer Daten. Dies ist allerdings von der Qualität der Standards abhängig. Ein Nachteil der absoluten Quantifizierung mit Reverse Transkriptase-Produkten als Standards ist deren Abhängigkeit von der Qualität der reversen Transkription (Pfaffl 2004a).

#### 2.2.8.2 Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung, wie sie in der vorliegenden Arbeit erfolgt ist, wird die Expression des Zielgens auf eine interne Kontrolle, meist ein Haushaltsgen, bezogen und so Änderungen in der Expression nachgewiesen. Es erfolgt keine Bestimmung von absoluten Mengen oder Konzentrationen (Pfaffl 2004a, Pfaffl 2004b). Ein Vorteil dieser Methode gegenüber der absoluten Quantifizierung liegt in der Minimierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da alle Störungen (z. B. bei der Probenextraktion, Effizienzunterschiede bei der reversen Transkription) sowohl die Zielgene als auch die Haushaltsgene betreffen.

Haushaltsgene werden ubiquitär exprimiert, sie kodieren für grundlegende Zellfunktionen, ihre Expression ist unabhängig von Zelltyp oder Zellstadium und wird nicht durch besondere Zustände wie Krankheit, Stress oder Medikamenteneinnahme

beeinflusst. Geringe Expressionsunterschiede gibt es allerdings auch bei ihnen, daher sollten immer mindestens zwei Gene in eine Untersuchung eingehen (Vandesompele et al. 2002).

Zur Bestimmung der relativen cDNA-Menge muss eine Normalisierung der Expressionswerte der Zielgene gegen die der Haushaltsgene durchgeführt werden (Wiedemann et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde dafür das geNorm-Programm verwendet (Vandesompele et al. 2002). Für jedes Haushaltsgen müssen dafür zunächst die Ct-Werte aller Proben bestimmt und mit Hilfe der Effizienz der RT-PCR in relative Expressionswerte ( $W_R$ ) umgerechnet werden (Wiedemann et al. 2004). Die Formel zur Berechnung der relativen Expression lautet:

$$W_R = E^{(\min Ct_{\text{mittel}} - Ct_{\text{mittel}})}$$

Anschließend werden die  $W_R$ -Werte in das geNorm-Programm importiert und das in der Expression stabilste und instabilste Haushaltsgen bestimmt. Als Maß der Stabilität eines Gens dient der M-Wert. Dabei zeigt der höchste M-Wert das instabilste Gen an, das aus der weiteren Berechnung herausgenommen wird. geNorm berechnet auch die optimale Anzahl der für die Normalisierung nötigen Haushaltsgene und den Normalisierungsfaktor (NF) für jede Probe (Wiedemann et al. 2004).

Die Normalisierung der Zielgene, mit der man die Expressionswerte des Zielgens (GVI, Gen von Interesse) im Verhältnis zum Referenzgen erhält, erfolgt über die Formel:

$$E_{(\text{GVI normalisiert})} = W_{R(\text{GVI})} / \text{NF}_{(\text{GVI})}$$

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs Haushaltsgene (RRN18s, ACTB, PPIA, RPL13A, GAPDH, ALAS1) untersucht. Die vier stabilsten RRN18S1, ACTB, PPIA und RPL13A gingen in die weitere Berechnung ein.

Abschließend wurde aus den mittels Normalisierung berechneten Expressionswerten aller Proben der statistisch signifikant veränderten Gene für die einzelnen zu untersuchenden Gruppen der Mittelwert gebildet und jeweils zum Gesamtmittelwert der Kontrollgruppe (KG) ins Verhältnis gesetzt. Der Gesamtmittelwert der KG diente dabei als 100 %-Wert. So konnte eine Aussage über die x-fache prozentuale Expression des



untersuchten Gens in der Patientengruppe im Vergleich zur gesunden Gruppe getroffen werden.

### **2.2.9 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse der RT-PCR-Messungen erfolgte mit dem Programm StatView SAS Institute Inc. Version 5.0. Als statistische Verfahren wurden die Varianzanalyse ANOVA (engl. Analysis of Variance, Varianzanalyse) sowie der Post-Hoc Scheffé Test eingesetzt, um die relative Expression der Proben aus der AD Gruppe, der MP Gruppe und der KG für jede der vier untersuchten Hirnregionen und jedes Gen zu berechnen. Zudem wurden die AD und der MP auf Expressionsunterschiede untereinander verglichen. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt,  $p < 0,01$  galt als hoch signifikant,  $p \leq 0,1$  wurde als Tendenz gewertet. Gene mit signifikanter Expressionsänderung wurden weiter bezüglich ihres Expressionsverhaltens in den einzelnen Krankheitsstadien jeder der Patientengruppen untersucht. Auch hier galt als Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

### 3 Ergebnisse

Basierend auf der Analyse von 44760 Genen bei Patienten mit AD, MP und gesunden Personen in verschiedenen Hirnregionen mit dem Affymetrix Gene Chip® Microarray (Affymetrix Human Genome U133 A+B set Gene Chip®) wurde in der vorliegenden Arbeit weiterführend die Expression der 44 Gene untersucht, bei denen mit dem Microarray krankheitsabhängige Änderungen der Expressionsprofile detektiert worden waren (Grünblatt et al. 2007).

Die Tabellen 2.1-2 und 2.1-3 listen alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene auf. Tabelle 7.1-1 im Anhang listet alle Gene auf, die in der Patientengruppe eine statistisch signifikante Änderung ihrer Expression gegenüber der in der KG in mindestens einer untersuchten Hirnregion aufwiesen.

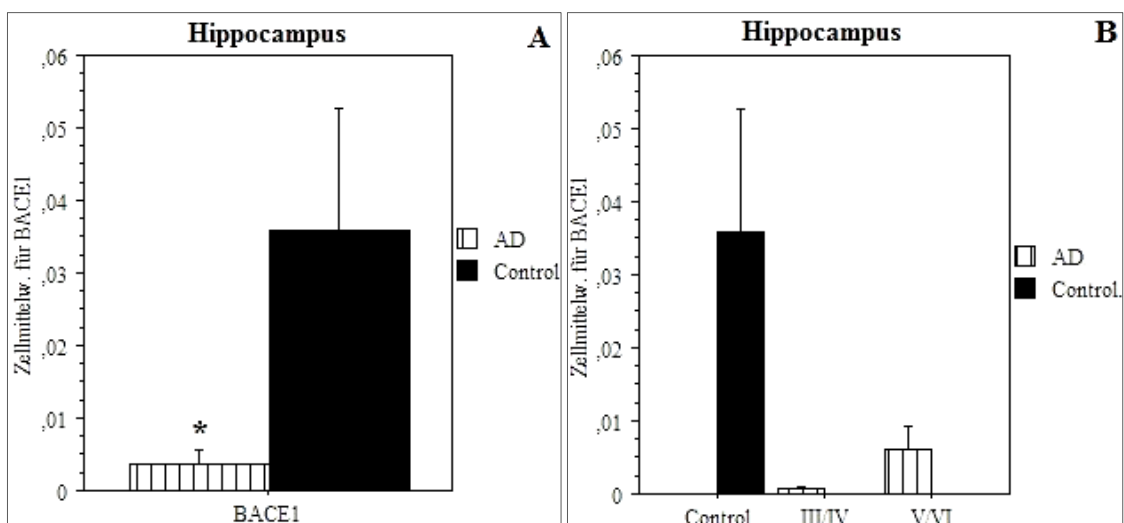
Die Stichprobenmenge der vorliegenden Arbeit umfasste 31 Proben von Patienten mit der AD, dem MP und gesunden Personen aus den vier Hirnregionen Gyrus frontalis medialis (Gfm), Gyrus temporalis medialis (Gtm), Hippocampus und Kleinhirn, die postmortal gewonnen worden waren.

Im Folgenden werden die Ergebnisse ausgesuchter Gene mit signifikanter Änderung der Expression der Patientengruppen gegenüber der KG erläutert. Die Expressionsänderung wird im Text in Prozentzahlen angegeben, (+/-) kennzeichnet den einfachen Standardfehler (SEM) des jeweiligen Ergebnisses. In den Graphiken werden die normalisierten Mittelwerte der mittels RT-PCR untersuchten cDNA-Proben dargestellt.

### 3.1 Genexpression von BACE1 (Beta-site amyloid precursor protein cleaving Enzyme 1)

Die Analyse von BACE1 in der AD Gruppe (n = 9) ergab im Hippocampus eine statistisch signifikante Abnahme der Expression um 89 % (+/- 8 %, p = 0,03) im Vergleich zur KG (n = 6). Im Gfm (n = 6), Gtm (n = 7) und im Kleinhirn (n = 10) zeigten sich bei der AD keine statistisch signifikanten Änderungen zum Expressionsverhalten der KG. Nach der Berechnung der Krankheitsstadien III/IV und V/VI nach Braak wurde weder im Hippocampus noch in den anderen drei untersuchten Hirnarealen eine Expressionsänderung gemessen.

Abbildung 3.1.1 zeigt die Expression des BACE1-Gens in der AD Gruppe im Vergleich zur KG im Hippocampus.



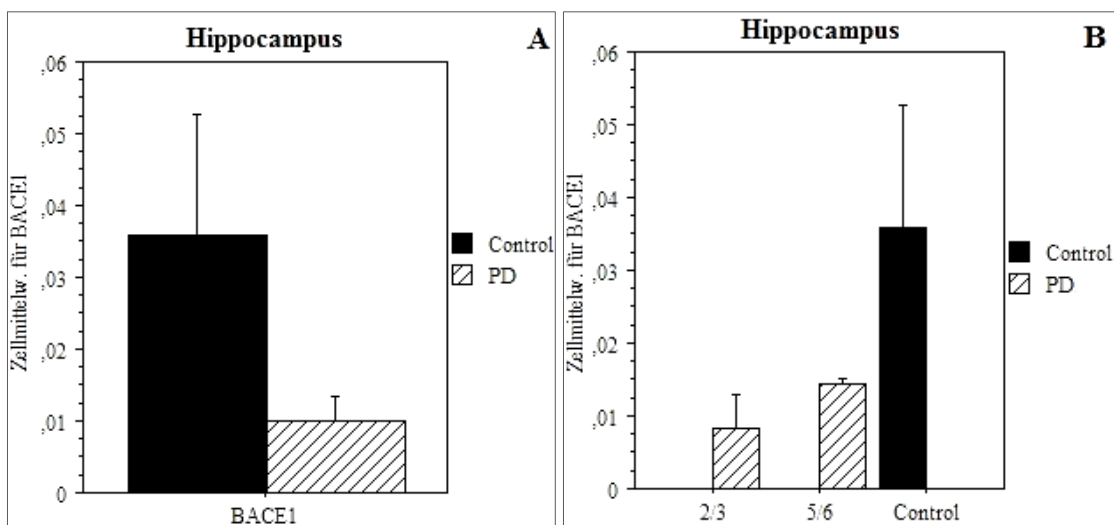
**Abbildung 3.1-1: Expression des BACE1-Gens im Hippocampus bei der AD im Vergleich zur Kontrollgruppe in einem Balkendiagramm.** A: Expression in der gesamten AD Gruppe. B: Expression in den Krankheitsstadien. Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffe Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  (\*) festgelegt. Alzheimer Gruppe (AD), Kontrollgruppe (Control), Mittelwerte (Zellmittelw.). Stadium III/IV nach Braak (III/IV), Stadium V/VI nach Braak (V/VI). Fehlerbalken: +/- 1 SEM.

In der MP Gruppe (n = 7) wurde im Hippocampus im Vergleich zur KG (n = 7) eine Abnahme der Genexpression um 72 % (+/- 16 %, p = 0,1) gemessen. Diese war geringer als in der AD Gruppe ausgeprägt und zeigte zwar eine Tendenz an, war aber

statistisch nicht signifikant. In den einzelnen Krankheitsstadien war die Expressionsänderung der Patientengruppe zur KG ohne statistische Signifikanz.

In den übrigen drei untersuchten Hirnregionen ergab sich weder eine Änderung der Expression von BACE1 in der gesamten MP Gruppe noch in den einzelnen Krankheitsstadien gegenüber der KG.

Abbildung 3.1.2 zeigt die Expression des BACE1-Gens in der MP Gruppe im Vergleich zur KG im Hippocampus.

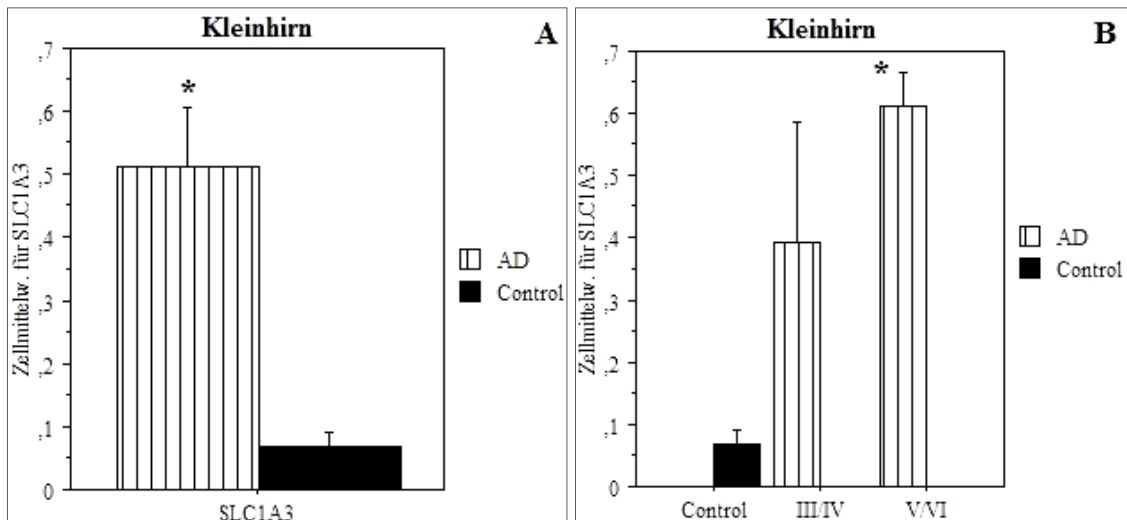


**Abbildung 3.1-2: Expression des BACE1-Gens im Hippocampus bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe in einem Balkendiagramm.** A: Expression in der gesamten MP Gruppe. B: Expression in den Krankheitsstadien. Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffe Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  (\*) festgelegt. Parkinson Gruppe (MP), Kontrollgruppe (Control), Mittelwerte (Zellmittelw.). Stadium 2/3 Hoehn&Yahr (2/3), Stadium 5/6 Hoehn&Yahr (5/6). Fehlerbalken:  $\pm 1$  SEM.

### 3.2 Genexpression des Glutamattransporters SLC1A3 (solute carrier family 1, glial high affinity glutamate transporter, member 3)

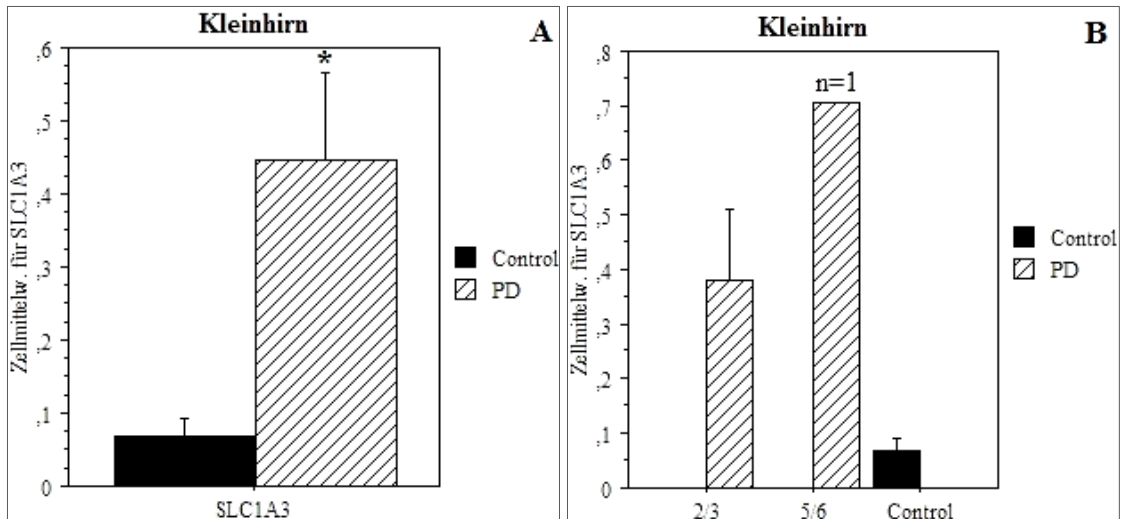
Die Analyse des SLC1A3-Gens zeigte in der gesamten AD Gruppe ( $n = 9$ ) im Kleinhirn eine statistisch signifikante 643%ige ( $\pm 281$  %) Steigerung der Expression ( $p = 0,01$ ) im Vergleich zur KG ( $n = 4$ ). In den Stadien V/VI nach Braak ( $n = 6$ ) ergab sich eine ebenfalls signifikante Zunahme der Genexpression um 786 % ( $\pm 305$  %,  $p = 0,02$ ), während in den Krankheitsstadien II/III nach Braak der gemessene Expressionsanstieg nicht signifikant war.

Abbildung 3.2.1 zeigt die Expression des SLC1A3-Gens in der AD Gruppe im Vergleich zur KG im Kleinhirn.



**Abbildung 3.2-1: Expression des SLC1A3-Gens im Kleinhirn bei der AD im Vergleich zur Kontrollgruppe in einem Balkendiagramm.** A: Expression in der gesamten AD Gruppe. B: Expression in den Krankheitsstadien. Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffe Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  (\*) festgelegt. Alzheimer Gruppe (AD), Kontrollgruppe (Control), Mittelwerte (Zellmittelw.). Stadium III/IV nach Braak (III/IV), Stadium V/VI nach Braak (V/VI). Fehlerbalken:  $\pm 1$  SEM.

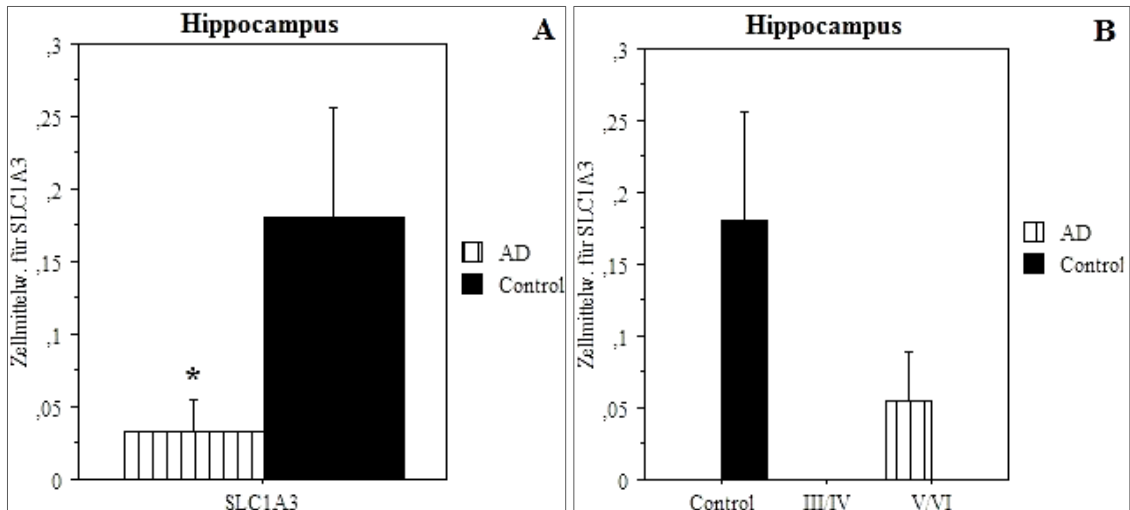
In der MP Gruppe ( $n = 5$ ) ergab sich ebenfalls im Kleinhirn eine zur KG ( $n = 4$ ) statistisch signifikant um 546 % ( $\pm 276$  %,  $p = 0,03$ ) gesteigerte Expression. In den Stadien 2/3 nach H&Y ( $n = 4$ ) wurde bereits eine nicht signifikante Hochregulierung um 454 % ( $\pm 261$  %,  $p = 0,1$ ) gemessen. In den Krankheitsstadien 5/6 nach H&Y nahm die Expression zwar weiter zu, es fand sich eine Steigerung um 920 % ( $p = 0,06$ ). Aufgrund der Stichprobenmenge ( $n = 1$ ) ist dieses Ergebnis jedoch nicht zu verwerten. Abbildung 3.2.2 zeigt die Expression des SLC1A3-Gens in der MP Gruppe im Vergleich zur KG im Kleinhirn.



**Abbildung 3.2-2: Expression des SLC1A3-Gens im Kleinhirn bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe in einem Balkendiagramm.** A: Expression in der gesamten MP Gruppe. B: Expression in den Krankheitsstadien. Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffe Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  (\*) festgelegt. Parkinson Gruppe (MP), Kontrollgruppe (Control), Mittelwerte (Zellmittelw.), n (Patientenzahl), Stadium 2/3 Hoehn&Yahr (2/3), Stadium 5/6 Hoehn&Yahr (5/6). Fehlerbalken:  $\pm 1$  SEM.

Im Hippocampus war die Expression von SLC1A3 in der AD Gruppe ( $n = 10$ ) im Vergleich zur KG ( $n = 6$ ) statistisch signifikant um 82 % ( $\pm 14$  %,  $p = 0,04$ ) reduziert. In den Stadien III/IV nach Braak ( $n = 4$ ) war die Genexpression um 100 % ( $\pm 0,04$  %,  $p = 0,1$ ) ebenfalls herunterreguliert, jedoch ohne statistische Signifikanz. In den höheren Stadien fand sich ebenfalls keine signifikante Expressionsänderung in der Patientengruppe zur Kontrollgruppe.

Abbildung 3.2.3 stellt die Expression von SLC1A3 in der AD Gruppe im Vergleich zur KG im Hippocampus dar.

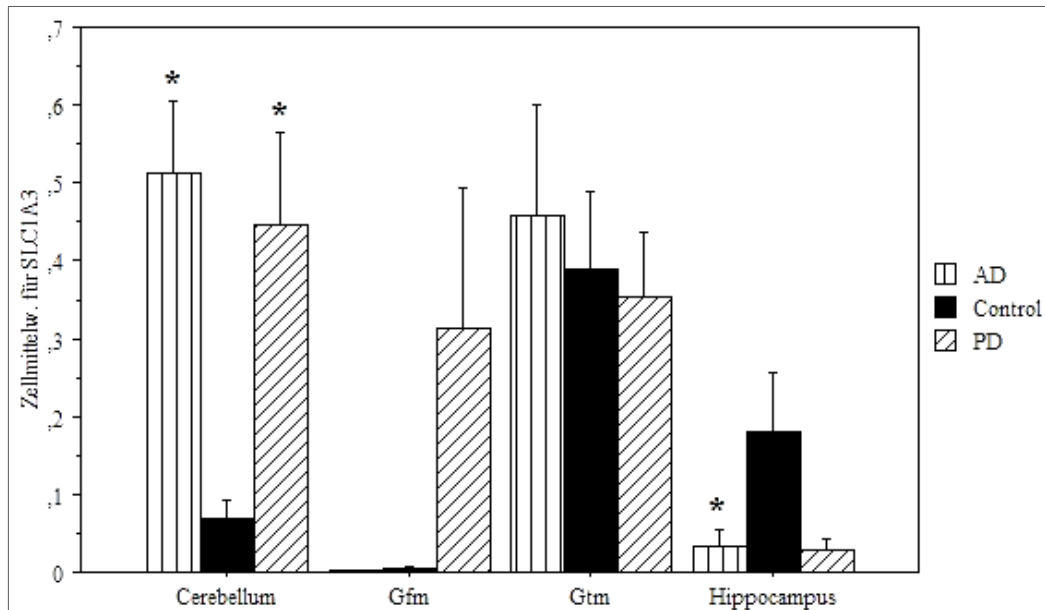


**Abbildung 3.2-3: Expression des SLC1A3-Gens im Hippocampus bei der AD im Vergleich zur Kontrollgruppe in einem Balkendiagramm.** A: Expression in der gesamten AD Gruppe. B: Expression in den Krankheitsstadien. Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffe Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  (\*) festgelegt. Alzheimer Gruppe (AD), Kontrollgruppe (Control), Mittelwerte (Zellmittelw.). Stadium III/IV nach Braak (III/IV), Stadium V/VI nach Braak (V/VI). Fehlerbalken:  $\pm 1$  SEM.

In der MP Gruppe ( $n = 6$ ) war im Hippocampus die Expression des SLC1A3-Gens um 84 % ( $\pm 10$  %,  $p = 0,07$ ) herunterreguliert, zwar statistisch nicht signifikant. Die Expressionsänderung ist aber als Tendenz zu werten. In den einzelnen Krankheitsstadien fand sich ebenfalls keine statistisch signifikante Expressionsänderung in der Patientengruppe. Die Daten sind nicht graphisch abgebildet.

Im Gfm und im Gtm wurde bei beiden Erkrankungen weder in den gesamten Patientengruppen noch in den einzelnen Krankheitsstadien eine signifikante Expressionsänderung des SLC1A3-Gens im Vergleich zur KG gemessen.

Abbildung 3.2.4 zeigt die Expression des SLC1A3-Gens in jeder untersuchten Hirnregion bei der AD, dem MP und der KG.



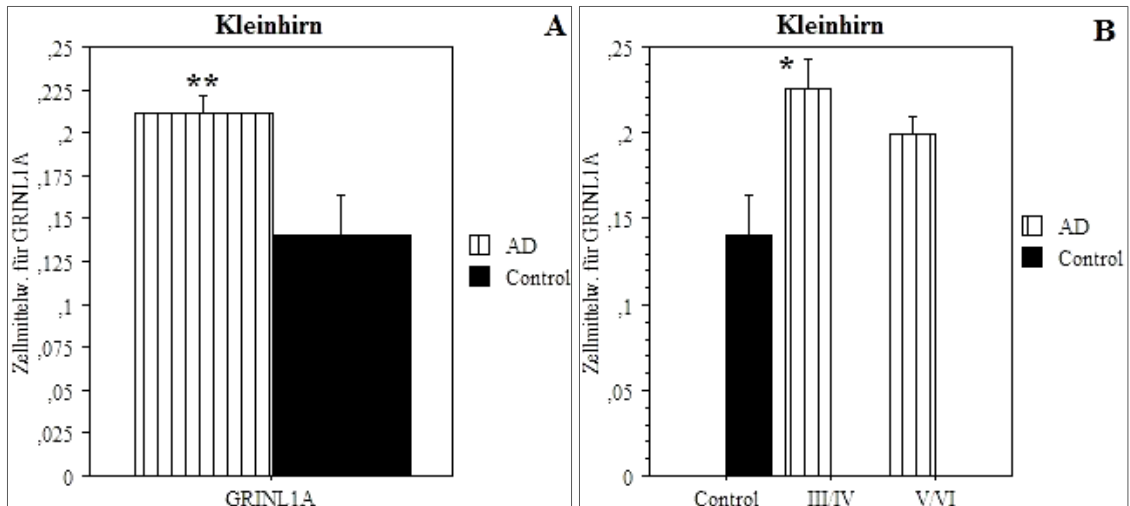
**Abbildung 3.2-4: Expression des SLC1A3-Gens in allen untersuchten Hirnregionen bei der AD, dem MP und der Kontrollgruppe in einem Balkendiagramm.** Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffe Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  (\*) festgelegt. Alzheimer Gruppe (AD), Kontrollgruppe (Control), Parkinson Gruppe (MP), Mittelwerte (Zellmittelw.), Gfm (Gyrus frontalis medialis), Gtm (Gyrus temporalis medialis). Fehlerbalken  $\pm 1$  SEM.

### 3.3 Genexpression des Glutamaterezeptors GRINL1A (glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-like 1A)

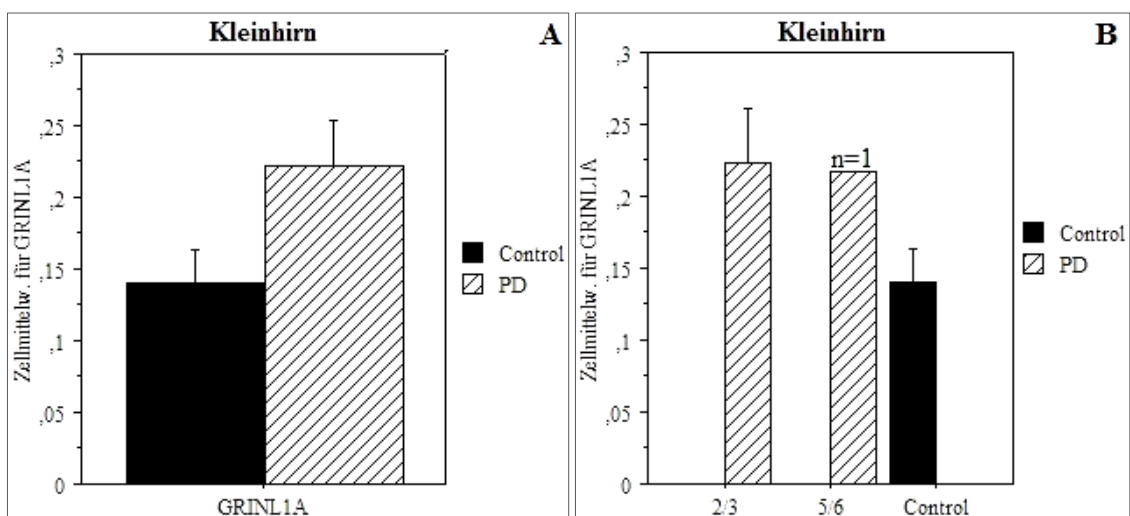
Bei der Analyse des GRINL1A-Gens wurde im Kleinhirn bei beiden Erkrankungen eine Zunahme der Expression im Vergleich zu der KG ( $n = 4$ ) gemessen. In der AD Gruppe ( $n = 9$ ) war diese statistisch hochsignifikant um 50 % ( $\pm 26$  %,  $p = 0,006$ ); in der MP Gruppe ( $n = 6$ ) um 57 % ( $\pm 34$  %,  $p = 0,09$ ), als Tendenz jedoch nicht statistisch signifikant, hochreguliert.

Die AD Gruppe zeigte zudem eine signifikante Expressionssteigerung in den Stadien III/IV nach Braak ( $n = 4$ ) um 61 % ( $\pm 29$  %,  $p = 0,02$ ). In den Stadien V/VI nach Braak ( $n = 5$ ) war diese mit 43 % ( $\pm 24$  %,  $p = 0,08$ ) geringer ausgeprägt und nicht signifikant. In der MP Gruppe war die Expression in den einzelnen Krankheitsstadien nicht signifikant zur KG verändert. Abbildung 3.3.1 zeigt die Expression von GRINL1A in der AD Gruppe und der KG im Kleinhirn. Abbildung 3.3.2 stellt die Expression des GRINL1A-Gens beim MP im Vergleich zur KG im Kleinhirn dar.





**Abbildung 3.3-1: Expression des GRINL1A-Gens im Kleinhirn bei der AD im Vergleich zur Kontrollgruppe in einem Balkendiagramm.** A: Expression in der gesamten AD Gruppe. B: Expression in den Krankheitsstadien. Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffe Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt (\* $p < 0,05$  signifikant, \*\* $p < 0,01$  hoch signifikant). Alzheimer Gruppe (AD), Kontrollgruppe (Control), Mittelwerte (Zellmittelw.). Stadium III/IV nach Braak (III/IV), Stadium V/VI nach Braak (V/VI). Fehlerbalken:  $\pm 1$  SEM.

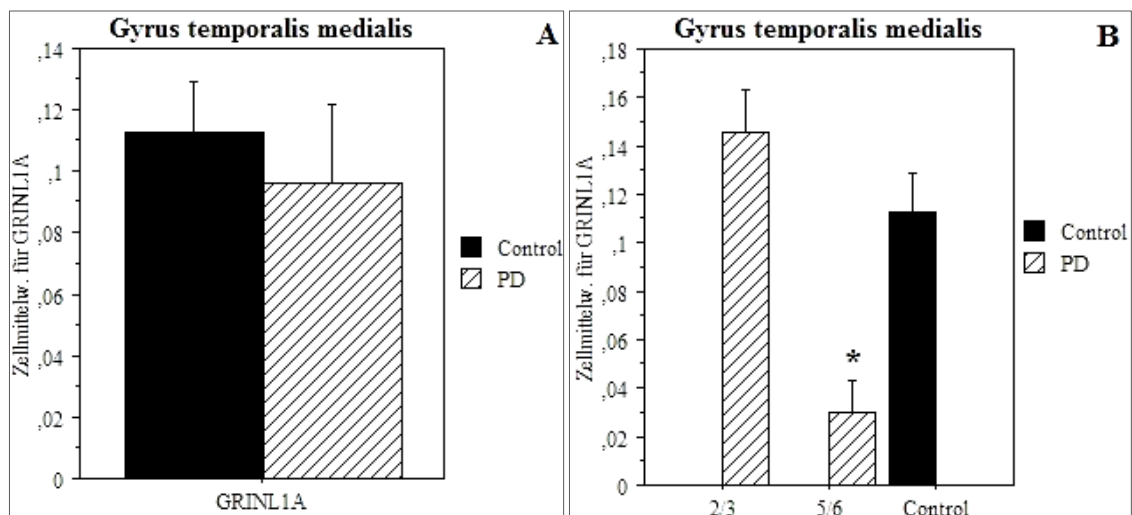


**Abbildung 3.3-2: Expression des GRINL1A-Gens im Kleinhirn bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe in einem Balkendiagramm.** A: Expression in der gesamten MP Gruppe. B: Expression in den Krankheitsstadien. Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffe Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  (\*) festgelegt. Parkinson Gruppe (PD), Kontrollgruppe (Control), Mittelwerte (Zellmittelw.), n (Patientenzahl). Stadium 2/3 Hoehn&Yahr (2/3), Stadium 5/6 Hoehn&Yahr (5/6). Fehlerbalken:  $\pm 1$  SEM.

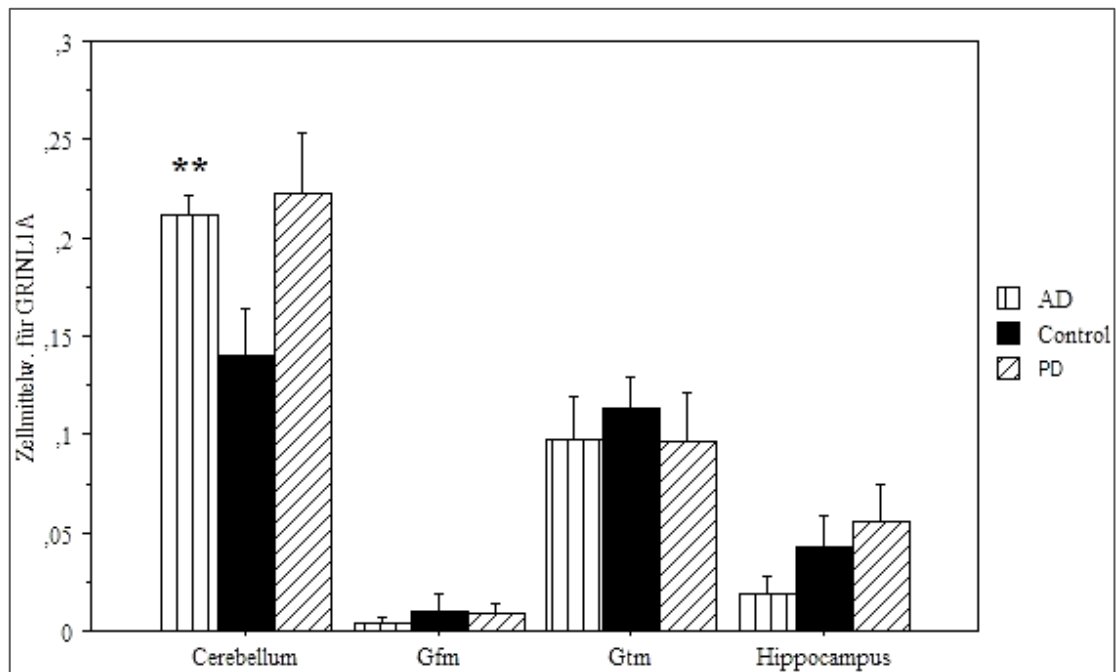
Im Hippocampus, im Gfm und im Gtm wurde weder in der gesamten AD Gruppe noch in der MP Gruppe eine statistisch signifikante Änderung im Expressionsverhalten des GRINL1A-Gens im Vergleich zur KG gemessen.

In den Krankheitsstadien ergab sich allerdings im Gtm in der MP Gruppe einerseits ein statistisch hochsignifikanter Expressionsunterschied von den niedrigen zu den hohen Krankheitsstadien ( $p = 0,006$ ) nach H&Y. Zudem fand sich in den Stadien 5/6 nach H&Y ( $n = 3$ ) eine zur KG ( $n = 6$ ) statistisch signifikant um 73 % ( $\pm 12\%$ ,  $p = 0,03$ ) herunterregulierte Expression, während in den Stadien 2/3 nach H&Y ( $n = 4$ ) zunächst keine zur KG statistisch signifikante Änderung der Expression des GRINL1A-Gens gemessen wurde.

Abbildung 3.3.3 stellt die Expression des GRINL1A-Gens beim MP im Vergleich zur KG im Gtm dar. Abbildung 3.3.4 zeigt die Expression des GRINL1A-Gens in jeder untersuchten Hirnregion bei der AD, dem MP und der KG.



**Abbildung 3.3-3: Expression des GRINL1A-Gens im Gtm bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe in einem Balkendiagramm.** A: Expression in der gesamten MP Gruppe. B: Expression in den Krankheitsstadien. Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffe Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt (\*). Parkinson Gruppe (MP), Kontrollgruppe (Control), Mittelwerte (Zellmittelw.). Stadium 2/3 Hoehn&Yahr (2/3), Stadium 5/6 Hoehn&Yahr (5/6). Fehlerbalken:  $\pm 1$  SEM.



**Abbildung 3.3-4: Expression des GRINL1A-Gens in allen untersuchten Hirnregionen bei der AD, dem MP und der Kontrollgruppe.** Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffé Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt (\* $p < 0,05$  signifikant). Alzheimer Gruppe (AD), Gfm (Gyrus frontalis medialis), Gtm (Gyrus temporalis medialis), Kontrollgruppe (Control), Parkinson Gruppe (MP), Mittelwerte (Zellmittelw.). Fehlerbalken  $\pm$  1 SEM.

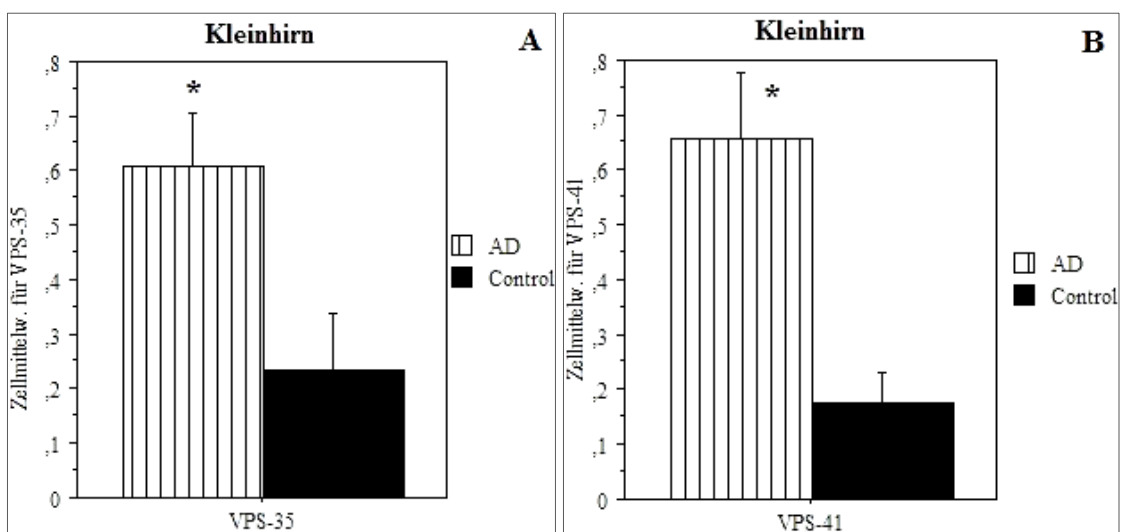
### 3.4 Genexpression von vacuolar protein sorting Protein 35 und 41

Die Expression der Gene VPS35 und VPS41 zeigte ein ähnliches Verhalten bei der AD und dem MP im Kleinhirn, im Hippocampus und im Gtm.

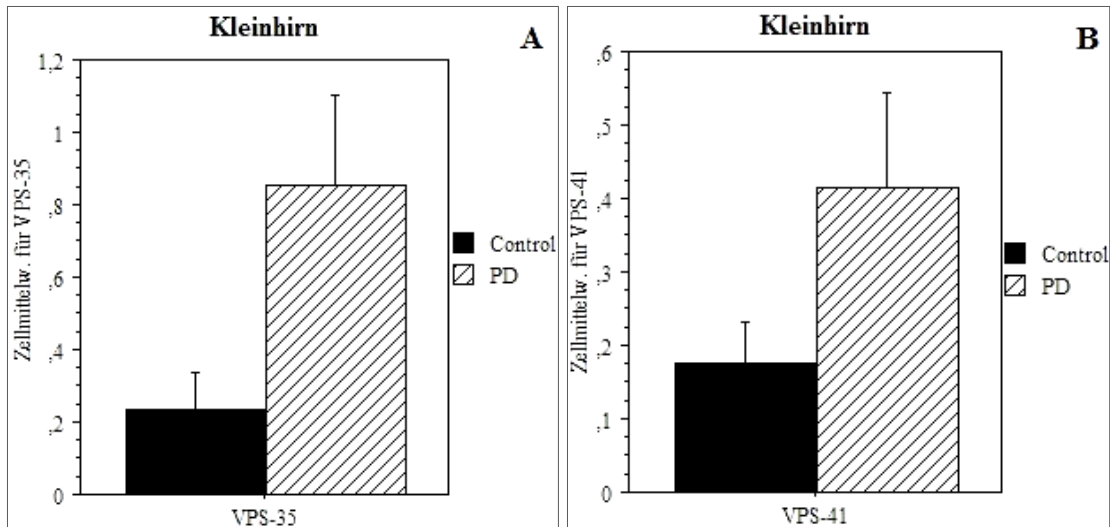
Im Kleinhirn der AD Gruppe ( $n = 10$ ) wurde eine zur KG ( $n = 4$ ) statistisch signifikante Zunahme der Expression beider Gene gemessen. Das VPS35-Gen war dabei um 161 % ( $\pm 119$  %,  $p = 0,049$ ), das VPS41-Gen um 273 % ( $\pm 137$  %,  $p = 0,03$ ) herauf reguliert. Im Kleinhirn der AD Gruppe wurde zudem in den Krankheitsstadien III/IV nach Braak bei beiden Genen ein Expressionsanstieg im Vergleich zur KG gemessen. Dieser betrug bei dem VPS35-Gen 230 % ( $\pm 138$  %,  $p = 0,09$ ), bei dem VPS41-Gen sogar 342 % ( $\pm 165$  %,  $p = 0,08$ ). Es wurde jeweils eine statistische Tendenz, aber keine Signifikanz erreicht. Abbildung 3.4.1 zeigt die Expression des VPS35-Gens und des VPS41-Gens in der AD Gruppe im Vergleich zur KG im Kleinhirn.

In der MP Gruppe (n = 6) ergab sich für das VPS35-Gen im Kleinhirn ebenfalls eine Zunahme der Expression, die zwar um 266 % (+/- 189 %, p = 0,09) anstieg, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Das VPS41-Gen zeigte für alle Untersuchten der MP Gruppe im Kleinhirn keinen Expressionsunterschied zur KG. In den Stadien 5/6 nach H&Y wurde in der MP Gruppe zwar eine um 365 % (p = 0,04) statistisch signifikant zur KG gesteigerte Expression des VPS41-Gens detektiert. Aufgrund der Probenzahl (n=1) ist dieses Ergebnis allerdings nicht zu verwerten.

Abbildung 3.4.2 stellt die Expression beider Gene in der MP Gruppe verglichen mit der KG im Kleinhirn dar.



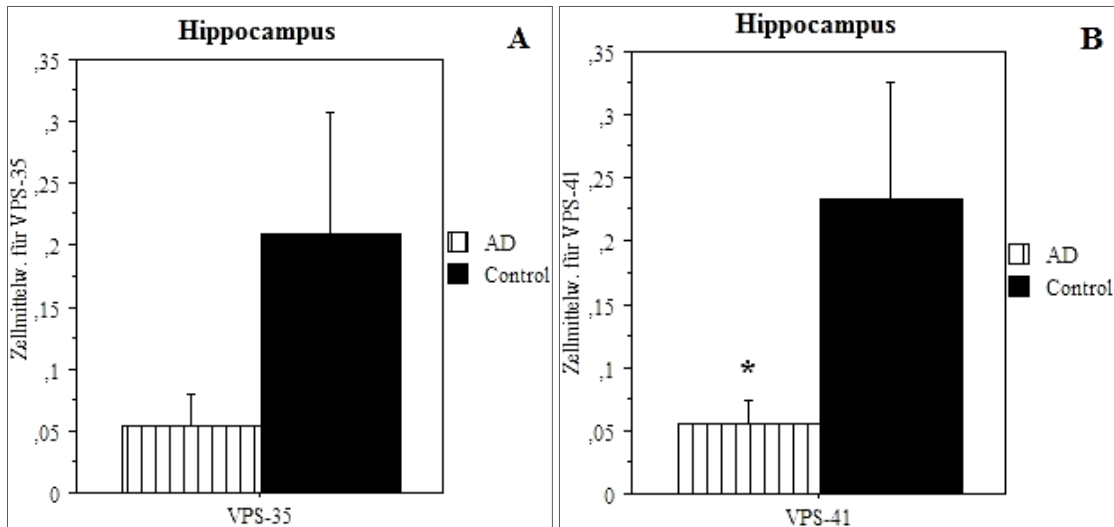
**Abbildung 3.4-1: Expression des VPS35-Gens und des VPS41-Gens im Kleinhirn bei der AD im Vergleich zur Kontrollgruppe in einem Balkendiagramm.** A: Expression von VPS35, B: Expression von VPS41. Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffé Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  (\*) festgelegt. Alzheimer Gruppe (AD), Kontrollgruppe (Control), Mittelwerte (Zellmittelw.). Fehlerbalken: +/- 1 SEM.



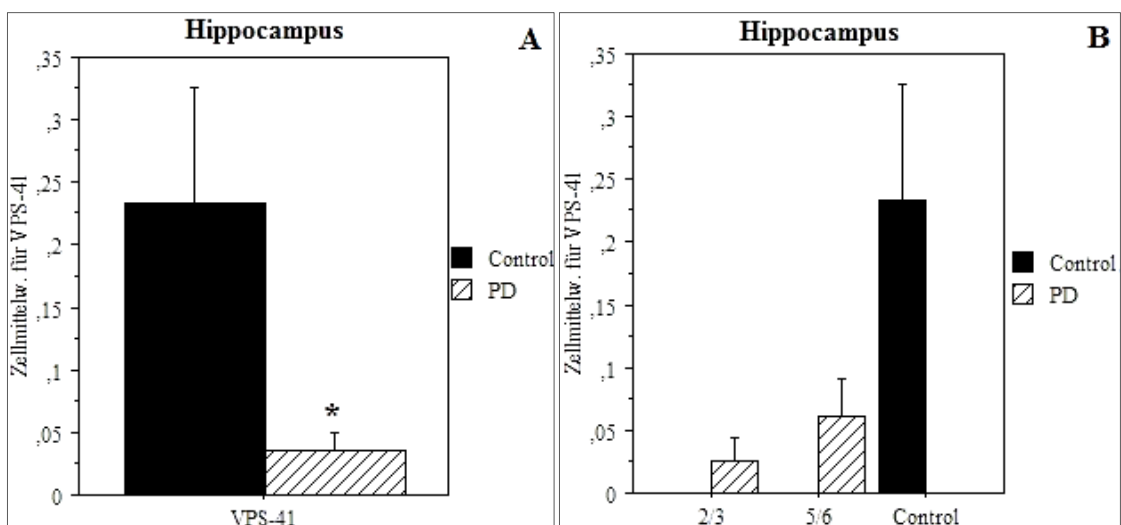
**Abbildung 3.4-2: Expression des VPS35-Gens und des VPS41-Gens im Kleinhirn bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe in einem Balkendiagramm.** A: Expression von VPS35, B: Expression von VPS41. Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffé Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  (\*) festgelegt. Parkinson Gruppe (MP), Kontrollgruppe (Control), Mittelwerte (Zellmittelw.). Fehlerbalken:  $\pm 1$  SEM.

Im Hippocampus war die Expression des VPS35-Gens bei der AD sowie die des VPS41-Gens bei der AD und dem MP im Vergleich zur KG ( $n = 6$ ) herunterreguliert. Bei VPS41 war diese Reduktion in der AD Gruppe ( $n = 11$ ) um 76 % ( $\pm 12$  %,  $p = 0,02$ ) als auch in der MP Gruppe ( $n = 8$ ) um 85 % ( $\pm 9$  %,  $p = 0,03$ ) statistisch signifikant. Die Expression des VPS35-Gens nahm in der AD Gruppe ( $n = 11$ ) um 74 % ( $\pm 17$  %,  $p = 0,07$ ) statistisch nicht signifikant ab. In der MP Gruppe ( $n = 8$ ) war das Verhalten des VPS35-Gens zur KG stabil.

Auch in einzelnen Krankheitsstadien wurde eine Abnahme der Expression des VPS41-Gens bei beiden Erkrankungen gemessen. In der AD Gruppe ( $n = 8$ ) betrug diese in den Stadien V/VI nach Braak 74 % ( $\pm 13$  %,  $p = 0,1$ ), beim MP ( $n = 6$ ) in den Stadien 2/3 nach H&Y 89 % ( $\pm 9$  %,  $p = 0,1$ ), jeweils ohne statistische Signifikanz. In den übrigen Krankheitsstadien war die Expression des VPS41-Gens zur KG stabil. Abbildung 3.4.3 zeigt die Expression des VPS35-Gens und des VPS41-Gens in der AD Gruppe im Vergleich zur KG im Hippocampus. Abbildung 3.4.4 stellt das Verhalten des VPS41-Gens in der MP Gruppe im Vergleich zur KG im Hippocampus dar.



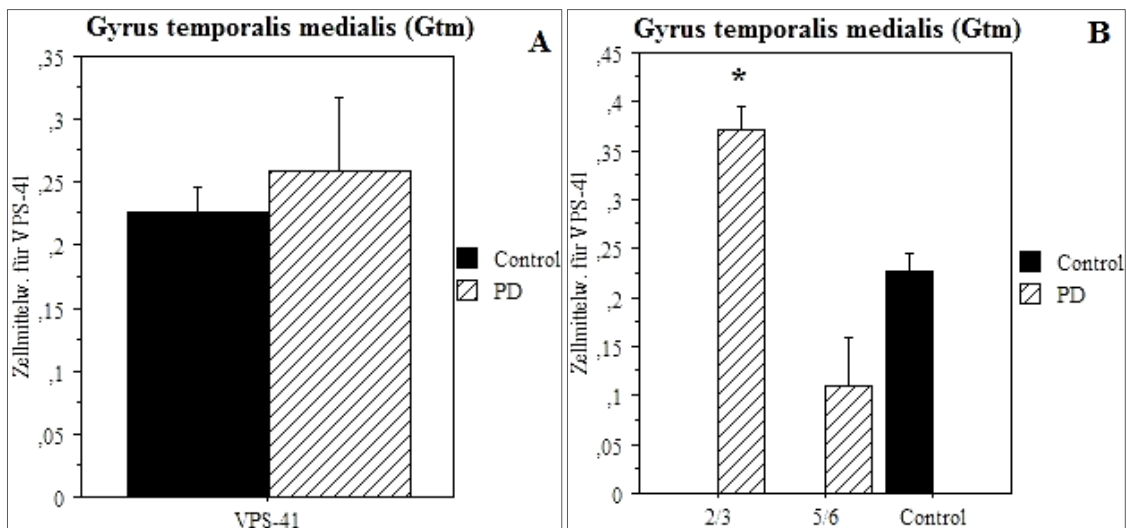
**Abbildung 3.4-3: Expression des VPS35-Gens und des VPS41-Gens im Hippocampus bei der AD im Vergleich zur Kontrollgruppe in einem Balkendiagramm.** A: Expression von VPS35, B: Expression von VPS41. Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffe Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  (\*) festgelegt. Alzheimer Gruppe (AD), Kontrollgruppe (Control), Mittelwerte (Zellmittelw.). Fehlerbalken:  $\pm 1$  SEM.



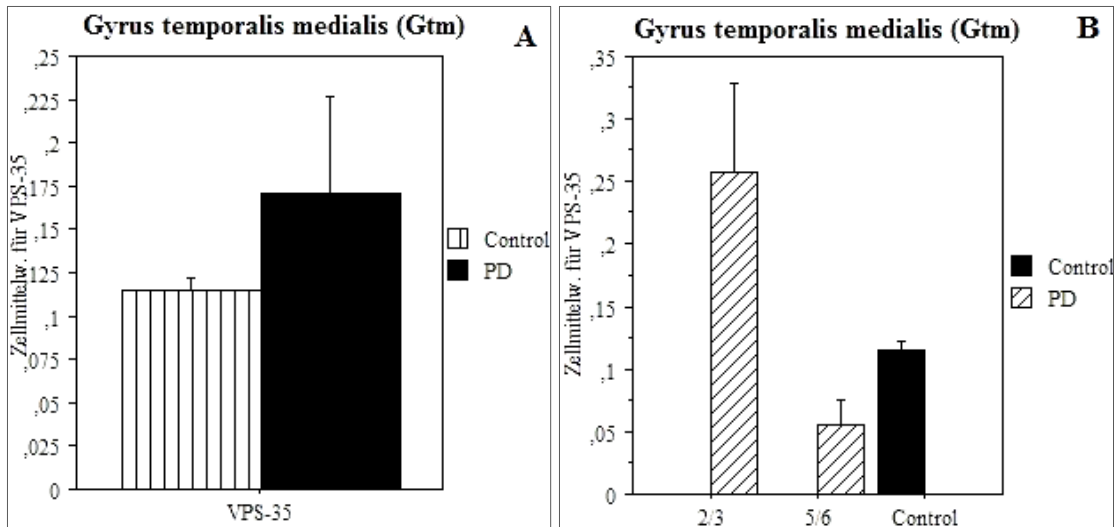
**Abbildung 3.4-4: Expression des VPS41-Gens im Hippocampus bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe in einem Balkendiagramm.** A: Expression in der gesamten MP Gruppe, B: Expression in den Krankheitsstadien. Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffe Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  (\*) festgelegt. Parkinson Gruppe (MP), Kontrollgruppe (Control), Mittelwerte (Zellmittelw.). Stadium 2/3 Hoehn&Yahr (2/3), Stadium 5/6 Hoehn&Yahr (5/6). Fehlerbalken:  $\pm 1$  SEM.

Im Gfm und Gtm zeigten beide Gene bei der AD und dem MP keine Änderung ihrer Expression im Vergleich mit der KG. Bei der AD zeigten beide Gene in diesen Hirnregionen auch in den einzelnen Krankheitsstadien ein stabiles Verhalten.

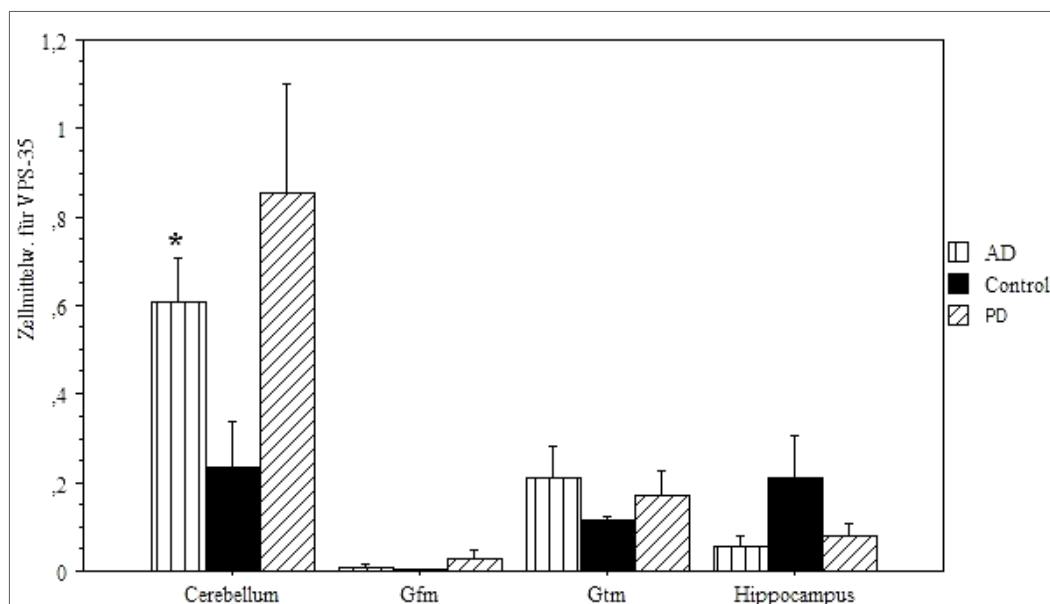
Beim MP hingegen nahm im Gtm in den Stadien 2/3 nach H&Y (n = 4) die Expression beider Gene zu, des VPS35-Gens nicht signifikant um 123 % (+/- 62 %, p = 0,09), des VPS41-Gens statistisch signifikant um 64 % (+/- 17 %, p = 0,01). In den Stadien 5/6 nach H&Y (n = 3) fand sich ein zu den Krankheitsstadien 2/3 nach H&Y statistisch signifikanter Abfall der Expression beider Gene (VPS35 p = 0,04; VPS41 p = 0,0007). Im Vergleich mit der KG (n = 5) wurde bei beiden Genen allerdings keine signifikante Expressionsänderung gemessen. Dennoch ist die um etwa 50 % (+/- 22 %, p = 0,06) zur KG erniedrigte Expression des VPS41-Gens in den Stadien 5/6 nach H&Y als Tendenz zu werten. Abbildung 3.4.5 zeigt die Expression des VPS41-Gens in der MP Gruppe im Vergleich mit der KG im Gtm. Abbildung 3.4.6 stellt die Expression des VPS35-Gens in der MP Gruppe im Vergleich zur KG im Gtm dar. Die Abbildungen 3.4.7 und 3.4.8 zeigen die Expression des VPS35-Gens und des VPS41-Gens in allen Hirnregionen bei der AD, dem MP und der Kontrollgruppe.



**Abbildung 3.4-5: Expression des VPS41-Gens im Gtm bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe in einem Balkendiagramm.** A: Expression in der gesamten MP Gruppe. B: Expression in den Krankheitsstadien. Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffe Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  (\*) festgelegt. Parkinson Gruppe (MP), Kontrollgruppe (Control), Mittelwerte (Zellmittelw.). Stadium 2/3 Hoehn&Yahr (2/3), Stadium 5/6 Hoehn&Yahr (5/6). Fehlerbalken: +/- 1 SEM.

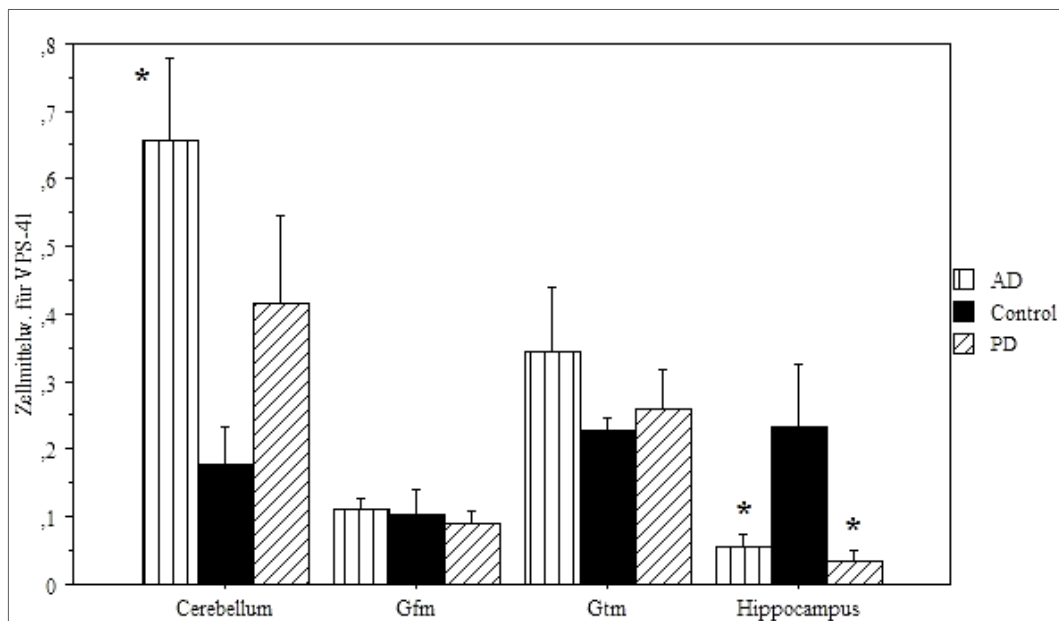


**Abbildung 3.4-6: Expression des VPS35-Gens im Gtm bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe in einem Balkendiagramm.** A: Expression in der gesamten MP Gruppe. B: Expression in den Krankheitsstadien. Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffe Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  (\*) festgelegt. Parkinson Gruppe (MP), Kontrollgruppe (Control), Mittelwerte (Zellmittelw.). Stadium 2/3 Hoehn&Yahr (2/3), Stadium 5/6 Hoehn&Yahr (5/6). Fehlerbalken:  $\pm 1$  SEM.



**Abbildung 3.4-7: Expression des VPS35-Gens in allen untersuchten Hirnregionen bei der AD, dem MP und der Kontrollgruppe.** Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffe Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt (\* $p < 0,05$  signifikant). Alzheimer Gruppe (AD), Gfm (Gyrus frontalis medialis), Gtm (Gyrus temporalis medialis), Kontrollgruppe (Control), Parkinson Gruppe (MP), Mittelwerte (Zellmittelw.). Fehlerbalken  $\pm 1$  SEM.





**Abbildung 3.4-8: Expression des VPS41-Gens in allen untersuchten Hirnregionen bei der AD, dem MP und der Kontrollgruppe.** Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffe Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt (\* $p < 0,05$  signifikant). Alzheimer Gruppe (AD), Gfm (Gyrus frontalis medialis), Gtm (Gyrus temporalis medialis), Kontrollgruppe (Control), Parkinson Gruppe (MP), Mittelwerte (Zellmittelw.). Fehlerbalken +/- 1 SEM.

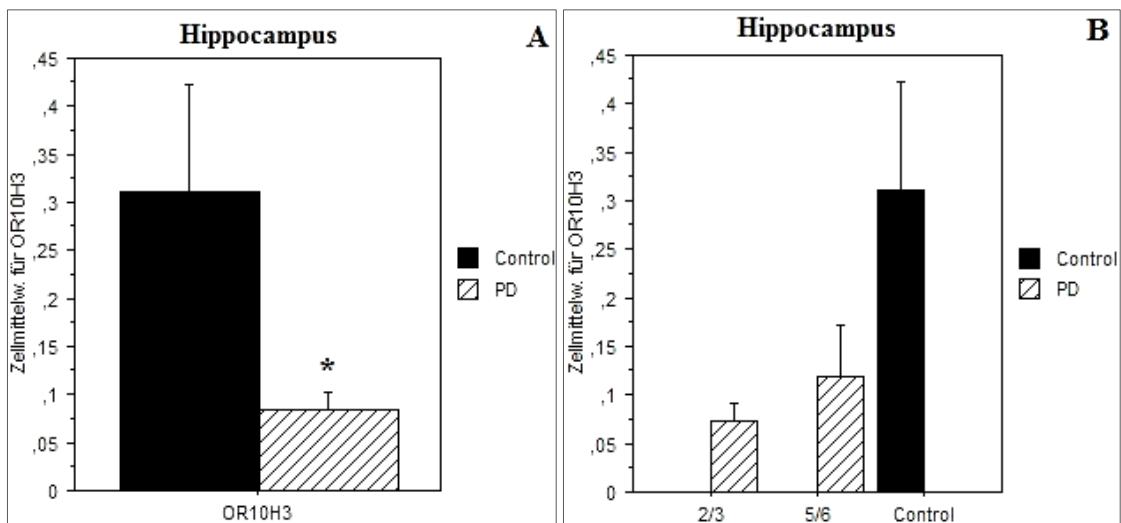
### 3.5 Genexpression des olfaktorischen Rezeptors OR10H3 (Olfactory Receptor, Family 10, Subfamily H, Member 3)

Im Hippocampus wurde eine Abnahme der Expression des olfaktorischen Rezeptor (OR)-Gens im Vergleich zur KG ( $n = 6$ ) bei der AD und dem MP gemessen.

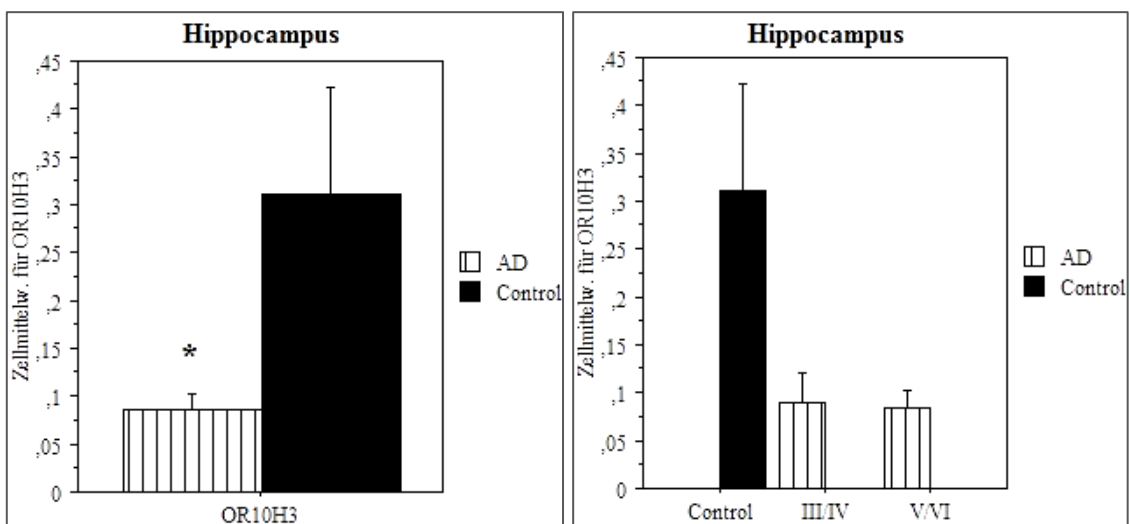
In der MP Gruppe ( $n = 8$ ) war die Expression statistisch signifikant um 73 % (+/- 10 %,  $p = 0,04$ ) reduziert. In den Krankheitsstadien 2/3 nach H&Y ( $n = 6$ ) war sie statistisch nicht signifikant um 76 % (+/- 10 %,  $p = 0,1$ ) im Vergleich zur KG erniedrigt. In den Stadien 5/6 nach H&Y ( $n = 2$ ) fand sich keine Änderung der Expression des OR10H3-Gens im Vergleich zur KG. Abbildung 3.5.1 zeigt das Expressionsverhalten des OR-Gens beim MP im Vergleich zur KG im Hippocampus.

In der AD Gruppe ( $n = 9$ ) war die Expression des OR10H3-Gens im Hippocampus ebenfalls statistisch signifikant um 72 % (+/- 10 %,  $p = 0,03$ ) reduziert. In den einzelnen Krankheitsstadien war das Expressionsverhalten des Gens statistisch unverändert zur

KG. Abbildung 3.5.2 stellt das Expressionsverhalten des OR-Gens bei der AD im Vergleich zur KG im Hippocampus dar.



**Abbildung 3.5-1: Expression des OR10H3-Gens im Hippocampus bei MP im Vergleich zur Kontrollgruppe in einem Balkendiagramm.** A: Expression in der gesamten MP Gruppe. B: Expression in den Krankheitsstadien. Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffe Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  (\*) festgelegt. Parkinson Gruppe (MP), Kontrollgruppe (Control), Mittelwerte (Zellmittelw.). Stadium 2/3 Hoehn&Yahr (2/3), Stadium 5/6 Hoehn&Yahr (5/6). Fehlerbalken: +/- 1 SEM.

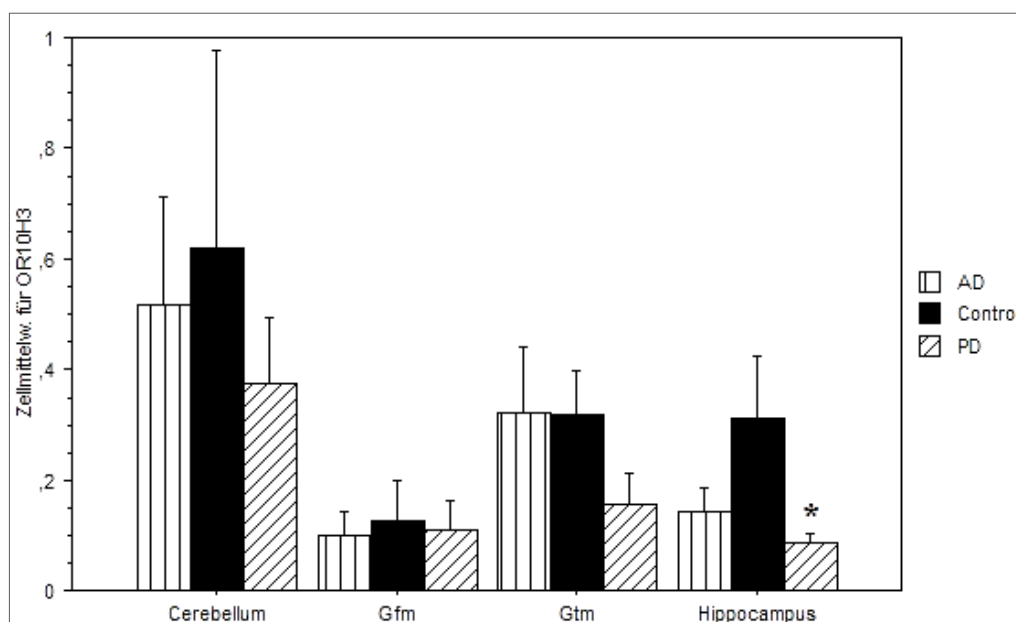


**Abbildung 3.5-2: Expression des OR10H3-Gens im Hippocampus bei der AD im Vergleich zur Kontrollgruppe in einem Balkendiagramm.** A: Expression in der gesamten AD Gruppe. B: Expression in den Krankheitsstadien. Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffe Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  (\*) festgelegt. Alzheimer Gruppe (MP), Kontrollgruppe (Control), Mittelwerte (Zellmittelw.). Stadium III/IV nach Braak (III/IV), Stadium V/VI nach Braak (V/VI). Fehlerbalken: +/- 1 SEM.

Im Gtm wurde in der gesamten MP Gruppe eine tendenzielle Abnahme der Expression des OR10H3-Gens um 51 % (+/- 22 %,  $p = 0,1$ ) gemessen. In den Krankheitsstadien verhielt sich die Expression des Gens zur KG unverändert. In der AD Gruppe war die Expression des OR10H3-Gens zur KG unverändert.

Auch in den übrigen untersuchten Hirnregionen fanden sich bei beiden Erkrankungen keine statistisch signifikanten Expressionsänderungen des OR10H3-Gens im Vergleich zur KG.

Abbildung 3.5.3 gibt eine Übersicht über das Verhalten des OR10H3-Gens in der Gruppe der AD und des MP im Vergleich zur KG in allen untersuchten Hirnregionen.



**Abbildung 3.5-3: Expression des OR10H3-Gens in allen untersuchten Hirnregionen bei der AD, dem MP und der Kontrollgruppe.** Abgebildet sind die Mittelwerte jeder Gruppe, nachdem die mit der Real-Time Polymerasekettenreaktion ermittelte cDNA-Expression der Proben anhand des geNorm-Programms mit den Haushaltsgenen normalisiert wurde. Die Statistik wurde mit ANOVA und dem Post-Hoc Scheffé Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  (\*) festgelegt. Alzheimer Gruppe (AD), Gfm (Gyrus frontalis medialis), Gtm (Gyrus temporalis medialis), Kontrollgruppe (Control), Parkinson Gruppe (MP), Mittelwerte (Zellmittelw.). Fehlerbalken +/- 1 SEM.

## 4 Diskussion

Bei der AD und dem MP ist vielfach die Beteiligung ähnlicher Prozesse, z. B. OS oder Exzitotoxizität, an der Pathogenese der Neurodegeneration auffällig (Schulz & Falkenburger 2004, Koutsilieri & Riederer 2007, Caudle & Zhang 2009). Obwohl die Ätiologie beider Erkrankungen bisher nicht vollständig bekannt ist, ist daher zu vermuten, dass sie auch ätiologische Gemeinsamkeiten aufweisen könnten.

Um potentiell gemeinsame pathogenetische oder ätiologische Faktoren beider Erkrankungen zu bestätigen und weiter einzugrenzen, wurde in der vorliegenden Arbeit in unterschiedlichen Hirnregionen das Expressionsverhalten von Genen mit möglicher Assoziation zur AD, zum MP oder zu beiden Erkrankungen untersucht. Diese Gene besitzen Funktionen im Neurotransmittersystem, im Eisen-Stoffwechsel, im oxidativen System, bei der Signaltransduktion, der Zelldifferenzierung und der Neurogenese, der Zytoskelettorganisation, dem Proteinstoffwechsel, speziell von A $\beta$ , bei zellulären Transportvorgängen, bei der Apoptose und im Riechsystem.

Von den analysierten Genen zeigten 12 statistisch signifikante Änderungen ihrer Expression. Das Expressionsverhalten dieser Gene wurde daraufhin bei der AD und dem MP vergleichend sowie bezüglich des zeitlichen Verlaufs in Abhängigkeit von der Krankheitsprogression untersucht. Dabei war auffällig, dass signifikante Änderungen meist im Hippocampus und im Kleinhirn auftraten, während im Gtm und Gfm das Verhalten der Gene vorwiegend stabil war. In den Hirnarealen fand sich häufig eine gleichsinnige Veränderung der Expression bei beiden Erkrankungen. Im Hippocampus war sie fast ausschließlich herunterreguliert, im Kleinhirn wurde meist eine Steigerung gemessen. Lediglich das Gen der Channel Kinase 2 (CHAK2) wies eine krankheitsspezifische Änderung mit einer isolierten Hochregulierung der Expression im Kleinhirn beim MP auf. Das Gen des olfaktorischen Rezeptors OR10H3 zeigte eine statistisch signifikante Abnahme der Expression im Hippocampus zwar nur beim MP, allerdings fand sich dort auch eine tendenzielle Reduktion bei der AD. Beim BACE1-Gen wurde zwar eine statistisch signifikant reduzierte Expression im Hippocampus nur bei der AD gemessen, aber auch dort fand sich beim MP eine tendenzielle Abnahme.

Im Folgenden wird die Expression ausgesuchter Gene bei der AD und dem MP vergleichend und potentielle kausale Zusammenhänge dieser Veränderungen diskutiert.

#### 4.1 Genexpression von BACE1 (Beta-site amyloid precursor protein cleaving Enzyme 1)

BACE1 (Asp2, Memapsin2) ist das als  $\beta$ -Sekretase fungierende Enzym (Hussain et al. 1999, Sinha et al. 1999, Vassar et al. 1999, Yan et al. 1999, Lin et al. 2000), das den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Prozessierung des APP zum A $\beta$ -Peptid vermittelt (Seubert et al. 1993, Selkoe 1999).

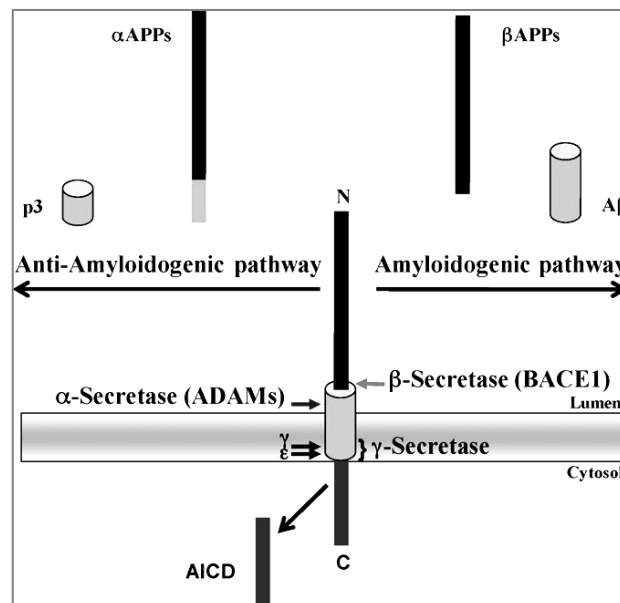
BACE1 ist ein aus 501 AS bestehendes Typ 1 TMP aus der Familie der Pepsin-ähnlichen Proteasen und gehört zur Klasse der Aspartylproteasen (Haass 2004). Sein Gen liegt auf Chromosom 11q23.3 (Bennett et al. 2000).

Nach der Synthese des Präproenzym im endoplasmatischen Retikulum (ER) entsteht durch posttranslationale Modifikationen im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) nach Abspaltung der Amino-terminalen Sequenz (NTF, AS 1-21) und des Propeptids (AS 22-45) das etwa 70 kDa schwere mature Enzym, dessen Carboxy-terminales Fragment (CTF) im Zytoplasma liegt (Bennett et al. 2000, Vassar 2001). Das nach intraluminal in die zellulären Kompartimente reichende aktive Zentrum enthält zwei Aspartyl-Reste der AS-Sequenzen DTGS (AS 93-96) und DSGT (AS 289-292). Mutationen in einem dieser Bereiche führen zur Inaktivität des Enzyms (Hussain et al. 1999, Bennett et al. 2000).

Vom TGN wird die  $\beta$ -Sekretase an die Plasmamembran transportiert und dort von Endosomen internalisiert, die das Enzym auf die zellulären Kompartimente verteilen. Aufgrund seines pH-Optimums von pH 4,5 ist BACE1 vorwiegend in den sauren Organellen des sekretorischen Systems, den Endosomen und dem TGN aktiv, an der Zelloberfläche und im ER wegen des dort herrschenden pH 7 kaum aktiv. Der BACE1-Abbau erfolgt über das Endosomen-Lysosomen-System (ELS) oder das UPS (Stockley & O'Neill 2008).

Der Hauptteil der ubiquitär lokalisierten BACE1-mRNA (Boten-RNA) wird im Pankreas und im Gehirn, speziell in den Neuronen der Hirnrinde, im Hippocampus und im Kleinhirn in glialen Zellen hingegen kaum, exprimiert. In den Neuronen ist BACE1 hauptsächlich in den präsynaptischen Nervenendigungen lokalisiert (Willem et al. 2009). Die Aktivität des Enzyms ist in Neuronen am höchsten, im Pankreas aufgrund einer Splice-Variante, die keine  $\beta$ -Sekretase-Aktivität besitzt, nur gering ausgeprägt (Kang et al. 1987, Vassar et al. 1999).

Experimentelle Daten und die Kenntnis der BACE1-Substrate weisen auf eine Funktion des Enzyms bei physiologischen Prozessen im Nervensystem hin. BACE1-knockout Mäuse zeigen als Hinweis auf diese physiologische Rolle neben zwar reduzierter Neurodegeneration und A $\beta$ -Konzentrationen auch Verhaltensauffälligkeiten, die sich u. a. in Lernstörungen, Merkfähigkeitsdefiziten und in einer gesteigerten Schreckhaftigkeit äußern (Stockley & O'Neill 2008). BACE1 scheint neben der APP-Prozessierung an der Myelinisierung peripherer Nerven, möglicherweise über sein Substrat Neuregulin-1, beteiligt zu sein (Willem et al. 2006). Weitere Substrate des BACE1 sind APLP1, APLP2 (Amyloid precursor like protein) und der an inflammatorischen Prozessen beteiligte Interleukin 1-Rezeptor Typ II (Stockley & O'Neill 2008). Abbildung 4.1.1 gibt eine Übersicht über die APP-Prozessierung durch BACE1.



**Abbildung 4.1-1: Die APP-Prozessierung**, die auf zwei Wegen durch drei Enzyme, die  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Sekretasen erfolgt. BACE1 vermittelt den 1. Schritt der amyloidogenen Proteolyse (*Amyloidogenic pathway*). Dabei entsteht das verkürzte, lösliche NTF des APP ( $\beta$ APPs), das nach extrazellulär oder in das Vesikellumen sezerniert wird. Zudem wird das NTF des A $\beta$  und das die A $\beta$ -Peptidsequenz enthaltende 99 AS-Reste lange CTF (C99) gebildet. Im nicht amyloidogenen Abbau (*Anti-Amyloidogenic pathway*) wird im 1. Schritt durch die  $\alpha$ -Sekretase durch Schneiden des APP in der A $\beta$ -Sequenz die lösliche, sezernierte Ektodomäne des APP ( $\alpha$ APPs) und das membranständige 83 AS-Reste kurze CTF (C83) gebildet. Unabhängig von den vorausgegangen Prozessen schneidet die  $\gamma$ -Sekretase im 2. Schritt im jeweiligen CTF. Aus dem C83 entsteht so das p3-Peptid. Im amyloidogenen Weg entsteht aus dem C99 in Abhängigkeit von der  $\gamma$ -Schnittstelle der  $\gamma$ -Sekretase in der TMD das 38-42 AS lange A $\beta$ -Peptid (Esch et al. 1990, Selkoe 1999, Sastre et al. 2001). Zusätzlich zu A $\beta$  und p3 wird an der  $\epsilon$ -Schnittstelle in der TMD das lösliche Fragment AICD, das nach intrazellulär abgegeben wird, gebildet (McLean et al. 1999, Zhou et al. 2007). AICD: APP intrazelluläre Domäne, APP: Amyloid  $\beta$  (A4) precursor Protein, AS: Aminosäure, CTF: Carboxy-terminales Fragment, NTF: Amino-terminales Fragment, TMD: Transmembrandomäne, (Willem et al. 2009).

Die BACE1-Aktivität und -Proteinmenge bei der AD wurde in einer Vielzahl von post mortem Studien untersucht, die meist eine Zunahme der Enzymaktivität zeigen. Zur Proteinmenge werden kontroverse Ergebnisse verzeichnet, häufig finden sich aber gesteigerte Konzentrationen (Holsinger et al. 2002, Yang et al. 2003, Dominguez et al. 2004, Hebert et al. 2008). Erhöhte BACE1-Aktivität und -Konzentrationen werden im Hippocampus, in der temporalen (Yang et al. 2003, Dominguez et al. 2004) und der frontalen Hirnrinde (Holsinger et al. 2002) detektiert. Eine positive Korrelation der Enzymaktivität mit der Anzahl der A $\beta$ -Plaques wird bei der AD berichtet (Dominguez et al. 2004).

Zudem scheint eine Verbindung zwischen der Sekretasen-Aktivität und dem ApoE zu bestehen. Studien zur AD detektieren u. a. neben einer erhöhten BACE1-Aktivität eine verminderte Aktivität der  $\alpha$ -Sekretase, deren Ausmaß bei den Alzheimer Patienten und Nicht-Dementen (ND) von der Koexpression des ApoE4 abhängig zu sein scheint (Tyler et al. 2002). Weitere Untersuchungen berichten eine direkte Abhängigkeit der erhöhten BACE1-Aktivität vom  $\epsilon$ 4-Allel im ApoE. Dabei werden auch verminderte BACE1-Konzentrationen gemessen, deren Ausmaß mit dem Schweregrad der neuropathologischen Veränderungen der AD korrelieren (Stockley et al. 2006, Stockley & O'Neill 2007).

Analysen der BACE1-Genexpression bei der AD zeigen, wie die Untersuchungen zur Proteinmenge, kontroverse Ergebnisse. Einige Studien, die das BACE1-Gen anhand der mRNA untersuchen, messen keine signifikante Änderung seiner Expression (Holsinger et al. 2002, Preece et al. 2003, Matsui et al. 2007, Hebert et al. 2008). Die Proben von Holsinger et al. stammen dabei aus dem Frontallappen, während die übrigen Autoren keine Angaben zu den untersuchten Hirnregionen machen. In wenigen Studien wird eine Zunahme der Expression des BACE1-Gens bei der AD, u. a. im Hippocampus und temporalen Kortex, diskutiert (Li et al. 2004, Harada et al. 2006).

Ursächlich für die gemessenen Expressionsunterschiede könnten möglicherweise regionale Unterschiede im Metabolismus des BACE1-Gens sein. Hinweise dafür geben Gatta et al., die sowohl bei Patienten mit AD als auch bei ND eine im Hippocampus im Vergleich zum Kleinhirn zweifach gesteigerte BACE1-Expression messen, die krankheitsunabhängig zu sein scheint (Gatta et al. 2002). Sun et al. zeigen Veränderungen der regionalen Genexpression des BACE1-Gens nur bei der AD, die

sich in der CA1-Region des Hippocampus in einer Zunahme, in fortgeschrittenen Krankheitsstadien im entorhinalen und transentorhinalen Kortex in einer Reduktion der Genexpression äußern (Sun et al. 2002).

Im Hinblick auf die genannten Studien scheint bei der AD eine erhöhte Aktivität des Schrittmacherenzym der A $\beta$ -Synthese zu bestehen, die die pathologische Akkumulation von A $\beta$  bedingen könnte. Gestützt wird diese Annahme durch die scheinbar positive Korrelation der BACE1-Aktivität mit der Menge der A $\beta$ -Plaques (Dominguez et al. 2004). Eine meist positive Korrelation der gesteigerten BACE1-Aktivität mit der Proteinmenge lässt anhand der häufig unveränderten mRNA-Expression bei der AD zunächst annehmen, dass die physiologische Regulation der Enzymmenge und -funktion nicht über die Genexpression, sondern durch posttranskriptionale oder posttranslationale Modifikationen, den Transport oder die Lokalisation von BACE1, metabolische Faktoren oder das zelluläre Milieu (z. B. pH-Änderungen) geschehen könnte. Allerdings geben einige Studien zur AD Hinweise auf eine krankheitsassoziierte, möglicherweise regional und im zeitlichen Verlauf unterschiedliche Änderung der Expression des BACE1-Gens (Sun et al. 2002, Stockley et al. 2006), die auch für die Aktivitätszunahme und erhöhte BACE1-Enzymkonzentrationen verantwortlich sein könnte. Möglicherweise besteht zudem ein Zusammenspiel mit zellulären oder anderen Faktoren. Ein erhöhter Cholesterinspiegel scheint z. B. die  $\alpha$ -Sekretase zu hemmen und könnte damit über eine Konkurrenz zum Substrat APP die BACE1-Aktivität steigern (Dominguez et al. 2004). Beim Fortschreiten der AD ist eine Beeinträchtigung der BACE1-Expression zu diskutieren, die im Krankheitsverlauf in einer abnehmenden Proteinproduktion resultieren könnte (Sun et al. 2002, Stockley et al. 2006).

Allerdings sind die kausalen Faktoren für die Beobachtungen der Enzymkinetik und des Proteinstoffwechsels von BACE1 bei der AD bisher nicht vollständig bekannt.

Die vorliegende Arbeit bestätigt eine Affektion und zeigt zudem regionale Unterschiede der BACE1-Expression bei der AD. Kontrovers zu anderen Studien wird eine signifikante Herunterregulierung der Genexpression im Hippocampus gemessen. In den übrigen untersuchten Hirnarealen bleibt die Expression des Gens im Vergleich zur KG stabil.



Im Hinblick auf die meist beobachtete Zunahme der BACE1-Aktivität und Konzentration bei der AD ist als Ursache der hier erhobenen Daten zum einen eine Reduktion der Genexpression im Sinne eines negativen Feedbacks zu diskutieren. Dieser Mechanismus könnte bei der AD dem Ziel dienen, eine gesteigerte BACE1-Aktivität und die damit einhergehende pathologische Produktion und Akkumulation des A $\beta$ -Peptids einzudämmen und somit das Fortschreiten der degenerativen Prozesse zu minimieren.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine eindeutig positive Korrelation der veränderten Genexpression zur Progredienz der AD nachgewiesen wird, ist andererseits auch zu diskutieren, dass die gemessene Herunterregulierung der BACE1-Expression eine direkte Folge der Neurodegeneration und der mit ihr einhergehenden Störung zellulärer Abläufe sein könnte. Die Daten von Sun et al., die eine Beeinträchtigung der BACE1-Genexpression in Abhängigkeit vom Fortschreiten der Erkrankung zeigen (Sun et al. 2002), würden diese Hypothese stützen. Zur Bestätigung der hier erhobenen Daten und ihrer kausalen Zusammenhänge sind weiterführende Analysen der BACE1-Expression in Korrelation zur Proteinmenge und dem Verlauf der AD nötig, insbesondere auch um die anhand der vorliegenden Daten anzunehmende Potenz von BACE1 als Biomarker für die Diagnostik und den klinischen Verlauf der AD zu bestimmen.

Die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit unveränderten Genexpression im Gtm, einer bei der AD schwer betroffenen Hirnregion, sind möglicherweise durch regionale Expressionsunterschiede des BACE1-Gens bedingt, die bereits beim Gesunden bestehen (Gatta et al. 2002) und zu einer regional unterschiedlich starken Affektion des BACE1-Genmetabolismus auch unter pathologischen Bedingungen führen könnten. Dies müsste jedoch in weiteren Expressionsstudien kontrolliert werden.

Das stabile Expressionsverhalten von BACE1 im Kleinhirn in der vorliegenden Arbeit bei der AD ist am ehesten durch die regionale Verteilung der Alzheimer typischen pathologischen Veränderungen zu erklären. A $\beta$ -Ablagerungen finden sich dort erst in den Endstadien der Erkrankung zudem in geringerer Ausprägung als in den übrigen Hirnarealen (Thal & Braak 2005), so dass eine Veränderung zellulärer Prozesse und des BACE1-Metabolismus im Kleinhirn erst sehr spät zu erwarten wäre.

In der MP Gruppe ist in der vorliegenden Arbeit im Hippocampus tendenziell ebenfalls eine verminderte Expression des BACE1-Gens auffällig. Studien zur Assoziation des BACE1-Genmetabolismus zum MP scheinen bislang nicht vorzuliegen. Beim MP ist das Risiko, eine Demenz zu entwickeln, deutlich erhöht (Reichmann & Sommer 2001, Emre 2003, Klockgether 2004, Riedel et al. 2008). Die Ätiologie der Demenz ist bisher zwar nicht bekannt, ein Zusammenhang zur Neurodegeneration wird jedoch angenommen. Als kausale Faktoren werden zum einen die zerebralen  $\alpha$ -Synuklein-Ablagerungen in den LB zum anderen das Auftreten Alzheimer-typischer Läsionen diskutiert (Brooks 2009). Bei MP-Patienten mit Demenz (MPD) werden neben kortikalen A $\beta$ -Ablagerungen (Brooks 2009) auch Veränderungen der A $\beta$ <sub>42</sub>-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis, die denen der AD gleichen, gefunden (Hu et al. 2010). Entsprechend scheint eine Beteiligung von BACE1 an dem Prozess der Demenzentwicklung bei MP denkbar und könnte die in der vorliegenden Arbeit zur AD gleichsinnig veränderte Genexpression von BACE1 erklären. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollten dahingehend in weiteren Analysen beim MP, speziell bei MPD, kontrolliert, mit dem Ausmaß einer Demenz und ggf. mit der BACE1-Enzymaktivität korreliert werden, um die Bedeutung von BACE1 auch als möglichen diagnostischen Biomarker einer dementiellen Entwicklung beim MP zu bestimmen.

#### **4.2 Genexpression des Glutamattransporters SLC1A3 (solute carrier family 1, glial high affinity glutamate transporter, member 3)**

Die AS Glutamat (Glu) als einer der wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter im ZNS ist an Lernen, Kognition und Gedächtnis, insbesondere der Langzeitpotenzierung (LTP, engl. Long-term potentiation), auf zellulärer Ebene an der Synaptogenese, der synaptischen Plastizität und der Zelldifferenzierung beteiligt (Wang & Qin 2010).

Glu ist im ZNS ubiquitär vorhanden. Ein Großteil des Neurotransmitters dient dem neuronalen Stoffwechsel, ein geringer Teil dem glialen Glu-Metabolismus und der GABA-( $\gamma$ -Aminobuttersäure) Synthese (Plaitakis & Shashidharan 2000).

Glu im ZNS wird in glutamatergen Synapsen gespeichert. Extrazellulär befinden sich nur geringste Konzentrationen, die für die physiologische Transmitter-Rezeptor-Stimulation und zur Vermeidung toxischer Effekte des Glu essentiell sind (Danbolt 2001). Daher ist die Freisetzung und die Aufnahme von Glu im synaptischen Spalt

streng reguliert (Kanai & Hediger 2004). Die Glu-Signale vermitteln die konzentrationsabhängig aktivierten Glutamatrezeptoren (GR), die Wiederaufnahme von Glu in die Synapse oder Gliazelle wird durch die Glutamattransporter (GT) realisiert.

Die schädigenden Effekte, die exzitatorische AS wie Glu durch die übermäßige Stimulation von GR auf Neurone vermitteln und damit Neurodegeneration hervorrufen können, wurden 1969 von Olney als Exzitotoxizität bezeichnet (Olney & Sharpe 1969). Exzitotoxizität durch erhöhte Glu-Konzentrationen bzw. durch Überaktivierung der GR geht mit der Störung der neuronalen bzw. zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, der Dysfunktion von Mitochondrien und anderer Zellorganellen, der vermehrten ROS- und RNS-Produktion, einem eingeschränkten Energiestoffwechsel und Zytoskelettveränderungen einher. In der Folge kann über unterschiedliche Wege, z. B. durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung von Enzymkaskaden oder die Freisetzung proapoptotischer Proteine durch die Mitochondrien, der Zelltod eingeleitet werden (Olney 1969, Martin et al. 1998). Für die Aufrechterhaltung der niedrigen extrazellulären Glu-Konzentration sind daher die GT essentiell.

Die SLC1- bzw. EAAT-Familie (EAAT, excitatory amino acid transporter) der transmembranären GT umfasst fünf hochaffine GT (SLC1A3/EAAT1/GLAST; SLC1A2/EAAT2/GLT-1; EAAT3/EAAC; EAAT4) sowie zwei neutrale AS-Transporter (ASCT1-2, glutamate/neutral amino acid transporter) im menschlichen ZNS (Kanai & Hediger 2004). Auf Chromosom 5p11-p13 liegt das Gen des 542 AS umfassenden EAAT1 (Takai et al. 1995, Stoffel et al. 1996), das Gen des 574 AS langen EAAT2 liegt auf Chromosom 11p13-p12. Physiologisch werden EAAT1, EAAT2 und ASCT2 in Glia, EAAT3 bis EAAT5 in Neuronen, ASCT1 in Neuronen und Glia exprimiert (Gegelashvili et al. 2006). EAAT1 ist im adulten Gehirn überwiegend im Kleinhirn und periventrikulär, EAAT2 im Frontalhirn und geringer im Hippocampus, EAAT4 im Kleinhirn lokalisiert (Bristol & Rothstein 1996, Kim et al. 2003).

ASCT1 und ASCT2 bewirken die  $\text{Na}^+$ -abhängige Aufnahme neutraler AS, z. B. Alanin, Serin, Zystein, Threonin, Glutamin (Gegelashvili et al. 2006). Die glialen GT EAAT1 und EAAT2 vermitteln den Hauptteil der  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -abhängigen Aufnahme von Glu

und Aspartat (Asp) aus dem synaptischen Spalt (Rothstein et al. 1996). Eine Splice-Variante des EAAT1 im ER multipler Hirnareale besitzt keine Transportfunktion für Glu, scheint aber über die Reduktion der Expression und Funktion von EAAT1 Einfluss auf die Glu-Homöostase zu nehmen (Vallejo-Illarramendi et al. 2005).

Die häufigsten akuten Ursachen von Exzitotoxizität sind zerebrale Ischämien (Beal 1992, Hazell 2007) oder traumatische Hirnverletzungen (Yi & Hazell 2006, Beschorner et al. 2007). Zudem sind neurodegenerative Erkrankungen wie die ALS (Rothstein et al. 1992, Bogaert et al. 2010), die Chorea Huntington (Young et al. 1988), die AD (Masliah et al. 2000, Hynd et al. 2004, Koutsilieri & Riederer 2007, Walton & Dodd 2007) oder der MP (Gille & Reichmann 2005, Caudle & Zhang 2009, Blandini 2010) mit Exzitotoxizität assoziiert.

Beim MP könnte möglicherweise durch eine gestörte Interaktion dopaminerger und glutamaterger Projektionen in den Basalganglien Exzitotoxizität entstehen und so Neurodegeneration mit hervorrufen (Koutsilieri & Riederer 2007, Caudle & Zhang 2009, Blandini 2010). Unter anderem bestätigt das MPTP-Modell exzitotoxische Prozesse in der Pathogenese des MP (Meredith et al. 2009).

Bei der AD scheinen das APP, A $\beta$  und das Tau-Protein über die Beeinflussung der GT und GR Exzitotoxizität zu begünstigen. A $\beta$  inhibiert in vitro die gliale Glu-Aufnahme durch die GT und steigert die Freisetzung von Glu (Koh et al. 1990, Mattson et al. 1992). Die pathologischen Proteine A $\beta$  und Tau scheinen die GR NMDAR (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren) zu aktivieren, die wiederum die Produktion von A $\beta$  und Tau steigern können (Koutsilieri & Riederer 2007). Exzitotoxizität selbst triggert die Produktion von abnormem Tau und der NFT (Thai 2002). APP hat physiologisch möglicherweise eine regulatorische, aktivierende Funktion auf GT (Li et al. 1997). Im amyloidogenen Stoffwechsel produziertes APP hingegen scheint die glialen GT zu inhibieren und so Exzitotoxizität zu fördern (Masliah et al. 2000).

Ob bei der AD oder dem MP Exzitotoxizität ein kausaler pathogenetischer Faktor ist oder sekundär auftritt, ist nicht bekannt.

Verschiedene Studien belegen einen Zusammenhang zwischen einer veränderten Expression bzw. Funktion der GT, erhöhten extrazellulären Glu-Mengen und

exzitotoxischer neuronaler Schädigung. Die experimentelle Blockade bzw. das Ausschalten der glialen GT EAAT1 und EAAT2 verursacht einen Anstieg der extrazellulären Glu-Konzentrationen und sowohl akut als auch chronisch Neurodegeneration (Rothstein et al. 1992, Rothstein et al. 1993, Rothstein et al. 1996, Tanaka et al. 1997).

Änderungen im Glu-Transport und der GT-Expression werden bei neurodegenerativen Erkrankungen neben der ALS (Rothstein et al. 1992, Shaw 1994, Bristol & Rothstein 1996), bei der AD (Jacob et al. 2007) und dem MP (Kashani et al. 2007) beschrieben. Die Untersuchungen des Glu-Transports als Zeichen der GT-Aktivität beziehen sich meist auf den Nachweis der Na<sup>+</sup>-abhängigen „Bindung“ von Glu oder Asp bzw. der Aufnahme exzitatorischer AS an den GT.

Bei Parkinson Patienten mit oder ohne Demenz scheint die Ursache der exzitotoxischen Prozesse nicht in einem veränderten Glu-Transport durch die GT zu bestehen (Cross et al. 1987, Meredith et al. 2009). Daten zur EAAT-Genexpression beim MP scheinen bisher nicht vorzuliegen.

Bei der AD gibt es sogar Hinweise auf eine systemische Beeinflussung des glutamatergen Transportsystems. Dies zeigt sich u. a. in einer verminderten Expression und Aktivität des EAAT1 in Thrombozyten und Fibroblasten, die über eine potentiell altersabhängige, physiologische Reduktion beim Gesunden hinausgeht (Zoia et al. 2004, Zoia et al. 2005). Studien zur zerebralen glutamatergen Signaltransduktion bei der AD zeigen im parietalen, frontalen und temporalen Kortex eine Abnahme der „Glu-Bindung“, also der Glu-Aufnahme durch die GT, um bis zu 60% (Cross et al. 1987, Hardy et al. 1987, Cowburn et al. 1988, Chalmers et al. 1990, Scott et al. 1995). Allerdings werden kontrovers dazu ebenso unveränderte GT-Aktivitäten beschrieben (Beckstrom et al. 1999). Die reduzierte GT-Aktivität kann nicht durch einen Untergang der Glia verursacht sein, da die AD mit einer reaktiven Gliose einhergeht. Vielmehr wird eine Assoziation zur progredienten neuronalen Degeneration insbesondere zum Verlust der exzitatorischen Synapsen angenommen (Cross et al. 1987, Cowburn et al. 1988). Zudem ist eine durch die degenerativen Vorgänge ausgelöste Funktionsstörung der Glia selbst, die zu einer beeinträchtigten Transporterfunktion oder einer eingeschränkten GT-DNA-Synthese mit der Folge einer verminderten Glu-Speicherung führen könnte, zu diskutieren.

Im Verlauf der AD scheinen Veränderungen der GT-Proteinsynthese aufzutreten. Studien belegen bisher jedoch keine eindeutigen Zusammenhänge zur glialen GT-Expression auf der Genebene (Li et al. 1997, Scott et al. 2002, Thai 2002). Lediglich eine der analysierten Studie zeigt eine minimal aber statistisch nicht signifikant gesteigerte gliale Expression des EAAT2 im frontalen Kortex und Hippocampus von Alzheimer Patienten, die aufgrund einer vermindert gemessenen Proteinmenge als kompensatorisch zum Ausgleich von Störungen des GT-Stoffwechsels, z. B. der beeinträchtigten Proteinsynthese, diskutiert wird (Li et al. 1997).

Bei der AD besteht scheinbar eine räumliche Assoziation EAAT2 haltiger Glia zu den A $\beta$ -Plaques (Li et al. 1997). Zum anderen scheinen unter den pathologischen Bedingungen der AD auch Neurone die glialen GT EAAT1 und EAAT2 zu exprimieren, was als pathologische Steigerung der GT-Expression zum Ausgleich einer glialen Glu-Minderspeicherung und zur Erhaltung der Glu-Homöostase im synaptischen Spalt diskutiert wird. Diese neuronal synthetisierten GT sind dabei fast ausschließlich in Neuronen mit Tau-Pathologie und dort in der Nähe des abnormen Tau-Proteins lokalisiert (Scott et al. 2002, Thai 2002). Die räumliche Assoziation der GT nahe den pathologischen Proteinen Tau oder A $\beta$  könnte auf einen Zusammenhang zwischen der veränderten GT-Synthese und der Neurodegeneration hinweisen. EAAT2 werden aber auch in Neuronen von Patienten mit AD ohne Alzheimer typische Läsionen gefunden, was möglicherweise auf einen sehr frühen Beginn exzitotoxischer Prozesse, die das Auftreten der pathologischen AD-Ablagerungen auslösen könnten, deutet (Thai 2002).

Die vorliegende Arbeit zeigt eine Affektion der GT-Produktion auf der Genebene sowohl bei der AD als auch beim MP. Sie weist damit insbesondere bei der AD auf einen Zusammenhang von der veränderten glutamatergen Signaltransduktion zur GT-Produktion hin.

Bei beiden Erkrankungen, bei der AD statistisch signifikant, ist im Hippocampus die Expression des glialen GT EAAT1 herunterreguliert, was die bei der AD in anderen Studien verzeichnete Abnahme der GT-Aktivität erklären könnte.

Die bei beiden Erkrankungen auftretende Gliosereaktion erklärt die vorliegenden Ergebnisse nicht. Vielmehr ist ein Zusammenhang zu den neurodegenerativen Prozessen anzunehmen. Die GT-Expressionsänderung könnte nach den erhobenen

Daten speziell ein Resultat der degenerativen Vorgänge sein, die im Hippocampus insbesondere bei der AD aber auch beim MP bereits vor der klinischen Manifestation der Krankheiten auftreten (Braak et al. 1999, Braak & Del Tredici 2006). Diese Annahme wird gestützt durch eine in der vorliegenden Arbeit bei der AD im Hippocampus bereits in den niedrigen Krankheitsstadien nach Braak reduzierte EAAT1-Expression. Gliale GT sind aufgrund ihrer Funktion nahe den glutamatergen Synapsen lokalisiert (Kim et al. 2010). Durch den Neuronenverlust beim MP und insbesondere bei der AD könnte zum einen die sinkende synaptische Dichte zu einer verminderten glutamatergen Signaltransduktion führen und die hier gemessene Abnahme der glialen GT-Expression begründen. Zum anderen sind mit der Neurodegeneration einhergehende Störungen benachbarter zellulärer Prozesse, die auch die Glia betreffen könnten, als Ursache der veränderten GT-Expression zu diskutieren. Danach wären die in der vorliegenden Arbeit detektierten Veränderungen des GT-Genmetabolismus bei beiden Erkrankungen als sekundäres Ereignis in Folge der pathologischen Prozesse zu werten, das durch eine konsekutiv gestörte Glu-Homöostase Exzitotoxizität steigern und die Progredienz der Neurodegeneration weiter fördern könnte.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse, die insbesondere bei der AD auf eine mögliche Beeinträchtigung der GT-Expression bereits in niedrigen Krankheitsstadien hinweisen, wäre auch denkbar, dass die Abnahme der GT-Expression ein frühes Ereignis der Erkrankungen sein könnte, das über die resultierende Exzitotoxizität neurodegenerative Prozesse einleitet oder begünstigt. Exzitotoxizität könnte dann auch als ein primäres bzw. kausales Ereignis in der Pathogenese der Erkrankungen angenommen werden.

Besonders bemerkenswert in der vorliegenden Arbeit ist die signifikante Zunahme der Expression des vorwiegend zerebellären EAAT1 im Kleinhirn bei der AD und dem MP, die zumindest bei der AD eindeutig positiv mit der Schwere der Erkrankung korreliert. Bei der AD werden im Endstadium im Kleinhirn A $\beta$ -Ablagerungen gefunden, beim MP ist das Kleinhirn nicht involviert (Thal et al. 2002, Braak et al. 2004, Alafuzoff et al. 2009). Bei beiden Erkrankungen könnte die Zunahme der EAAT1-Expression im Kleinhirn einem kompensatorischen glialen Mechanismus zum Ausgleich gestörter GT-Funktionen in anderen Hirnarealen, also zur Aufrechterhaltung der Glu-Homöostase

und zur Minderung der Exzitotoxizität im Gewebe entsprechen, der protektiv wirken und dort lange erhalten bleiben könnte.

Das ähnlich veränderte Verhalten der GT-Genexpression bei der AD und dem MP in der vorliegenden Arbeit kann zumindest bestätigen, dass Exzitotoxizität einen pathogenetischen Mechanismus verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen darstellt. Ob die Veränderungen Folge der Neurodegeneration sind oder diese verursachen, kann allerdings nicht sicher differenziert werden.

### **4.3 Genexpression des Glutamatrezeptors GRINL1A (glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-like 1A)**

Neben den GT scheinen auch die GR an exzitotoxischen Vorgängen bei der AD und dem MP beteiligt zu sein. Es besteht eine gesteigerte GR-Aktivierung im nigrostriatalen System von Patienten mit MP, AD und gemischter Pathologie, die zumindest beim MP vom Ausmaß des DA-Defizits und des DAT-Verlustes (DA-Transporter) abhängig zu sein scheint. Aufgrund dieser Kenntnisse wird eine physiologische Rolle des DA als Negativregulator der Glu-Freisetzung diskutiert (Weihmuller et al. 1992, Ulas et al. 1994, Caudle & Zhang 2009, Dong et al. 2009, Meredith et al. 2009). Beim MP könnte Exzitotoxizität durch eine gestörte Interaktion dopaminerger und glutamaterger Projektionen der Basalganglien bereits früh ausgelöst werden und Neurodegeneration begünstigen (Caudle & Zhang 2009). Bei der AD scheint A $\beta$  die NMDAR vermittelte LTP im Hippocampus zu inhibieren (Yamin 2009). Die Schädigung der NMDAR könnte für die kognitiven Defizite bei der AD ursächlich sein.

Für die Bedeutung einer beeinträchtigten GR-Funktion in der Pathogenese dieser Erkrankungen spricht die Verbesserung der klinischen Symptomatik durch die Anwendung von NMDAR-Antagonisten. Bei der AD resultiert eine Besserung oder Stabilisierung der kognitiven Funktionen (Harris et al. 1996, Lauderback et al. 1999, Miguel-Hidalgo et al. 2002), beim MP eine Linderung der motorischen Symptome (Dong et al. 2009).

Zur Familie der GR gehören die ionotropen NMDAR (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren), die AMPAR ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptoren), die Kainat-Rezeptoren und die metabotropen GR (mGluR).



Die in postsynaptischen Membranen lokalisierten NMDAR sind Heterotetramere und besitzen an ihren Untereinheiten NR1 und NR2, die die Funktion und Verteilung der Rezeptoren im Gehirn regulieren, Bindungsstellen für weitere Liganden (z. B. Glyzin, Aspartat, Polyamine, Zink). NMDAR sind an der Bildung des Gedächtnisses und am Lernen essentiell beteiligt (Plaitakis & Shashidharan 2000). Die langsame Signaltransduktion der Kationenkanäle, die für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  permeabel sind, ermöglicht ihre Funktionen bei der neuronalen Entwicklung und der synaptischen Plastizität, speziell der LTP für Gedächtnisvorgänge und Lernprozesse (Plaitakis & Shashidharan 2000).

Die postsynaptischen AMPAR mit den vier Untereinheiten GluR1 bis GluR4 werden physiologisch nur durch Glu aktiviert. Sie vermitteln schnelle exzitatorische Transmissionen. Kainat-Rezeptoren sind prä- und postsynaptisch lokalisiert und nahezu impermeabel für  $\text{Ca}^{2+}$  (Lau & Tymianski 2010). Die metabotropen GR führen meist über die G-Protein gekoppelte Freisetzung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  zur Aktivierung der Zielzelle (Wang & Qin 2010).

Der Metabolismus der GR scheint bei der AD und dem MP verändert zu sein. Bei der AD ist die Datenlage zur Genexpression, der NMDAR-Konzentration und -Aktivität nicht eindeutig. Im temporalen und frontalen Kortex wird häufig eine Reduktion der GR beschrieben (Greenamyre et al. 1985, Chalmers et al. 1990, Guan 2008). Allerdings wird auch eine unveränderte Rezeptorexpression und -aktivität (Cowburn et al. 1988, Porter et al. 1993) oder eine Aktivitätssteigerung (Lee et al. 2002) berichtet. Obwohl bisher nicht geklärt ist, ob Veränderungen der NMDAR-Expression zur Unter- oder Überaktivierung der Rezeptoren führen (Lee et al. 2002, Guan 2008), wird diskutiert, dass eine Aktivitätssteigerung der GR über die Vermittlung von Exzitotoxizität zur Synapsenschädigung und Neurodegeneration führen könnte (Lee et al. 2002). Zum anderen könnte der Verlust von GR im Hinblick auf ihre physiologische Funktion mit der fortschreitenden Demenz bei der AD assoziiert sein. Auch in Bezug auf die regionale Verteilung der NMDAR in Abhängigkeit von ihren Untereinheiten sind die Daten bei der AD nicht einheitlich. Es werden reduzierte oder unveränderte Konzentrationen der NR1-Untereinheit im Hippocampus sowie eine Zunahme dieser im frontalen und temporalen Kortex gemessen. Im Kleinhirn scheint die Expression beider

NMDAR-Untereinheiten unverändert zu sein (Bi & Sze 2002, Guan 2008). Diese regionalen Unterschiede sind möglicherweise von der Funktion der Untereinheiten abhängig.

Beim MP wird eine Zunahme der NMDAR-Konzentrationen und -Aktivität beschrieben (Weihmuller et al. 1992, Ulas et al. 1994).

Die in Studien berichtete unveränderte Expression der NMDAR bei der AD kann in der vorliegenden Arbeit im Hippocampus, Gfm und Gtm bestätigt werden. Auch beim MP, bei dem diese Hirnareale im Verlauf betroffen sind, findet sich dort keine Änderung der Genexpression der GR bei allen Untersuchten. Die Ursache der in anderen Studien beobachteten, veränderten GR-Aktivität bei der AD und dem MP scheint anhand dieser Daten nicht von der Genexpression abzuhängen sondern in einer Affektion der Proteinsynthese z. B. durch posttranskriptionale Modifikationen zu bestehen. In der vorliegenden Arbeit wird in den Endstadien des MP allerdings eine signifikante Reduktion der GR-Expression im Gtm im Vergleich zu den ND sowie ein signifikanter Expressionsabfall zu den niedrigen Krankheitsstadien gemessen. Die vom Neuronenverlust begleiteten Parkinson-typischen Veränderungen befallen in einer spezifischen Sequenz während der Erkrankung zunehmend kortikale Hirnareale (Braak et al. 2004). Im Hinblick auf die hier gemessene Abnahme der GR-Expression in den späten Stadien des MP könnte also abhängig vom Ausmaß und der Schwere der neuronalen Veränderungen im Gehirn doch eine Beeinflussung der GR-Synthese auf Genebene auftreten, die bereits gestörte striatale glutamaterge und dopaminerge Interaktionen (Caudle & Zhang 2009) sogar noch verstärken könnte.

In der vorliegenden Arbeit wird weiterhin eine signifikante Zunahme der NMDAR-Expression bei der AD im Kleinhirn gemessen. Da bei der AD vielfach eine Aktivitätsabnahme der NMDAR beschrieben wird, könnte die hier detektierte Expressionszunahme ein kompensatorischer Versuch sein, die physiologische Rezeptorfunktion durch die lokal erhöhte Produktion aufrecht zu erhalten. Dafür spricht, dass bereits in den niedrigen Krankheitsstadien der AD, in denen das Kleinhirn nicht betroffen ist, die Expression des Rezeptorgens signifikant erhöht ist. Bei fortgeschrittener Erkrankung, wenn die neuropathologischen Prozesse auch auf zerebelläre Areale übergreifen (Thal & Braak 2005), ist die Expressionssteigerung dann

nicht mehr so ausgeprägt. Diese Daten weisen auch bei der AD auf eine mögliche Beeinträchtigung der GR-Expression in Abhängigkeit vom Ausmaß der neuronalen Degeneration hin, die eventuelle kompensatorische Mechanismen der glutamatergen Signaltransduktion minimiert.

Beim MP findet sich im Kleinhirn, das von der Neurodegeneration nicht betroffen ist (Braak et al. 2004), eine tendenziell ebenfalls gesteigerte Expression des GR-Gens. Davon ausgehend, dass die gesteigerte Expression mit einer erhöhten Aktivität des GR einhergeht, stützen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten die in der Literatur vertretene Annahme vorhandener kompensatorischer Mechanismen zur Aufrechterhaltung der exzitatorischen Signalweiterleitung, die beim MP aufgrund des dopaminergen Defizits striatärer Neurone beeinträchtigt ist (Koutsilieri & Riederer 2007, Caudle & Zhang 2009).

Eine Bestimmung der Untereinheiten ist in dieser Arbeit nicht erfolgt. Möglicherweise besteht aber ein Zusammenhang zwischen der bei beiden Erkrankungen beobachteten regional unterschiedlichen Affektion der Genexpression zur Lokalisation der Untereinheiten der GR und ihrer Funktion im Gehirn. Um dies zu bestätigen sind jedoch detailliertere Untersuchungen nötig.

Die kausalen Faktoren, die auf den Genmetabolismus der GR bei der AD und dem MP Einfluss nehmen, müssen noch identifiziert werden. Die Daten der vorliegenden Arbeit weisen aber bei beiden Erkrankungen auf eine mögliche Affektion der GR-Expression als Resultat der Neurodegeneration hin.

#### **4.4 Genexpression der vacuolar protein sorting Proteine VPS35 und VPS41**

Der Abbau abnormer und alter Proteine oder anderer Bestandteile der Zelle erfolgt durch zwei Systeme. Zum einen ist dies das UPS zum anderen das Endosomen-(Autophagozytose)-Lysosomen-System (ELS), an dessen Ende meist das Lysosom steht.

Über das ELS werden exogene Substanzen durch Endo-, Pino- oder Phagozytose aufgenommen, z. T. in prälysosomale Sortierungskompartimente verteilt, zu denen „frühe“ (Sortierungs-, Recyclingendosomen) und „späte“ (multivesikuläre Körperchen, prävakuoläre Kompartimente) Endosomen gehören, am Ende dem Lysosom zugeführt und abgebaut (Hoffman-Sommer & Rytka 2007, Boland et al. 2008).

Zelleigene Substanzen werden über Autophagozytose (Autophagie) auf drei Wegen abgebaut. Die Chaperon vermittelte Autophagie (CMA, engl. chaperone mediated autophagy) eliminiert Proteine mit einem KFERQ-ähnlichen Motif, z. B. APP und  $\alpha$ -Synuklein, über das Lysosom (Nixon 2007, Shacka et al. 2008). Bei der Mikroautophagozytose umschließt das Lysosom die abzubauende Substanz direkt. Durch Makroautophagozytose werden für das UPS zu große Zellbestandteile zunächst in ein Autophagosom (AV, autophagozytärer Vesikel) aufgenommen, das die nachfolgenden Fusionen mit den Kompartimenten des ELS einleitet (Boland et al. 2008, Shacka et al. 2008), und abgebaut. Da in gesunden Neuronen kaum Autophagosomen gefunden werden, wurde zunächst angenommen, dass dort nur wenig Autophagozytose abläuft. Dies scheint jedoch durch eine hohe neuronale Autophagozytoseaktivität mit rascher Elimination der abbauenden Kompartimente bedingt zu sein, die selbst bei Zunahme autophagozytärer Prozesse, z. B. bei zellulärem Stress, effektiv bleibt (Boland et al. 2008). Die Lysosomen selbst sind nicht nur für die Detoxifizierung der Zelle verantwortlich. Sie fungieren auch bei der Regulierung der Vesikelfusion, von Oberflächenrezeptoren, der Metabolitenspeicherung und der Kontrolle der zellulären Homöostase (Hoffman-Sommer & Rytka 2007).

Für die normale Zellfunktion spielen vielfältige, streng regulierte Transportvorgänge und -wege, für deren Organisation ebenfalls das lysosomale System verantwortlich ist, eine wichtige Rolle. Die Transportmechanismen sind bei allen Eukaryoten hoch konserviert (Hoffman-Sommer & Rytka 2007). In Neuronen wird der Transport neu synthetisierter Bestandteile aus dem Perikaryon im Zellkörper über die MT und sogenannte Motorproteine anterograd vermittelt (De Vos et al. 2008). Da Endo- und Autophagosomen in den Axonendigungen oder Dendriten, neuronale Lysosomen aber vorwiegend am Perikaryon lokalisiert sind, ist der Transport abzubauender Substanzen retrograd, z. T. über weite Distanzen, nötig (Nixon 2007).

An der Regulierung des lysosomalen Systems und des zellulären Transports, insbesondere an der Sortierung von Transportvesikeln und -gütern, sind sogenannte Sortierungskomplexe beteiligt. Zu diesen gehören die vakuolären Sortierungsproteine (VPS, engl. vacuolar protein sorting), die in Hefen und Eukaryoten exprimiert werden (Nixon et al. 2008). Die VPS-Proteine sind wichtig für die Erhaltung der Zellintegrität.

Die Deletion bestimmter VPS-Gene zieht z. B. einen Anstieg von ROS und somit von OS in der Zelle nach sich (Flower et al. 2007).

Das humane VPS35-Protein ist zusammen mit VPS26, VPS29 sowie Sorting Nexin 1 (SNX1) und Sorting Nexin 2 (SNX2) Bestandteil des Retromer Komplexes, der am retrograden Transport von Proteinen, an der intrazellulären Proteinverteilung und der Sortierung lysosomaler Hydrolasen beteiligt ist. Es wird vermutet, dass VPS35 dabei der Erkennung des Transportgutes dient (Haft et al. 2000, Gullapalli et al. 2004, Rojas et al. 2007).

VPS41 wird in allen menschlichen Geweben exprimiert. Es ist für die Sortierung vakuolärer Proteine, die physiologische Vakuolenmorphologie, den post Golgi Proteintransport und den vesikulären Transport, insbesondere für die Erkennung von Vesikeln und Membranstrukturen und deren Fusion mit dem Lysosom, verantwortlich (McVey et al. 2001). Hefen weisen bei Veränderungen des VPS41-Gens eine gestörte Vakuolenmorphologie und einen beeinträchtigten Transport von Vesikel- und Lysosomenbestandteilen auf (Radisky et al. 1997).

Die Schädigung des ELS resultiert in der Störung der zellulären Integrität (Boland et al. 2008, De Vos et al. 2008, Nixon et al. 2008). Ein wesentlicher Prozess, der mit der Beeinträchtigung von autophagozytären und transportierenden Vorgängen einhergeht, ist das Altern (Nixon et al. 2008). Zudem sind Defekte im Autophagozytose-System Ursachen von u. a. genetisch bedingten lysosomalen Speicherkrankheiten wie den Mucopolysaccharidosen oder den Sphingolipidosen. Sie sollen auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der AD, dem MP oder der Chorea Huntington eine Rolle spielen (Hoffman-Sommer & Rytka 2007).

Bei der AD als auch beim MP scheinen insbesondere Mechanismen, an denen die VPS-Proteine beteiligt sind, geschädigt zu sein. Hinweisend auf eine Affektion bzw. Störung des ELS bei der AD werden in veränderten Neuronen und dystrophen Neuriten vermehrt Autophagosomen gefunden. Dies könnte zum einen auf die Induktion von Autophagie zum anderen auf einen beeinträchtigten Abbau autophagozytärer Kompartimente durch das Lysosom deuten. Als kausale Mechanismen einer möglicherweise verminderten Elimination von AV werden neuronale Schädigungen, die zu Störungen des retrograden Transports und zur Akkumulation der Vesikel in Axonen

oder Dendriten führen, oder strukturelle Veränderungen der Autophagosomen selbst diskutiert (Boland et al. 2008). Die bekannten frühen Störungen des axonalen Transports bei der AD mit neuritischer Dystrophie könnten nicht nur durch die Tau-Pathologie sondern auch durch Schädigungen der Transportvesikel selbst verursacht sein (Stokin et al. 2005, De Vos et al. 2008).

Das ApoE, das die Einschleusung von APP in die Zelle erhöht, und die Mutationen im PS1-, PS2- und im APP-Gen bei der FAD, die von einem veränderten Transport der Sekretasen oder APP-haltiger Kompartimente begleitet sind, beeinflussen über Prozesse, an denen das ELS beteiligt ist, die Amyloidogenese (Nixon 2007).

Beim MP gibt es Hinweise auf Störungen im neuronalen Transport und im Abbau des  $\alpha$ -Synukleins. Das Protein selbst scheint, z. B. durch Mutationen oder Überexpression, die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen zu hemmen, die eigene als auch die Aufnahme anderer Zellbestandteile ins Lysosom und den eigenen axonalen Transport zu mindern. Die Akkumulation und Ablagerung des nicht abgebauten  $\alpha$ -Synukleins in den pathologischen LB kann die Folge daraus sein (De Vos et al. 2008, Nixon et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden aus der Familie der VPS-Proteine die Gene von VPS35 und VPS41 untersucht und eine Beeinflussung dieser Komponenten des Transportsystems bereits auf Genebene bei der AD und dem MP nachgewiesen.

Im Kleinhirn nimmt die Expression beider Gene bei der AD statistisch signifikant sowie die von VPS35 beim MP tendenziell zu. Im Hippocampus ist die Expression von VPS41 bei beiden Erkrankungen statistisch signifikant reduziert, VPS35 zeigt lediglich bei der AD eine tendenzielle Abnahme seiner Expression. Im Gtm ist die Expression beider Gene beim MP in den niedrigen Krankheitsstadien nach H&Y zunächst erhöht, von VPS41 statistisch signifikant, während in den späten verglichen mit den frühen Krankheitsstadien beide Gene einen signifikanten Expressionsabfall zeigen.

Aufgrund der bei beiden Erkrankungen meist gleichsinnig veränderten Expression der VPS-Gene ist zu diskutieren, dass diese Änderung ein Resultat von fortschreitenden degenerativen Prozessen im Gehirn ist und keine krankheitsspezifische Affektion des Genmetabolismus besteht. Dafür spricht auch die verminderte Expression von VPS35 und VPS41 im Hippocampus, der bei beiden Erkrankungen eher früh und insbesondere bei der AD schwer betroffen ist. Im temporalen Kortex des MP, der auch im Verlauf der

Erkrankung von den pathologischen Veränderungen befallen wird (Braak et al. 2003a, Braak et al. 2004), weist der in den hohen Krankheitsstadien signifikante Abfall der Expression beider Gene ebenfalls auf eine Abhängigkeit des Genmetabolismus von der fortschreitenden Neurodegeneration hin. Es ist jedoch bemerkenswert, dass im temporalen Kortex bei der AD, obwohl dieser während der Erkrankung stark geschädigt wird, in der vorliegenden Arbeit keine Expressionsänderung beider Gene im Vergleich zu den ND gemessen wird.

Das Kleinhirn ist histopathologisch bei der AD nur in den Endstadien und beim MP nicht betroffen (Braak et al. 2004, Thal & Braak 2005). Als Ursache der im Kleinhirn bei beiden Erkrankungen in der vorliegenden Arbeit gesteigerten VPS-Expression wäre ein kompensatorisch veränderter Genmetabolismus zur Aufrechterhaltung der für die Neuronen lebensnotwendigen Transport- und Abbauprozesse im Gehirn denkbar. Da das Kleinhirn bei beiden Krankheiten lange weitgehend intakt bleibt, könnten dort kompensatorische Mechanismen auch bei klinisch weit fortgeschrittener Krankheit noch funktionieren. Beim MP wird zudem in den niedrigen Krankheitsstadien im Gtm, der zu diesem Zeitpunkt noch gering betroffen ist, eine Steigerung der VPS-Expression gemessen. Dies könnte möglicherweise ebenfalls einen kompensatorischen Mechanismus zum Erhalt der neuronalen Integrität entsprechen könnte, der in den fortgeschrittenen Krankheitsstadien jedoch nicht aufrecht erhalten werden kann.

Die Mechanismen, die zur Veränderung autophagozytärer Prozesse und des Transports bei neurodegenerativen Erkrankungen führen, sind im Einzelnen nicht bekannt. Sie könnten als Folge der Neurodegeneration auftreten, diese begleiten oder verursachen (Hardy & Higgins 1992). Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten weisen bei der AD und dem MP eher auf sekundäre Veränderungen des Genmetabolismus als Folge und nicht als Ursache der Neurodegeneration hin und kräftigen damit die Annahme partiell gemeinsamer pathogenetischer Mechanismen bei beiden Krankheiten.

#### **4.5 Genexpression des olfaktorischen Rezeptors OR10H3 (Olfactory Receptor, Family 10, Subfamily H, Member 3)**

Die Geruchsrezeptoren (OR) sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren der primären Riechsinneszellen innerhalb des Riechepithels der Nase. Ihre Gene sind Teil der größten

Genfamilie des menschlichen Genoms und mit Ausnahme von Chromosom 20 und Y auf allen Chromosomen verteilt. Der Mensch hat etwa 360 funktionstüchtige OR-Gene, die für die gleiche Zahl von Rezeptoren kodieren. Durch alternatives Splicing werden weitere Rezeptormoleküle gebildet. Eine einzelne Riechsinneszelle produziert nur eine Art von OR. Jeder Mensch besitzt eine individuelle Kombination der OR.

In der Riechschleimhaut sitzen die OR an der apikalen Seite der Sinneszellen, basal befindet sich das Axon. Die Axone bündeln sich zu den Fila olfactoria, in ihrer Gesamtheit zum Nervus olfactorius, der in der Frontobasis des Schädels in den Bulbus olfactorius (BO) mündet. Der BO als histogenetische „Ausstülpung“ der Großhirnrinde bildet den primären olfaktorischen Kortex. Von dort erfolgt die Signalweiterleitung über den Tractus olfactorius an den sekundären olfaktorischen Kortex (u. a. AON, Teile der Amygdala, des transentorhinalen und entorhinalen Kortex), von diesen zu den tertiären olfaktorischen Arealen (u. a. der orbitofrontale Kortex, Gyrus cinguli, Inselkortex, Striatum, Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus). Zudem scheint das Kleinhirn durch olfaktorische Stimuli aktiviert zu werden. Es wird eine Kontrollfunktion des Kleinhirns über das Einatemvolumen in Abhängigkeit von der Duftstoffkonzentration diskutiert. Der Hippocampus, der an Prozessen von Gedächtnis und Emotionen beteiligt ist, steht als tertiäres olfaktorisches Areal afferent mit dem orbitofrontalen Kortex, der olfaktorische Informationen verarbeitet, in Verbindung. Das komplexe Netzwerk ist über diese Projektionen und über zum Verbindungen entorhinalen und transentorhinalen Kortex für die Erkennung und Diskrimination von Duftstoffen sowie deren Einfluss auf Verhalten, Emotionen und Gedächtnis verantwortlich (Albrecht & Wiesmann 2006).

Ein gradueller Verlust der Riechfähigkeit mit dem Alter ist häufig, da das Riechepithel altersabhängig abnimmt (Rawson et al. 1998). Eine besondere Beeinträchtigung des Riechsystems besteht als frühes Ereignis sowohl beim MP als auch bei der AD und kann den eigentlichen krankheitsspezifischen Symptomen um Jahre vorausgehen (Doty et al. 1987, Devanand et al. 2000, Doty 2007). Eine Hyposmie gilt speziell beim MP als Frühsymptom und wird bei bis zu 90% der Patienten, sowohl bei den idiopathischen als auch den familiären Formen, gefunden (Doty 2007, Doty 2008, Haehner et al. 2009).

Die Riechfähigkeit von Patienten mit dem idiopathischen MP und der sporadischen AD wurde vielfach untersucht. In Studien (Ansari & Johnson 1975, Quinn et al. 1987, Doty



et al. 1988, Doty et al. 1992, Stern et al. 1994, Hawkes et al. 1997, Daum et al. 2000, Kobal et al. 2000, Tissingh et al. 2001) zur psychophysischen olfaktorischen Testung mittels Duftstoffen („University of Pennsylvania Smell Identification Test“ [UPSIT] oder „Sniffin-Sticks“) bei MP werden kontroverse Ergebnisse zum Zusammenhang vom Ausmaß der Hyposmie zu dem Alter und dem Geschlecht der Patienten bzw. zu der Dauer, dem Stadium oder der Therapie der Erkrankung sowie zu den motorischen Symptomen oder der Kognition verzeichnet. Zumeist wird keine eindeutige Verbindung gefunden (Ansari & Johnson 1975, Quinn et al. 1987, Doty et al. 1988). Andere, so auch elektrophysiologische Untersuchungen mittels olfaktorisch evozierter Potenziale (OEP), belegen einen Zusammenhang zur Schwere der Erkrankung (Barz et al. 1997, Tissingh et al. 2001).

Psychophysische und elektrophysiologische Studien zur AD zeigen, dass die Hyposmie der dementiellen Entwicklung nicht nur deutlich vorausgehen kann (Doty et al. 1987, Sakuma et al. 1996, Graves et al. 1999, Devanand et al. 2000) sondern möglicherweise auch positiv mit der Schwere der Demenz korreliert (Doty et al. 1987).

Es gibt verschiedene Erklärungsmodelle zur Ursache der Schädigung des Riechsystems bei der AD und dem MP. Zum einen wird ein Zusammenhang zwischen der Degeneration des olfaktorischen Systems und der zerebralen Neurodegeneration vermutet. Beim MP stützen insbesondere histopathologische Untersuchungen die Annahme, dass eine progrediente Schädigung und Funktionsstörung der olfaktorischen Systeme von den primären Sinneszellen bis zu den sekundären und tertiären olfaktorischen Hirnarealen mit der fortschreitenden Neurodegeneration verknüpft sein könnte. Die Untersuchungen von Braak et al. zeigen den primären, in präklinischen Stadien auftretenden Befall des olfaktorischen Systems, insbesondere des BO und AON, durch die pathologischen Proteinablagerungen, der für das Auftreten der Hyposmie noch vor den typischen motorischen Symptomen ursächlich sein kann (Braak et al. 2003a, Braak & Del Tredici 2006). Die neuropathologischen Veränderungen im peripheren Riechsystem entsprechen denen der betroffenen Hirnregionen (Doty 2007). Dabei scheint eine positive Korrelation vom Ausmaß der LB-Pathologie im BO und AON und dem neuronalen Zelluntergang mit der Krankheitsdauer bei Patienten mit dem idiopathischen MP zu bestehen (Pearce et al. 1995).

Neuropathologische Veränderungen, d. h. dystrophe Neuriten, PHF, NFT oder LB, im BO und Riechepithel sind auch bei der AD bekannt (Doty 2007, Doty 2008). Bei Patienten mit der sporadischen AD gibt es allerdings kontroverse Daten, ob das Ausmaß der histopathologischen Marker im Riechepithel der Schwere der Erkrankung entspricht. Während einige Studien eine positive Korrelation nachweisen (Arnold et al. 2010), können andere diese nicht bestätigen (Duda et al. 1999). Auch das zeitliche Auftreten der Veränderungen ist nicht eindeutig geklärt. Da eine frühe Beteiligung des transentorhinalen und des entorhinalen Kortex als sekundäre olfaktorische Areale besteht, ist nicht sicher zu sagen, ob die Hyposmie bei der AD auf die degenerativen Veränderungen der peripheren Riechsinneszellen und des BO oder auf die Störung der zentralen Signalweiterleitung zurückzuführen ist (Hawkes 2003).

Da alle beim MP und der AD befallenen Hirnareale durch anatomische Bahnen miteinander verbunden sind, wird in der Literatur weiterhin diskutiert, dass für das Fortschreiten der pathologischen Prozesse die axonalen Kontakte zwischen den betroffenen Neuronen Voraussetzung sein könnten (Thal et al. 2002, Alafuzoff et al. 2009, Braak & Del Tredici 2010). Dies führte u. a. zu der olfaktorischen Vektorhypothese (engl. „olfactory vector hypothesis“), die annimmt, dass ein bislang unbekanntes neurotropes Pathogen durch die Nase eintritt, über die neuronalen Verbindungen fortgeleitet wird, diese schädigt und damit das morphologische und klinische Bild der Erkrankungen hervorruft (Doty 2008, Braak & Del Tredici 2010). Eine entsprechende pathogene Wirkung exogener Substanzen, wie über die Nase aufgenommene Viren oder Umweltgifte, auf das ZNS ist bekannt (Doty 2008, Lerner & Bagic 2008).

Auch unspezifische Schädigungen des peripheren Riechsystems, speziell des Riechepithels, bzw. schwere Beeinträchtigungen des Geruchssinnes könnten pathologische Veränderungen im ZNS, insbesondere des olfaktorischen Systems, auslösen. MRT-Studien zeigen entsprechend signifikant verminderte Volumina der grauen Substanz im präfrontalen Kortex, geringeren Grades im Hippocampus, im orbitofrontalen und parahippocampalen Kortex, in der Insel und im Kleinhirn von Patienten mit einer Anosmie. Das Ausmaß der zerebralen Veränderungen scheint dabei mit der Krankheitsdauer zuzunehmen und unabhängig von der Ursache der Riechstörung zu sein (Bitter et al. 2010). Bei Tieren werden nach einer Bulbektomie

neben Neurodegeneration im Temporallappen und Hippocampus sogar vermehrt A $\beta$ -Ablagerungen im Hippocampus gefunden, die denen der AD ähneln (Doty 2008).

OR, die in sensorischen Neuronen des Riechepithels und des BO exprimiert werden, sind Markerproteine olfaktorischer Neurone, die zu den Neuronen des olfaktorischen Traktes im Gehirn projizieren. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Expression der OR im Riechepithel und im BO bei der AD zeigen eine signifikant verminderte Expression der Rezeptoren. Es wird diskutiert, dass bei der AD diese Abnahme der OR-Expression im peripheren Riechsystem wegen ihrer Projektionen zu den zerebralen olfaktorischen Neuronen durch die ablaufende Neurodegeneration verursacht sein könnte (Zhu et al. 2009).

Ob primäre Schädigungen des Riechepithels zu Beeinträchtigungen der olfaktorischen Signalverarbeitung im ZNS führen können, ob bei der AD oder dem MP die Nase ein „Mediator“ für Pathogene ist oder ob die Schädigung des olfaktorischen Systems im Rahmen der degenerativen Prozesse auftritt, ist bisher jedoch weitgehend unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des OR10H3-Gens im Gehirn von Patienten mit der AD und dem MP sowie bei Gesunden untersucht. Alle der vier untersuchten Hirnareale enthalten Projektionen, die an der Verarbeitung olfaktorischer Informationen beteiligt sind. Das Riechepithel war nicht einbezogen.

Eine Beeinflussung des olfaktorischen Systems bei der AD und dem MP wird anhand der erhobenen Daten bestätigt. Die bisher veröffentlichten Studien untersuchen meist das „periphere“ Riechsystem. In dieser Arbeit hingegen wird eine Affektion des zerebralen olfaktorischen Systems, speziell der Regulation der OR, und zwar bereits auf der Genebene, nachgewiesen.

Beim MP findet sich im Gtm eine tendenzielle Abnahme der Expression des OR-Gens. Im Hippocampus wird eine signifikante Herunterregulierung gemessen, die Expression ist dort bereits in den Krankheitsstadien 2/3 nach H&Y erniedrigt. Als Ursache der Ergebnisse kann die fortschreitende Neurodegeneration mit der Ablagerung von LB in den sekundären und tertiären olfaktorischen Hirnarealen, z. B. im Hippocampus, die zu einer Dysfunktion olfaktorischer Neuronen führen könnte, diskutiert werden. Aufgrund dieser Daten könnte also neben der Dysfunktion des peripheren Riechsystems eine zusätzliche Störung der zerebralen olfaktorischen Informationsverarbeitung oder

Signalweiterleitung, die mit einer verminderten Expression von OR als Zeichen der Schädigung olfaktorischer Neurone einhergeht, als Ursache einer Hyposmie beim MP angenommen werden.

Bei der AD wird ebenfalls eine signifikant verminderte Expression des OR-Gens im Hippocampus gemessen. In der Literatur wird nicht nur die Beteiligung des peripheren Riechsystems sondern auch die Degeneration zentraler Signalwege der Geruchsverarbeitung insbesondere des Hippocampus, des transentorhinalen und entorhinalen Kortex als Ursprung der Hyposmie bei der AD diskutiert (Hawkes 2003). Der Hippocampus ist bei der AD erheblich von den pathologischen Proteinablagerungen und der Neurodegeneration betroffen (Braak & Braak 1995, Thal et al. 2002, Thal & Braak 2005). Die in der vorliegenden Arbeit detektierte Expressionsabnahme des OR-Gens könnte als Zeichen der Schädigung olfaktorischer Neurone also eine Folge der fortschreitenden Neurodegeneration und möglicherweise kausal für eine Hyposmie bei Alzheimer-Patienten verantwortlich sein. Auch Teile des temporalen Kortex, der bei der AD stark geschädigt wird, sind an der Verarbeitung olfaktorischer Signale beteiligt (Albrecht & Wiesmann 2006, Alafuzoff et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte hingegen keine Beeinflussung der OR-Expression im temporalen Kortex gemessen werden.

Hinweise darauf, ob der primäre Schädigungsort einer Riechstörung im peripheren Riechsystem oder im Gehirn betroffener Patienten liegt, können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zwar weder beim MP noch bei der AD liefern. Die deutliche Beeinträchtigung der hippocampalen OR-Expression lässt aber schlussfolgern, dass bei beiden Erkrankungen zerebrale Mechanismen an einer olfaktorischen Funktionsstörung beteiligt sein könnten. Zudem ist anhand der vorliegenden Daten zu diskutieren, dass bei beiden Erkrankungen ein Zusammenhang zwischen der Neurodegeneration und der Schädigung des zerebralen olfaktorischen Systems besteht. Eine anzunehmende positive Korrelation der Expressionsänderung des OR-Gens mit dem Fortschreiten der AD oder des MP wird in dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen. Das stadienabhängige Verhalten der OR-Geneexpression müsste entsprechend weiter analysiert werden, um eine derartige Assoziation zu bestätigen. Auch müsste in Folgeuntersuchungen möglichst eine Korrelation der genetischen Daten mit der Riechfunktion der

Untersuchten erfolgen, um die klinische Signifikanz der Daten zu bestätigen. Entsprechende Angaben lagen in dieser Arbeit nicht vor.

Eine von der zerebralen Neurodegeneration unabhängige Degeneration zerebraler olfaktorischer Neurone als Resultat einer schweren Schädigung des peripheren Riechsystems unspezifischer Ätiologie könnte bei Patienten mit MP, bei denen eine Anosmie bzw. eine schwere Riechstörung häufig vorkommt (Oertel & Reichmann 2008), oder mit AD als Ursache der beeinträchtigten OR-Genexpression ebenfalls in Erwägung gezogen werden. In bildgebenden Studien wird die Degeneration kortikaler olfaktorischer Areale bei Patienten mit einer Anosmie unterschiedlicher Genese nachgewiesen (Bitter et al. 2010). Ein derartiger Mechanismus könnte die bei beiden Erkrankungen herunterregulierte Expression des OR-Gens im Hippocampus, der olfaktorische Projektionen verarbeitet, möglicherweise auch erklären. In der vorliegenden Arbeit wird eine Änderung der Genexpression jedoch nur im Hippocampus gemessen, während eine Atrophie olfaktorischer Neuronen in der genannten Studie auch in anderen Hirnarealen gezeigt wird. Auch liegen keine Daten zum Vorhandensein oder Ausmaß einer Hyposmie bei den untersuchten Personen vor. Entsprechende Zusammenhänge müssten in gezielten Untersuchungen unter Einbeziehung der Riechfunktion überprüft werden.

Das Verständnis der Ätiologie der Hyposmie oder Anosmie sollte sowohl bei der AD als auch beim MP einen besonderen Stellenwert haben. Da sie ein Frühsymptom ist, das den typischen klinischen Symptomen um Jahre voraus gehen kann, könnte die Kenntnis der Genese der Hyposmie die Diagnostik der Erkrankungen, z. B. über genetische Biomarker, vereinfachen und möglicherweise frühzeitig ermöglichen. Vorhandene therapeutische Maßnahmen könnten dann bereits bei einer isolierten Riechstörung vor dem Auftreten weiterer Symptome eingesetzt werden mit dem Ziel, die Manifestation schwerwiegender körperlicher oder kognitiver Defizite aufzuhalten oder zu verzögern.

### 5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Aufgrund der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung werden die Prävalenz und die Inzidenz des Morbus Parkinson (MP) und der Alzheimer Demenz (AD) in der Zukunft erheblich zunehmen. Eine validierte Diagnostik und ein früher Therapiebeginn sind nötig, um die schweren Beeinträchtigungen, die beide Erkrankungen für die Betroffenen mit sich bringen, zu vermeiden oder zumindest zu minimieren.

Aufgrund klinischer, morphologischer und molekularbiologischer Gemeinsamkeiten der AD und des MP werden partiell ähnliche ätiologische und pathogenetische Mechanismen vermutet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, potentielle pathogenetische Verbindungen und mögliche diagnostische Markerproteine für diese Krankheiten auf der Genebene zu identifizieren. Die Expressionsänderung der signifikanten Gene, z. B. der Glutamattransporter, der olfaktorischen Rezeptoren oder der vakuolären Sortierungsproteine, war bei beiden Erkrankungen häufig gleichsinnig. Anhand dieser Ergebnisse ist zum einen eine kausale Verknüpfung des veränderten Genmetabolismus mit der ablaufenden Neurodegeneration zu vermuten. Zum anderen wird die Hypothese gemeinsamer pathogenetischer Mechanismen der AD und des MP untermauert. Zusammenhänge der Genexpression zum zeitlichen Verlauf der Erkrankungen werden in dieser Arbeit nur vereinzelt belegt, bekräftigten dann aber die Annahme einer Assoziation zu den degenerativen Prozessen.

Die Identifizierung eines spezifischen Biomarkers für eine der beiden Erkrankungen war ein Ziel der vorliegenden Arbeit. Aufgrund seines Expressionsverhaltens kann das BACE1-Gen (Beta site APP cleaving enzyme 1) als diagnostischer Biomarker für Patienten mit der AD diskutiert werden. Auch bei Patienten mit MP könnten die in dieser Arbeit gemessenen Expressionsänderungen von BACE1 auf eine potentielle Funktion des Gens als Biomarker hinweisen, die besonders hilfreich in der Diagnostik einer Demenzentwicklung bei Betroffenen sein könnte. Eine Bestätigung der hier erhobenen Daten an entsprechenden Patientenkollektiven, insbesondere beim MP mit Demenz, mit leichter zugänglichen Proben, z. B. aus dem Liquor cerebrospinalis oder Blut, ist allerdings nötig, um BACE1 als spezifischen Biomarker der AD oder des MP evaluieren.

Die vorliegende Arbeit weist aufgrund der häufig signifikanten Expressionsänderungen auf eine besondere Affektion des Hippocampus sowohl bei der AD als auch beim MP hin. Bemerkenswert ist zudem, dass im Kleinhirn, einer Hirnregion, in der bei beiden Erkrankungen scheinbar kaum oder keine pathologischen Prozesse ablaufen, häufige und dann ähnliche Änderungen des Genmetabolismus gemessen wurden. Dies spricht für eine Beteiligung des Kleinhirns bei beiden Krankheiten, deren Bedeutung bislang unklar ist. Anhand der vorliegenden Daten ist jedoch eine regulatorische Funktion zum Ausgleich krankheitsbedingter neuronaler Störungen zu vermuten.

Die in der vorliegenden Arbeit detektierten Veränderungen des Metabolismus einzelner Gene als auch die dabei auffälligen regionalen Besonderheiten sollten nachfolgenden Studien als Grundlage spezifischer weiterführender genetischer Analysen dienen, um die Bedeutung der hier erhobenen Daten für die Pathogenese und die Diagnostik der AD und des MP zu bestimmen.

## 6 Literaturverzeichnis

- AD & FDMD. Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database. 2012. Ref Type: Online Source
- Akiyama H, Arai T, Kondo H, Tanno E, Haga C, Ikeda K. 2000. Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 14 Suppl 1:S47-S53
- Alafuzoff I, Thal DR, Arzberger T, Bogdanovic N, Al-Sarraj S et al. 2009. Assessment of beta-amyloid deposits in human brain: a study of the BrainNet Europe Consortium. *Acta Neuropathol.* 117(3):309-20
- Albrecht J, Wiesmann M. 2006. Das olfaktorische System des Menschen Anatomie und Physiologie. *Der Nervenarzt* 77(8):931-9
- Ansari KA, Johnson A. 1975. Olfactory function in patients with Parkinson's disease. *J. Chronic. Dis.* 28(9):493-7
- Arnold SE, Lee EB, Moberg PJ, Stutzbach L, Kazi H et al. 2010. Olfactory epithelium amyloid-beta and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* 67(4):462-9
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. 2011. Alzheimer's disease. *Lancet* 377(9770):1019-31
- Barz S, Hummel T, Pauli E, Majer M, Lang CJ, Kobal G. 1997. Chemosensory event-related potentials in response to trigeminal and olfactory stimulation in idiopathic Parkinson's disease. *Neurology* 49(5):1424-31
- Beal MF. 1992. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J.* 6(15):3338-44



- Beckstrom H, Julsrud L, Haugeto O, Dewar D, Graham DI et al. 1999. Interindividual differences in the levels of the glutamate transporters GLAST and GLT, but no clear correlation with Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 55(2):218-29
- Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. 2010. Genetics of Alzheimer disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 23(4):213-27
- Bennett BD, Denis P, Haniu M, Teplow DB, Kahn S et al. 2000. A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *J. Biol. Chem.* 275(48):37712-7
- Bertram L, Tanzi RE. 2005. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J. Clin. Invest* 115(6):1449-57
- Bertram L, Tanzi RE. 2008. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat. Rev. Neurosci.* 9(10):768-78
- Beschorner R, Dietz K, Schauer N, Mittelbronn M, Schluesener HJ et al. 2007. Expression of EAAT1 reflects a possible neuroprotective function of reactive astrocytes and activated microglia following human traumatic brain injury. *Histol. Histopathol.* 22(5):515-26
- Bettens K, Slegers K, Van BC. 2010. Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum. Mol. Genet.* 19(R1):R4-R11
- Bi H, Sze CI. 2002. N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A and NR2B messenger RNA levels are altered in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 200(1-2):11-8
- Bickel H. 2005. Epidemiologie und Gesundheitsökonomie. In *Demenzen*, ed. Wallesch Claus-Werner, Förstl Hans, 1.1:1-15.
- Bickel H. 2008. *Die Epidemiologie der Demenz*. Deutsche Alzheimer Gesellschaft,

- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. 1985. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* 101(4):1371-8
- Bitter T, Gudziol H, Burmeister HP, Mentzel HJ, Guntinas-Lichius O, Gaser C. 2010. Anosmia leads to a loss of gray matter in cortical brain areas. *Chem. Senses* 35(5):407-15
- Blandini F. 2010. An update on the potential role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Funct. Neurol.* 25(2):65-71
- Bogaert E, d'Ydewalle C, Van Den Bosch L. 2010. Amyotrophic lateral sclerosis and excitotoxicity: from pathological mechanism to therapeutic target. *CNS. Neurol. Disord. Drug Targets.* 9(3):297-304
- Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J et al. 2008. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 28(27):6926-37
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ et al. 2003. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299(5604):256-9
- Braak E, Griffing K, Arai K, Bohl J, Bratzke H, Braak H. 1999. Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 249 Suppl 3:14-22
- Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del TK. 2006. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* 112(4):389-404
- Braak H, Braak E. 1995. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol. Aging* 16(3):271-8

- Braak H, Braak E. 1997. Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 18(4 Suppl):S85-S88
- Braak H, Braak E, Yilmazer D, Schultz C, de Vos RA, Jansen EN. 1995. Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl* 46:15-31
- Braak H, Del Tredici K. 2006. Pathologische Veränderungen bei sporadischem Morbus Parkinson. *Forschung Frankfurt*:26-33
- Braak H, Del Tredici K. 2010. Pathophysiologie des sporadischen Morbus Parkinson. *Fortschritte der Neurologie - Psychiatrie* 78(S 01):2-4
- Braak H, Del TK, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. 2003a. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24(2):197-211
- Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del TK. 2004. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* 318(1):121-34
- Braak H, Rub U, Gai WP, Del TK. 2003b. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J. Neural Transm.* 110(5):517-36
- Brion JP, Couck AM, Passareiro E, Flament-Durand J. 1985. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J. Submicrosc. Cytol.* 17(1):89-96
- Bristol LA, Rothstein JD. 1996. Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Ann. Neurol.* 39(5):676-9

- Broe M, Shepherd CE, Mann DM, Milward EA, Gai WP et al. 2005. Insoluble alpha-synuclein in Alzheimer's disease without Lewy body formation. *Neurotox. Res.* 7(1-2):69-76
- Brooks DJ. 2009. Imaging amyloid in Parkinson's disease dementia and dementia with Lewy bodies with positron emission tomography. *Mov Disord.* 24 Suppl 2:S742-S747
- Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR. 2005. Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ. Health Perspect.* 113(9):1250-6
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 33(1):95-130
- Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25(2):169-93
- Butterfield DA. 1997. beta-Amyloid-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Chem. Res. Toxicol.* 10(5):495-506
- Cappai R, White AR. 1999. Amyloid beta. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31(9):885-9
- Caudle WM, Zhang J. 2009. Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. *Exp. Neurol.* 220(2):230-3
- Chade AR, Kasten M, Tanner CM. 2006. Nongenetic causes of Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl*(70):147-51
- Chalmers DT, Dewar D, Graham DI, Brooks DN, McCulloch J. 1990. Differential alterations of cortical glutamatergic binding sites in senile dementia of the Alzheimer type. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87(4):1352-6

- Chu CT, Caruso JL, Cummings TJ, Ervin J, Rosenberg C, Hulette CM. 2000. Ubiquitin immunochemistry as a diagnostic aid for community pathologists evaluating patients who have dementia. *Mod. Pathol.* 13(4):420-6
- Chui HC, Lyness SA, Sobel E, Schneider LS. 1994. Extrapyrmidal signs and psychiatric symptoms predict faster cognitive decline in Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* 51(7):676-81
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. 1977. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol.* 116(2):207-25
- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE et al. 1994. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat. Genet.* 7(2):180-4
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC et al. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261(5123):921-3
- Couchie D, Mavilia C, Georgieff IS, Liem RK, Shelanski ML, Nunez J. 1992. Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89(10):4378-81
- Cowburn R, Hardy J, Roberts P, Briggs R. 1988. Presynaptic and postsynaptic glutamatergic function in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 86(1):109-13
- Cross AJ, Slater P, Simpson M, Royston C, Deakin JF et al. 1987. Sodium dependent D-[3H]aspartate binding in cerebral cortex in patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neurosci. Lett.* 79(1-2):213-7
- Crowther RA. 1991. Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88(6):2288-92

- Danbolt NC. 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65(1):1-105
- Daum RF, Sekinger B, Kobal G, Lang CJ. 2000. [Olfactory testing with "sniffin' sticks" for clinical diagnosis of Parkinson disease]. *Nervenarzt* 71(8):643-50
- David DC, Hauptmann S, Scherping I, Schuessel K, Keil U et al. 2005. Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 280(25):23802-14
- Dawson TM, Dawson VL. 2003. Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease. *J. Clin. Invest* 111(2):145-51
- De Vos KJ, Grierson AJ, Ackerley S, Miller CC. 2008. Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Neurosci.* 31:151-73
- Deuschl G, Maier W. S3-Leitlinie Demenzen (Langversion). Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde DGPPN and Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN). 2009.
- Ref Type: Online Source
- Devanand DP, Michaels-Marston KS, Liu X, Pelton GH, Padilla M et al. 2000. Olfactory deficits in patients with mild cognitive impairment predict Alzheimer's disease at follow-up. *Am. J. Psychiatry* 157(9):1399-405
- Di Fonzo A, Rohe CF, Ferreira J, Chien HF, Vacca L et al. 2005. A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet* 365(9457):412-5
- Dominguez DI, Hartmann D, De SB. 2004. BACE1 and presenilin: two unusual aspartyl proteases involved in Alzheimer's disease. *Neurodegener. Dis.* 1(4-5):168-74

- Dong XX, Wang Y, Qin ZH. 2009. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* 30(4):379-87
- Doty RL. 2007. Olfaction in Parkinson's disease. *Parkinsonism. Relat Disord.* 13 Suppl 3:S225-S228
- Doty RL. 2008. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? *Ann. Neurol.* 63(1):7-15
- Doty RL, Deems DA, Stellar S. 1988. Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. *Neurology* 38(8):1237-44
- Doty RL, Reyes PF, Gregor T. 1987. Presence of both odor identification and detection deficits in Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* 18(5):597-600
- Doty RL, Stern MB, Pfeiffer C, Gollomp SM, Hurtig HI. 1992. Bilateral olfactory dysfunction in early stage treated and untreated idiopathic Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55(2):138-42
- Drzezga A. 2008. Basic pathologies of neurodegenerative dementias and their relevance for state-of-the-art molecular imaging studies. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35 Suppl 1:S4-11
- Duda JE, Shah U, Arnold SE, Lee VM, Trojanowski JQ. 1999. The expression of alpha-, beta-, and gamma-synucleins in olfactory mucosa from patients with and without neurodegenerative diseases. *Exp. Neurol.* 160(2):515-22
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 118(1):5-36

- Egert S, Wagenpfeil S, Förstl H. 2007. Cholinesterase-Inhibitoren und Alzheimer-Demenz: Metaanalyse zu Wirksamkeitsnachweis, Ursprung und Ergebnisverzerrung in publizierten Studien. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 132(22):1207-13
- Eikelenboom P, van EE, Hoozemans JJ, Veerhuis R, Rozemuller AJ, van Gool WA. 2010. Neuroinflammation - an early event in both the history and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurodegener. Dis.* 7(1-3):38-41
- El-Agnaf OM, Walsh DM, Allsop D. 2003. Soluble oligomers for the diagnosis of neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol.* 2(8):461-2
- Emre M. 2003. Dementia associated with Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2(4):229-37
- Eriksen JL, Wszolek Z, Petrucelli L. 2005. Molecular pathogenesis of Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 62(3):353-7
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR et al. 1990. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248(4959):1122-4
- Facheris M, Beretta S, Ferrarese C. 2004. Peripheral markers of oxidative stress and excitotoxicity in neurodegenerative disorders: tools for diagnosis and therapy? *J. Alzheimers. Dis.* 6(2):177-84
- Fahn S, Sulzer D. 2004. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. *NeuroRx.* 1(1):139-54
- Feany MB, Bender WW. 2000. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404(6776):394-8



- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L et al. 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366(9503):2112-7
- Finckh U. 2006. Genetische Faktoren bei Alzheimer-Demenz. *Deutsches Ärzteblatt* 103(15):A1010-A1016
- Firestone JA, Lundin JI, Powers KM, Smith-Weller T, Franklin GM et al. 2010. Occupational factors and risk of Parkinson's disease: A population-based case-control study. *Am. J. Ind. Med.* 53(3):217-23
- Flower TR, Clark-Dixon C, Metoyer C, Yang H, Shi R et al. 2007. YGR198w (YPP1) targets A30P alpha-synuclein to the vacuole for degradation. *J. Cell Biol.* 177(6):1091-104
- Forno LS. 1992. Neuropathologic features of Parkinson's, Huntington's, and Alzheimer's diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 648:6-16
- Fratiglioni L, Ahlbom A, Viitanen M, Winblad B. 1993. Risk factors for late-onset Alzheimer's disease: a population-based, case-control study. *Ann. Neurol.* 33(3):258-66
- Gallyas F. 1971. Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development. *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.* 19(1):1-8
- Gatta LB, Albertini A, Ravid R, Finazzi D. 2002. Levels of beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 mRNAs in Alzheimer hippocampus. *Neuroreport* 13(16):2031-3
- Gegelashvili M, Rodriguez-Kern A, Pirozhkova I, Zhang J, Sung L, Gegelashvili G. 2006. High-affinity glutamate transporter GLAST/EAAT1 regulates cell surface expression of glutamine/neutral amino acid transporter ASCT2 in human fetal astrocytes. *Neurochem. Int.* 48(6-7):611-5

- Gerlach M., Reichmann H., Riederer P. 2007. Oxidativer Stress. In *Die Parkinson Krankheit*, ed. Gerlach M., Reichmann H., Riederer P., 5.1:137-145. Springer-Verlag/Wien.
- Giasson BI, Lee VM. 2003. Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell* 114(1):1-8
- Gibson GE, Shi Q. 2010. A mitocentric view of Alzheimer's disease suggests multifaceted treatments. *J. Alzheimers. Dis.* 20 Suppl 2:S591-S607
- Gille G, Reichmann H. 2005. Ursachen des idiopathischen Parkinson-Syndroms - Stand 2005. *Aktuelle Neurologie* 32:75-87
- Glenner GG, Wong CW. 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120(3):885-90
- Goate A. 2006. Segregation of a missense mutation in the amyloid beta-protein precursor gene with familial Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 9(3 Suppl):341-7
- Goedert M. 1999. Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and alpha-synucleinopathies. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 354(1386):1101-18
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA. 1989. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 8(2):393-9
- Goldberg MS, Lansbury PT, Jr. 2000. Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat. Cell Biol.* 2(7):E115-E119

- Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ. 1998. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* 50(5):1346-50
- Graves AB, Bowen JD, Rajaram L, McCormick WC, McCurry SM et al. 1999. Impaired olfaction as a marker for cognitive decline: interaction with apolipoprotein E epsilon4 status. *Neurology* 53(7):1480-7
- Greenamyre JT, Penney JB, Young AB, D'Amato CJ, Hicks SP, Shoulson I. 1985. Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's diseases. *Science* 227(4693):1496-9
- Grünblatt E. 2008. Commonalities in the genetics of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Expert. Rev. Neurother.* 8(12):1865-77
- Grünblatt E, Zander N, Bartl J, Jie L, Monoranu CM et al. 2007. Comparison analysis of gene expression patterns between sporadic Alzheimer's and Parkinson's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 12(4):291-311
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83(13):4913-7
- Guan ZZ. 2008. Cross-talk between oxidative stress and modifications of cholinergic and glutaminergic receptors in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Pharmacol. Sin.* 29(7):773-80
- Gullapalli A, Garrett TA, Paing MM, Griffin CT, Yang Y, Trejo J. 2004. A role for sorting nexin 2 in epidermal growth factor receptor down-regulation: evidence for distinct functions of sorting nexin 1 and 2 in protein trafficking. *Mol. Biol. Cell* 15(5):2143-55

- Haass C. 2004. Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J.* 23(3):483-8
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A et al. 1992. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359(6393):322-5
- Haass C, Selkoe DJ. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(2):101-12
- Haehner A, Boesveldt S, Berendse HW, Mackay-Sim A, Fleischmann J et al. 2009. Prevalence of smell loss in Parkinson's disease-a multicenter study. *Parkinsonism. Relat Disord.* 15(7):490-4
- Haft CR, de la Luz SM, Bafford R, Lesniak MA, Barr VA, Taylor SI. 2000. Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes. *Mol. Biol. Cell* 11(12):4105-16
- Hamada K, Hirayama M, Watanabe H, Kobayashi R, Ito H et al. 2003. Onset age and severity of motor impairment are associated with reduction of myocardial 123I-MIBG uptake in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74(4):423-6
- Harada H, Tamaoka A, Ishii K, Shoji S, Kametaka S et al. 2006. Beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) is increased in remaining neurons in Alzheimer's disease brains. *Neurosci. Res.* 54(1):24-9
- Hardy J, Cowburn R, Barton A, Reynolds G, Lofdahl E et al. 1987. Glutamate deficits in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 50(3):356-8
- Hardy J, Selkoe DJ. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297(5580):353-6

Hardy JA, Higgins GA. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256(5054):184-5

Harris ME, Hensley K, Butterfield DA, Leedle RA, Carney JM. 1995. Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's beta-amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. *Exp. Neurol.* 131(2):193-202

Harris ME, Wang Y, Pedigo NW, Jr., Hensley K, Butterfield DA, Carney JM. 1996. Amyloid beta peptide (25-35) inhibits Na<sup>+</sup>-dependent glutamate uptake in rat hippocampal astrocyte cultures. *J. Neurochem.* 67(1):277-86

Hartmann T. 1999. Intracellular biology of Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 249(6):291-8

Hatano T, Kubo S, Sato S, Hattori N. 2009. Pathogenesis of familial Parkinson's disease: new insights based on monogenic forms of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 111(5):1075-93

Hawkes C. 2003. Olfaction in neurodegenerative disorder. *Mov Disord.* 18(4):364-72

Hawkes CH, Shephard BC, Daniel SE. 1997. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 62(5):436-46

Hazell AS. 2007. Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochem. Int.* 50(7-8):941-53

Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. 2003. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch. Neurol.* 60(8):1119-22

Hebert SS, Horre K, Nicolai L, Papadopoulou AS, Mandemakers W et al. 2008. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with

- increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105(17):6415-20
- Hoehn MM, Yahr MD. 1967. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17(5):427-42
- Hoffman-Sommer M, Rytka J. 2007. The yeast protein sorting pathway as an experimental model for lysosomal trafficking. *Expert. Rev. Clin. Immunol.* 3(2):225-39
- Hoffmann-La Roche AG. Gene und Gesundheit. 2. 2006. F.Hoffmann-La Roche AG. Ref Type: Pamphlet
- Holsinger RM, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL, Evin G. 2002. Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 51(6):783-6
- Hu WT, Chen-Plotkin A, Arnold SE, Grossman M, Clark CM et al. 2010. Biomarker discovery for Alzheimer's disease, frontotemporal lobar degeneration, and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 120(3):385-99
- Huang Y. 2010. Abeta-independent roles of apolipoprotein E4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.* 16(6):287-94
- Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD et al. 1999. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol. Cell Neurosci.* 14(6):419-27
- Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. 2004. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 45(5):583-95
- Iqbal K, Alonso AC, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E et al. 2005. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* 1739(2-3):198-210

- Irvine GB, El-Agnaf OM, Shankar GM, Walsh DM. 2008. Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol. Med.* 14(7-8):451-64
- Jacob CP, Koutsilieri E, Bartl J, Neuen-Jacob E, Arzberger T et al. 2007. Alterations in expression of glutamatergic transporters and receptors in sporadic Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 11(1):97-116
- Janetzky B, Hauck S, Youdim MB, Riederer P, Jellinger K et al. 1994. Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 169(1-2):126-8
- Jellinger KA. 2001. Neuropathologie der Demenzen. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie* 2(1):7-31
- Jellinger KA. 2003. Demenzen, Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson beim alternden Mann. *Blickpunkt der Mann* 1(3):34-42
- Jellinger KA. 2005. Neurodegenerative Erkrankungen (ZNS) - Eine aktuelle Übersicht. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie* 6(1):9-18
- Kanai Y, Hediger MA. 2004. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch.* 447(5):469-79
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL et al. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325(6106):733-6
- Kashani A, Betancur C, Giros B, Hirsch E, El MS. 2007. Altered expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in Parkinson disease. *Neurobiol. Aging* 28(4):568-78

- KIDD M. 1963. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197:192-3
- Kim K, Lee SG, Kegelmann TP, Su ZZ, Das SK et al. 2010. Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: Opportunities for developing novel therapeutics. *J. Cell Physiol*
- Kim SY, Choi SY, Chao W, Volsky DJ. 2003. Transcriptional regulation of human excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1): cloning of the EAAT1 promoter and characterization of its basal and inducible activity in human astrocytes. *J. Neurochem.* 87(6):1485-98
- Kirik D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen TE et al. 2002. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J. Neurosci.* 22(7):2780-91
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y et al. 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392(6676):605-8
- Klockgether T. 2004. Parkinson's disease: clinical aspects. *Cell Tissue Res.* 318(1):115-20
- Knapp M. 2010. Dementia: a new global epidemic? *Maturitas* 67(3):193-4
- Kobal G, Klimek L, Wolfensberger M, Gudziol H, Temmel A et al. 2000. Multicenter investigation of 1,036 subjects using a standardized method for the assessment of olfactory function combining tests of odor identification, odor discrimination, and olfactory thresholds. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 257(4):205-11
- Koh JY, Yang LL, Cotman CW. 1990. Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. *Brain Res.* 533(2):315-20



- Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL. 1989. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2(4):1389-97
- Koutsilieri E, Riederer P. 2007. Excitotoxicity and new antiglutamatergic strategies in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Parkinsonism. Relat Disord.* 13 Suppl 3:S329-S331
- Koutsilieri E, Scheller C, Grunblatt E, Nara K, Li J, Riederer P. 2002. Free radicals in Parkinson's disease. *J. Neurol.* 249 Suppl 2:II1-II5
- Kretzschmar HA, Neumann M. 2000. Die neuropathologische Diagnostik neurodegenerativer und demenzieller Krankheiten. *Der Pathologe* 21(5):364-74
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M et al. 1998. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 18(2):106-8
- Kurlan R, Richard IH, Papka M, Marshall F. 2000. Movement disorders in Alzheimer's disease: more rigidity of definitions is needed. *Mov Disord.* 15(1):24-9
- Kurz A, Diehl J, Riemenschneider M, Perneczky R, Lautenschlager N. 2004. Leichte kognitive Störung Fragen zu Definition, Diagnose, Prognose und Therapie. *Der Nervenarzt* 75(1):6-15
- Lang AE, Lozano AM. 1998. Parkinson's disease. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 339(15):1044-53
- Larionov A, Krause A, Miller W. 2005. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC. Bioinformatics.* 6:62
- Lau A, Tymianski M. 2010. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch.* 460(2):525-42

- Lauderback CM, Harris-White ME, Wang Y, Pedigo NW, Jr., Carney JM, Butterfield DA. 1999. Amyloid beta-peptide inhibits Na<sup>+</sup>-dependent glutamate uptake. *Life Sci.* 65(18-19):1977-81
- Lee HG, Zhu X, Ghanbari HA, Ogawa O, Raina AK et al. 2002. Differential regulation of glutamate receptors in Alzheimer's disease. *Neurosignals.* 11(5):282-92
- Lerner A, Bagic A. 2008. Olfactory pathogenesis of idiopathic Parkinson disease revisited. *Mov Disord.* 23(8):1076-84
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J et al. 1995. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269(5226):973-7
- Li R, Lindholm K, Yang LB, Yue X, Citron M et al. 2004. Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101(10):3632-7
- Li S, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Masliah E. 1997. Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56(8):901-11
- Lin X, Koelsch G, Wu S, Downs D, Dashti A, Tang J. 2000. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97(4):1456-60
- Locke PA, Conneally PM, Tanzi RE, Gusella JF, Haines JL. 1995. Apolipoprotein E4 allele and Alzheimer disease: examination of allelic association and effect on age at onset in both early- and late-onset cases. *Genet. Epidemiol.* 12(1):83-92
- Logroscino G. 2005. The role of early life environmental risk factors in Parkinson disease: what is the evidence? *Environ. Health Perspect.* 113(9):1234-8

- Lotharius J, Brundin P. 2002. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat. Rev. Neurosci.* 3(12):932-42
- Lovell MA, Markesbery WR. 2007. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res.* 35(22):7497-504
- Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Jenner P, Halliwell B. 1997. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 68(5):2061-9
- Mahley RW. 1988. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240(4852):622-30
- Mandel SA, Amit T, Weinreb O, Reznichenko L, Youdim MB. 2008. Simultaneous manipulation of multiple brain targets by green tea catechins: a potential neuroprotective strategy for Alzheimer and Parkinson diseases. *CNS. Neurosci. Ther.* 14(4):352-65
- Mandel SA, Fishman T, Youdim MB. 2007. Gene and protein signatures in sporadic Parkinson's disease and a novel genetic model of PD. *Parkinsonism. Relat Disord.* 13 Suppl 3:S242-S247
- Maries E, Dass B, Collier TJ, Kordower JH, Steece-Collier K. 2003. The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nat. Rev. Neurosci.* 4(9):727-38
- Martin FL, Williamson SJ, Paleologou KE, Allsop D, El-Agnaf OM. 2004. Alpha-synuclein and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Protein Pept. Lett.* 11(3):229-37
- Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C. 1998. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target

deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res. Bull.* 46(4):281-309

Masliah E, Alford M, Mallory M, Rockenstein E, Moechars D, Van LF. 2000.

Abnormal glutamate transport function in mutant amyloid precursor protein transgenic mice. *Exp. Neurol.* 163(2):381-7

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. 1985.

Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82(12):4245-9

Matsui T, Ingelsson M, Fukumoto H, Ramasamy K, Kowa H et al. 2007. Expression of

APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1161:116-23

Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. 1992. beta-

Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 12(2):376-89

Mattsson N. 2011. CSF biomarkers in neurodegenerative diseases. *Clin. Chem. Lab*

*Med.* 49(3):345-52

Mayeux R, Denaro J, Hemenegildo N, Marder K, Tang MX et al. 1992. A population-

based investigation of Parkinson's disease with and without dementia. Relationship to age and gender. *Arch. Neurol.* 49(5):492-7

McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. 1988. Reactive microglia are positive

for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38(8):1285-91

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. 1984.

Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34(7):939-44

- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ et al. 1999. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 46(6):860-6
- McNaught KS, Jenner P. 2001. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 297(3):191-4
- McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW. 2004. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 56(1):149-62
- McVey WD, Radisky D, Scullion MA, Tuttle MS, Vaughn M, Kaplan J. 2001. hVPS41 is expressed in multiple isoforms and can associate with vesicles through a RING-H2 finger motif. *Exp. Cell Res.* 267(1):126-34
- Mecocci P, Polidori MC, Cherubini A, Ingegneri T, Mattioli P et al. 2002. Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 59(5):794-8
- Mecocci P, Polidori MC, Ingegneri T, Cherubini A, Chionne F et al. 1998. Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients. *Neurology* 51(4):1014-7
- Meredith GE, Totterdell S, Beales M, Meshul CK. 2009. Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 219(1):334-40
- Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, Quack G. 2002. Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40). *Brain Res.* 958(1):210-21
- Moreira PI, Honda K, Liu Q, Santos MS, Oliveira CR et al. 2005. Oxidative stress: the old enemy in Alzheimer's disease pathophysiology. *Curr. Alzheimer Res.* 2(4):403-8

- Nagatsu T, Sawada M. 2005. Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Curr. Pharm. Des* 11(8):999-1016
- Namba Y, Ikeda K. 1991. [Apolipoprotein B immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in senile dementia of Alzheimer type]. *Rinsho Shinkeigaku* 31(8):826-30
- Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P et al. 2000. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283(12):1571-7
- Nicotera P, Hampel H. 2011. Perspectives of worldwide translational biomarker research in neurodegenerative diseases. *Prog. Neurobiol.*
- Nixon RA. 2007. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J. Cell Sci.* 120(Pt 23):4081-91
- Nixon RA, Yang DS, Lee JH. 2008. Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy.* 4(5):590-9
- Oertel W, Reichmann H. 2008. Parkinson-Syndrome: Diagnostik und Therapie. In *Leitlinien für die Diagnostik und Therapie in der Neurologie*, ed. HC Diener, N Putzki, 1-48. Georg Thieme Verlag.
- Olney JW. 1969. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164(880):719-21
- Olney JW, Sharpe LG. 1969. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 166(903):386-8
- Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J et al. 2004. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44(4):595-600

- Parker WD, Jr., Filley CM, Parks JK. 1990. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* 40(8):1302-3
- Parkinson J. An essay on the shaking palsy. Sherwood, Neely, and Jones. 1817.  
Sherwood, Neely, and Jones. Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- Pearce RK, Hawkes CH, Daniel SE. 1995. The anterior olfactory nucleus in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 10(3):283-7
- Perl DP. 2010. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt. Sinai J. Med.* 77(1):32-42
- Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Kokmen E, Tangelos EG. 1997. Aging, memory, and mild cognitive impairment. *Int. Psychogeriatr.* 9 Suppl 1:65-9
- Pfaffl MW. 2004a. Quantification strategies in real-time PCR. In *A-Z of quantitative PCR*, ed. SA Bustin, 3:1-20. International University Line.
- Pfaffl MW. 2004b. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*:92-5
- Plaitakis A, Shashidharan P. 2000. Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurol.* 247 Suppl 2:II25-II35
- Poeck K, Hacke W. Neurologie. 2006. Springer-Verlag-GmbH.  
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- Poewe W. 2009. Treatments for Parkinson disease--past achievements and current clinical needs. *Neurology* 72(7 Suppl):S65-S73
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A et al. 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276(5321):2045-7

- Porter RH, Roberts PJ, Briggs RS. 1993. NMDA receptor status in elderly normal individuals and those with Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 695:50-3
- Pratico D, MY L, V, Trojanowski JQ, Rokach J, FitzGerald GA. 1998. Increased F2-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *FASEB J.* 12(15):1777-83
- Preece P, Virley DJ, Costandi M, Coombes R, Moss SJ et al. 2003. Beta-secretase (BACE) and GSK-3 mRNA levels in Alzheimer's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 116(1-2):155-8
- Prince M. 2008. *The prevalence of dementia worldwide.* Alzheimer's Disease International,
- Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS. 2001. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ. Res.* 86(2):122-7
- Quinn NP, Rossor MN, Marsden CD. 1987. Olfactory threshold in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 50(1):88-9
- Raber J, Huang Y, Ashford JW. 2004. ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol. Aging* 25(5):641-50
- Radisky DC, Snyder WB, Emr SD, Kaplan J. 1997. Characterization of VPS41, a gene required for vacuolar trafficking and high-affinity iron transport in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94(11):5662-6
- Rawson NE, Gomez G, Cowart B, Restrepo D. 1998. The use of olfactory receptor neurons (ORNs) from biopsies to study changes in aging and neurodegenerative diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 855:701-7
- Reichmann H, Janetzky B. 2000. Mitochondrial dysfunction--a pathogenetic factor in Parkinson's disease. *J. Neurol.* 247 Suppl 2:II63-II68



- Reichmann H, Sommer U. 2001. Demenz beim idiopathischen Parkinson-Syndrom. *Aktuelle Neurologie*:228-30
- Rhein V, Eckert A. 2007. Effects of Alzheimer's amyloid-beta and tau protein on mitochondrial function -- role of glucose metabolism and insulin signalling. *Arch. Physiol Biochem.* 113(3):131-41
- Riedel O, Klotsche J, Spottke A, Deuschl G, Forstl H et al. 2008. Cognitive impairment in 873 patients with idiopathic Parkinson's disease. Results from the German Study on Epidemiology of Parkinson's Disease with Dementia (GEPAD). *J. Neurol.* 255(2):255-64
- Riedel-Heller SG, Busse A, Aurich C, Matschinger H, Angermeyer MC. 2001. Prevalence of dementia according to DSM-III-R and ICD-10: results of the Leipzig Longitudinal Study of the Aged (LEILA75+) Part 1. *Br. J. Psychiatry* 179:250-4
- Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P et al. 2003. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 24(7):915-9
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M et al. 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376(6543):775-8
- Rojas R, Kametaka S, Haft CR, Bonifacino JS. 2007. Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. *Mol. Cell Biol.* 27(3):1112-24
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L et al. 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16(3):675-86

- Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M, Kuncl RW. 1993. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90(14):6591-5
- Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. 1992. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 326(22):1464-8
- Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le MN, Laquerriere A et al. 2006. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat. Genet.* 38(1):24-6
- Sagar HJ. 1987. Clinical similarities and differences between Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl* 24:87-99
- Saiki S, Hirose G, Sakai K, Kataoka S, Hori A et al. 2004. Cardiac 123I-MIBG scintigraphy can assess the disease severity and phenotype of PD. *J. Neurol. Sci.* 220(1-2):105-11
- Sakuma K, Nakashima K, Takahashi K. 1996. Olfactory evoked potentials in Parkinson's disease, Alzheimer's disease and anosmic patients. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 50(1):35-40
- Sastre M, Klockgether T, Heneka MT. 2006. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int. J. Dev. Neurosci.* 24(2-3):167-76
- Sastre M, Steiner H, Fuchs K, Capell A, Multhaup G et al. 2001. Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep.* 2(9):835-41
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA et al. 1993. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43(8):1467-72

- Sawada M, Imamura K, Nagatsu T. 2006. Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl*(70):373-81
- Scatton B, Javoy-Agid F, Rouquier L, Dubois B, Agid Y. 1983. Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res.* 275(2):321-8
- Scharnagl H, Stojakovic T, März W. 2008. Biomarker in Forschung und Diagnostik. In *Biomarker*, ed. Schmitz, Endres, Götte, 2:15-37. Schattauer GmbH.
- Schellenberg GD. 1995. Genetic dissection of Alzheimer disease, a heterogeneous disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92(19):8552-9
- Schlegel J. 2005. Neuropathologie der Demenzen. In *Demenzen*, ed. Wallesch Claus-Werner, Förstl Hans, 1.4:43-58.
- Schmidtke K. 2005. Demenzen. In *Neurologie*, ed. Wallesch Claus-Werner, 50:661-682.
- Schulz JB, Falkenburger BH. 2004. Neuronal pathology in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res.* 318(1):135-47
- Scian SG, Reisberg B. 1992. Functional assessment staging (FAST) in Alzheimer's disease: reliability, validity, and ordinality. *Int. Psychogeriatr.* 4 Suppl 1:55-69
- Scott HL, Pow DV, Tannenberg AE, Dodd PR. 2002. Aberrant expression of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 22(3):RC206
- Scott HL, Tannenberg AE, Dodd PR. 1995. Variant forms of neuronal glutamate transporter sites in Alzheimer's disease cerebral cortex. *J. Neurochem.* 64(5):2193-202

- Selkoe DJ. 1999. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399(6738 Suppl):A23-A31
- Selkoe DJ. 2000. The genetics and molecular pathology of Alzheimer's disease: roles of amyloid and the presenilins. *Neurol. Clin.* 18(4):903-22
- Selkoe DJ. 2004. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann. Intern. Med.* 140(8):627-38
- Seubert P, Oltersdorf T, Lee MG, Barbour R, Blomquist C et al. 1993. Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature* 361(6409):260-3
- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H et al. 1992. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359(6393):325-7
- Shacka JJ, Roth KA, Zhang J. 2008. The autophagy-lysosomal degradation pathway: role in neurodegenerative disease and therapy. *Front Biosci.* 13:718-36
- Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci.* 27(11):2866-75
- Shastry BS. 2001. Parkinson disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy. *Neurosci. Res.* 41(1):5-12
- Shaw PJ. 1994. Excitotoxicity and motor neurone disease: a review of the evidence. *J. Neurol. Sci.* 124 Suppl:6-13
- Sheng JG, Griffin WS, Royston MC, Mrazek RE. 1998. Distribution of interleukin-1-immunoreactive microglia in cerebral cortical layers: implications for neuritic

plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 24(4):278-83

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G et al. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375(6534):754-60

Siderowf A, Stern M. 2003. Update on Parkinson disease. *Ann. Intern. Med.* 138(8):651-8

Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S et al. 2003. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302(5646):841

Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R et al. 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402(6761):537-40

Sinha S, Lieberburg I. 1999. Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96(20):11049-53

Sleegers K, Brouwers N, Gijselinck I, Theuns J, Goossens D et al. 2006. APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain* 129(Pt 11):2977-83

Smith MA, Sayre LM, Anderson VE, Harris PL, Beal MF et al. 1998. Cytochemical demonstration of oxidative damage in Alzheimer disease by immunochemical enhancement of the carbonyl reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J. Histochem. Cytochem.* 46(6):731-5

Song S, Jung YK. 2004. Alzheimer's disease meets the ubiquitin-proteasome system. *Trends Mol. Med.* 10(11):565-70

- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. 1998. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95(11):6469-73
- Starkstein SE, Mizrahi R, Garau L. 2005. Specificity of symptoms of depression in Alzheimer disease: a longitudinal analysis. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 13(9):802-7
- Stern MB. 1991. Head trauma as a risk factor for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 6(2):95-7
- Stern MB, Doty RL, Dotti M, Corcoran P, Crawford D et al. 1994. Olfactory function in Parkinson's disease subtypes. *Neurology* 44(2):266-8
- Stockley JH, O'Neill C. 2007. The proteins BACE1 and BACE2 and beta-secretase activity in normal and Alzheimer's disease brain. *Biochem. Soc. Trans.* 35(Pt 3):574-6
- Stockley JH, O'Neill C. 2008. Understanding BACE1: essential protease for amyloid-beta production in Alzheimer's disease. *Cell Mol. Life Sci.* 65(20):3265-89
- Stockley JH, Ravid R, O'Neill C. 2006. Altered beta-secretase enzyme kinetics and levels of both BACE1 and BACE2 in the Alzheimer's disease brain. *FEBS Lett.* 580(28-29):6550-60
- Stoffel W, Sasse J, Duker M, Muller R, Hofmann K et al. 1996. Human high affinity, Na(+)-dependent L-glutamate/L-aspartate transporter GLAST-1 (EAAT-1): gene structure and localization to chromosome 5p11-p12. *FEBS Lett.* 386(2-3):189-93
- Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E et al. 2005. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 307(5713):1282-8

- Storch A. 2002. Parkinson-Syndrome: Klinische Symptomatik, Differenzialdiagnose und Verlauf. *Der Nuklearmediziner*:175-80
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J et al. 1993. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90(5):1977-81
- Sun A, Koelsch G, Tang J, Bing G. 2002. Localization of beta-secretase memapsin 2 in the brain of Alzheimer's patients and normal aged controls. *Exp. Neurol.* 175(1):10-22
- Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. 2010. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. *J. Alzheimers. Dis.* 20 Suppl 2:S265-S279
- Tabert MH, Manly JJ, Liu X, Pelton GH, Rosenblum S et al. 2006. Neuropsychological prediction of conversion to Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *Arch. Gen. Psychiatry* 63(8):916-24
- Takai S, Yamada K, Kawakami H, Tanaka K, Nakamura S. 1995. Localization of the gene (SLC1A3) encoding human glutamate transporter (GluT-1) to 5p13 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 69(3-4):209-10
- Tamagno E, Bardini P, Guglielmotto M, Danni O, Tabaton M. 2006. The various aggregation states of beta-amyloid 1-42 mediate different effects on oxidative stress, neurodegeneration, and BACE-1 expression. *Free Radic. Biol. Med.* 41(2):202-12
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M et al. 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276(5319):1699-702

- Teismann P, Schulz JB. 2004. Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell Tissue Res.* 318(1):149-61
- Thai DR. 2002. Excitatory amino acid transporter EAAT-2 in tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 12(4):405-11
- Thal DR, Braak H. 2005. Postmortale Diagnosestellung bei Morbus Alzheimer. *Der Pathologe* 26(3):201-13
- Thal DR, Del TK, Braak H. 2004. Neurodegeneration in normal brain aging and disease. *Sci. Aging Knowledge Environ.* 2004(23):e26
- Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H. 2002. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58(12):1791-800
- Thal DR, Rub U, Schultz C, Sassin I, Ghebremedhin E et al. 2000. Sequence of A beta-protein deposition in the human medial temporal lobe. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59(8):733-48
- Theuns J, Brouwers N, Engelborghs S, Sleegers K, Bogaerts V et al. 2006. Promoter mutations that increase amyloid precursor-protein expression are associated with Alzheimer disease. *Am. J. Hum. Genet.* 78(6):936-46
- Thies W, Bleiler L. 2011. 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 7(2):208-44
- Tiraboschi P, Hansen LA, Masliah E, Alford M, Thal LJ, Corey-Bloom J. 2004. Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease. *Neurology* 62(11):1977-83
- Tissingh G, Berendse HW, Bergmans P, DeWaard R, Drukarch B et al. 2001. Loss of olfaction in de novo and treated Parkinson's disease: possible implications for early diagnosis. *Mov Disord.* 16(1):41-6



- Tofaris GK, Spillantini MG. 2007. Physiological and pathological properties of alpha-synuclein. *Cell Mol. Life Sci.* 64(17):2194-201
- Trojanowski JQ, Lee VM. 1998. Aggregation of neurofilament and alpha-synuclein proteins in Lewy bodies: implications for the pathogenesis of Parkinson disease and Lewy body dementia. *Arch. Neurol.* 55(2):151-2
- Tseng BP, Kitazawa M, LaFerla FM. 2004. Amyloid beta-peptide: the inside story. *Curr. Alzheimer Res.* 1(4):231-9
- Tsigelny IF, Crews L, Desplats P, Shaked GM, Sharikov Y et al. 2008. Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases. *PLoS. One.* 3(9):e3135
- Tyler SJ, Dawbarn D, Wilcock GK, Allen SJ. 2002. alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299(3):373-6
- Ulas J, Weihmuller FB, Brunner LC, Joyce JN, Marshall JF, Cotman CW. 1994. Selective increase of NMDA-sensitive glutamate binding in the striatum of Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and mixed Parkinson's disease/Alzheimer's disease patients: an autoradiographic study. *J. Neurosci.* 14(11 Pt 1):6317-24
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K et al. 2004. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304(5674):1158-60
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39(1):44-84

- Vallejo-Illarramendi A, Domercq M, Matute C. 2005. A novel alternative splicing form of excitatory amino acid transporter 1 is a negative regulator of glutamate uptake. *J. Neurochem.* 95(2):341-8
- Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A et al. 2003. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am. J. Epidemiol.* 157(11):1015-22
- Vandesompele J, De PK, Pattyn F, Poppe B, Van RN et al. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7):RESEARCH0034
- Vassar R. 2001. The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* 17(2):157-70
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA et al. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286(5440):735-41
- Voisin T, Touchon J, Vellas B. 2003. Mild cognitive impairment: a nosological entity? *Curr. Opin. Neurol.* 16 Suppl 2:S43-S45
- von Bernhardi R, Tichauer JE, Eugenin J. 2010. Aging-dependent changes of microglial cells and their relevance for neurodegenerative disorders. *J. Neurochem.* 112(5):1099-114
- von Campenhausen S., Bornschein B, Wick R, Botzel K, Sampaio C et al. 2005. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 15(4):473-90
- Walker DG, Lue LF. 2005. Investigations with cultured human microglia on pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *J. Neurosci. Res.* 81(3):412-25

- Walsh DM, Selkoe DJ. 2007. A beta oligomers - a decade of discovery. *J. Neurochem.* 101(5):1172-84
- Walton HS, Dodd PR. 2007. Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 50(7-8):1052-66
- Wang Y, Qin ZH. 2010. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis.* 15(11):1382-402
- Weih M, Schaller G, Degirmenci U, Hufnagel M, Kornhuber J. 2009. [Differential diagnosis of neurodegenerative disorders in young adults]. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.* 77(11):662-8
- Weihmuller FB, Ulas J, Nguyen L, Cotman CW, Marshall JF. 1992. Elevated NMDA receptors in parkinsonian striatum. *Neuroreport* 3(11):977-80
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 72(5):1858-62
- Wiedemann C, Schulz HL, Weber BHF. 2004. Quantitative Real-Time PCR - Eine Frage der Normalisierung. *Biospektrum*:99-102
- Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S et al. 2006. Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314(5799):664-6
- Willem M, Lammich S, Haass C. 2009. Function, regulation and therapeutic properties of beta-secretase (BACE1). *Semin. Cell Dev. Biol.* 20(2):175-82
- Wimo A, Prince M. 2010. *World Alzheimer Report 2010*. Alzheimer's Disease International,

- Yamin G. 2009. NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid beta-protein disruption of LTP in the hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 87(8):1729-36
- Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC et al. 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402(6761):533-7
- Yang LB, Lindholm K, Yan R, Citron M, Xia W et al. 2003. Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat. Med.* 9(1):3-4
- Yi JH, Hazell AS. 2006. Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochem. Int.* 48(5):394-403
- Young AB, Greenamyre JT, Hollingsworth Z, Albin R, D'Amato C et al. 1988. NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science* 241(4868):981-3
- Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN, Jr. 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC. Bioinformatics.* 7:85
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R et al. 2004. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* 55(2):164-73
- Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM. 2000. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97(24):13354-9
- Zhang ZX, Roman GC. 1993. Worldwide occurrence of Parkinson's disease: an updated review. *Neuroepidemiology* 12(4):195-208

- Zhong N, Weisgraber KH. 2009. Understanding the association of apolipoprotein E4 with Alzheimer disease: clues from its structure. *J. Biol. Chem.* 284(10):6027-31
- Zhou S, Zhou H, Walian PJ, Jap BK. 2007. Regulation of gamma-secretase activity in Alzheimer's disease. *Biochemistry* 46(10):2553-63
- Zhu X, Lee HG, Casadesus G, Avila J, Drew K et al. 2005. Oxidative imbalance in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 31(1-3):205-17
- Zhu YY, Ni DF, Xu CM. 2009. Gene expression profiles in the olfactory bulb from a rat model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 18(3):581-93
- Zoia C, Cogliati T, Tagliabue E, Cavaletti G, Sala G et al. 2004. Glutamate transporters in platelets: EAAT1 decrease in aging and in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 25(2):149-57
- Zoia CP, Tagliabue E, Isella V, Begni B, Fumagalli L et al. 2005. Fibroblast glutamate transport in aging and in AD: correlations with disease severity. *Neurobiol. Aging* 26(6):825-32
- Zubenko GS, Zubenko WN, McPherson S, Spoor E, Marin DB et al. 2003. A collaborative study of the emergence and clinical features of the major depressive syndrome of Alzheimer's disease. *Am. J. Psychiatry* 160(5):857-66

## 7 Anhang

### 7.1 Übersicht - Expressionsdaten signifikanter Gene

Tabelle 7.1-1: Expressionsdaten signifikanter Gene im Kleinhirn

Gen (Symbol)	Kleinhirn				KG
	AD		MP		
	ADIII/IV	ADV/VI	MP2/3	MP5/6	
	Mean+/-SD (n) Signifikanzniveau [p]		Mean+/-SD (n) Signifikanzniveau [p]		Mean+/-SD (n)
Beta-site APP- cleaving enzyme 1 (BACE1)	1,08+/-0,45 (10) [n.s.]		1,459+/-0,46 (6) [n.s.]		0,962+/-1,3 (5)
	1,329+/-0,14 (4) [n.s.]	0,914+/-0,525 (6) [n.s.]	1,31+/-0,32 (5) [n.s.]	2,188 (1) [n.s.]	
Channel Kinase 2 (CHAK2)	0,608+/-0,44 (10) [n.s.]		1,245+/-0,52 (6) [0,03]		0,525+/-0,39 (5)
	0,814+/-0,48 (4) [n.s.]	0,47+/-0,38 (6) [n.s.]	1,211+/-0,57 (5) [n.s.]	1,418 (1) [n.s.]	
Cytochrome b5 type A (CYB5A)	0,285+/-0,09 (8) [n.s.]		0,297+/-0,198 (6) [n.s.]		0,32+/-0,348 (4)
	0,321+/-0,055 (4) [n.s.]	0,249+/-0,12 (4) [n.s.]	0,221+/-0,08 (5) [n.s.]	0,673 (1) [n.s.]	
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	0,166+/-0,052 (10) [0,02]		0,17+/-0,092 (6) [n.s.]		0,079+/-0,061 (4)
	0,152+/-0,053 (4) [n.s.]	0,176+/-0,055 (6) [0,06]	0,177+/-0,1 (5) [n.s.]	0,138 (1) [n.s.]	
Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-like 1A (GRIN1A)	0,21+/-0,029 (9) [0,006]		0,22+/-0,76 (6) [0,09]		0,14+/-0,047 (4)
	0,226+/-0,033 (4) [0,02]	0,2+/-0,022 (5) [0,08]	0,223+/-0,085 (5) [n.s.]	0,216 (1) [n.s.]	
Monoamine oxidase A (MAOA)	0,177+/-0,17 (10) [n.s.]		0,204+/-0,1 (6) [0,01]		0,036+/-0,024 (4)
	0,173+/-0,27 (4) [n.s.]	0,18+/-0,09 (6) [n.s.]	0,186+/-0,1 (5) [n.s.]	0,29 (1) [n.s.]	
Monoamine oxidase B (MAOB)	0,022+/-0,012 (10) [0,046]		0,019+/-0,01 (5) [0,07]		0,008+/-0,003 (4)
	0,026+/-0,016 (4) [n.s.]	0,02+/-0,01 (6) [n.s.]	0,019+/-0,01 (5) [0,07]	(0)	
Olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 3 (OR10H3)	0,517+/-0,61 (10) [n.s.]		0,37+/-0,297 (6) [n.s.]		0,619+/-0,72 (4)
	0,219+/-0,082 (4) [n.s.]	0,717+/-0,74 (6) [n.s.]	0,4+/-0,32 (5) [n.s.]	0,228 (1) [n.s.]	
Solute carrier family 1, member 3 (SLC1A3)	0,513+/-0,279 (9) [0,01]		0,446+/-0,265 (5) [0,03]		0,069+/-0,047 (4)
	0,391+/-0,39 (4) [n.s.]	0,611+/-0,12 (5) [0,02]	0,382+/-0,26 (4) [0,1]	0,704 (1) [0,06]	
Synaptotagmin I (SYT1)	0,011+/-0,008 (10) [n.s.]		0,013+/-0,007 (6) [n.s.]		0,012+/-0,015 (5)
	0,016+/-0,01 (4) [n.s.]	0,007+/-0,004 (6) [n.s.]	0,012+/-0,008 (5) [n.s.]	0,013 (1) [n.s.]	

**Tabelle 7.1-1: Expressionsdaten signifikanter Gene im Kleinhirn**

Gen (Symbol)	Kleinhirn				KG
	AD		MP		
	ADIII/IV	ADV/VI	MP2/3	MP5/6	
	Mean+/-SD (n) Signifikanzniveau [p]		Mean+/-SD (n) Signifikanzniveau [p]		Mean+/-SD (n)
Vacuolar protein sorting 35 homolog (VPS35)	0,608+/-0,31 (10) [0,049]		0,853+/-0,61 (6) [0,09]		0,233+/-0,21 (4)
	0,724+/-0,167 (4) [0,09]	0,531+/-0,374 (6) [n.s.]	0,859+/-0,677 (5) [n.s.]	0,825 (1) [n.s.]	
Vacuolar protein sorting 41 homolog (VPS41)	0,657+/-0,39 (10) [0,03]		0,415+/-0,29 (5) [n.s.]		0,176+/-0,113 (4)
	0,778+/-0,3 (4) [0,08]	0,575+/-0,44 (6) [n.s.]	0,314+/-0,21 (4) [n.s.]	0,819 (1) [0,04]	

AD: Alzheimer Erkrankung; ADIII/IV bzw. ADV/VI: Krankheitsstadium III/IV bzw. V/VI nach Braak; KG: Kontrollgruppe; Mean: Mittelwert der Expressionsdaten der jeweils untersuchten Gruppe, MP: Morbus Parkinson; MP2/3 bzw. MP5/6: Krankheitsstadium 2/3 bzw. 5/6 nach Hoehn & Yahr; (n): Probenzahl; n.s.: nicht signifikant; [p] Signifikanzniveau: p<0,05 signifikant, p<0,01 hoch signifikant, p<0,1 Tendenz; SD: einfache Standardabweichung. Graue Markierung: farbliche Kennzeichnung signifikanter Genexpressionsänderung.

**Tabelle 7.1-2: Expressionsdaten signifikanter Gene im Gyrus frontalis medialis**

Gen (Symbol)	Gyrus frontalis medialis				KG
	AD		MP		
	ADIII/IV	ADV/VI	MP2/3	MP5/6	
	Mean+/-SD (n) Signifikanzniveau [p]		Mean+/-SD (n) Signifikanzniveau [p]		Mean+/-SD (n)
Beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1)	8,4E-5+/-5,4E-5 (6) [n.s.]		2,84E-4+/-0,001 (5) [n.s.]		1,6E-4+/-2,3E-4 (6)
	3,9E-5+/-7,7E-6 (2) [n.s.]	1,06E-4+/-5,3E-5 (4) [n.s.]	3,9E-4+/-0,001 (3) [n.s.]	0,009+/-0,001 (2) [n.s.]	
Channel Kinase 2 (CHAK2)	0,093+/-0,07 (8) [n.s.]		0,182+/-0,2 (7) [n.s.]		0,12+/-0,1 (5)
	0,1+/-0,098 (4) [n.s.]	0,086+/-0,06 (4) [n.s.]	0,161+/-0,016 (4) [n.s.]	0,209+/-0,1 (3) [n.s.]	
Cytochrome b5 type A (CYB5A)	0,035+/-0,065 (8) [n.s.]		0,028+/-0,04 (6) [n.s.]		0,018+/-0,04 (5)
	0,07+/-0,08 (4) [n.s.]	2,2E-4+/-2,5E-4 (4) [n.s.]	0,001+/-0,001 (3) [n.s.]	0,056+/-0,049 (3) [n.s.]	
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	0,038+/-0,069 (7) [n.s.]		0,129+/-0,13 (7) [n.s.]		0,13+/-0,178 (6)
	0,067+/-0,11 (3) [n.s.]	0,017+/-0,012 (4) [n.s.]	0,136+/-0,155 (4) [n.s.]	0,119+/-0,12 (3) [n.s.]	
Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-like 1A (GRIN1A)	0,004+/-0,009 (7) [n.s.]		0,009+/-0,013 (6) [n.s.]		0,01+/-0,02 (5)
	0,008+/-0,014 (3) [n.s.]	4,1E-4+/-2,2E-4 (4) [n.s.]	0,001+/-0,001 (3) [n.s.]	0,017+/-0,015 (3) [n.s.]	
Monoamine oxidase A (MAOA)	0,003+/-0,007 (7) [n.s.]		0,021+/-0,02 (7) [n.s.]		0,02+/-0,045 (5)
	0,007+/-0,011 (3) [n.s.]	0,0+/-0,0 (4) [n.s.]	0,014+/-0,027 (4) [n.s.]	0,031+/-0,027 (3) [n.s.]	
Monoamine oxidase B (MAOB)	0,067+/-0,09 (8) [n.s.]		0,033+/-0,042 (6) [n.s.]		0,036+/-0,074 (5)
	0,083+/-0,099 (4) [n.s.]	0,05+/-0,09 (4) [n.s.]	0,008+/-0,051 (3) [n.s.]	0,058+/-0,074 (3) [n.s.]	
Olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 3 (OR10H3)	0,098+/-0,13 (8) [n.s.]		0,11+/-0,124 (6) [n.s.]		0,127+/-0,177 (6)
	0,102+/-0,16 (4) [n.s.]	0,094+/-0,115 (4) [n.s.]	0,035+/-0,02 (3) [n.s.]	0,185+/-0,146 (3) [n.s.]	
Solute carrier family 1, member 3 (SLC1A3)	0,001+/-0,001 (7) [n.s.]		0,003+/-0,003 (4) [n.s.]		0,005+/-0,007 (6)
	0,001+/-0,001 (3) [n.s.]	0,002+/-0,001 (4) [n.s.]	0,003+/-0,003 (3) [n.s.]	0,001 (1) [n.s.]	
Synaptotagmin I (SYT1)	0,001+/-0,002 (7) [n.s.]		0,001+/-0,001 (6) [n.s.]		0,008+/-0,011 (6)
	0,001+/-0,001 (3) [n.s.]	0,002+/-0,002 (4) [n.s.]	0,001+/-0,001 (3) [n.s.]	0,001+/-0,001 (3) [n.s.]	
Vacuolar protein sorting 35 homolog (VPS35)	0,009+/-0,022 (7) [n.s.]		0,029+/-0,044 (6) [n.s.]		0,003+/-0,004 (6)
	0,02+/-0,034 (3) [n.s.]	0,001+/-0,001 (4) [n.s.]	0,005+/-0,007 (3) [n.s.]	0,053+/-0,056 (3) [0,08]	
Vacuolar protein sorting 41 homolog (VPS41)	0,11+/-0,05 (8) [n.s.]		0,09+/-0,046 (6) [n.s.]		0,1+/-0,087 (5)
	0,099+/-0,06 (4) [n.s.]	0,121+/-0,047 (4) [n.s.]	0,083+/-0,031 (3) [n.s.]	0,098+/-0,064 (3) [n.s.]	



**Tabelle 7.1-3: Expressionsdaten signifikanter Gene im Gyrus temporalis medialis**

Gen (Symbol)	Gyrus temporalis medialis				KG
	AD		MP		
	ADIII/IV	ADV/VI	MP2/3	MP5/6	
	Mean+/-SD (n) Signifikanzniveau [p]		Mean+/-SD (n) Signifikanzniveau [p]		Mean+/-SD (n)
Beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1)	0,024+/-0,017 (7) [n.s.]		0,021+/-0,008 (6) [n.s.]		0,022+/-0,008 (6)
	0,017+/-0,016 (3) [n.s.]	0,029+/-0,017 (4) [n.s.]	0,026+/-0,003 (3) [n.s.]	0,016+/-0,009 (3) [n.s.]	
Channel Kinase 2 (CHAK2)	0,213+/-0,331 (6) [n.s.]		0,222+/-0,179 (7) [0,03]		0,314+/-0,23 (6)
	0,067+/-0,08 (3) [n.s.]	0,359+/-0,45 (3) [n.s.]	0,32+/-0,168 (4) [n.s.]	0,091+/-0,098 (3) [n.s.]	
Cytochrome b5 type A (CYB5A)	0,039+/-0,029 (6) [n.s.]		0,011+/-0,01 (6) [n.s.]		0,02+/-0,018 (6)
	0,045+/-0,043 (3) [n.s.]	0,032+/-0,007 (3) [n.s.]	0,017+/-0,007 (4) [n.s.]	4,6E <sup>-4</sup> +/-0,001 (2) [n.s.]	
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	0,944+/-0,914 (7) [n.s.]		0,558+/-0,608 (7) [n.s.]		0,887+/-0,676 (6)
	1,405+/-1,18 (3) [n.s.]	0,599+/-0,6 (4) [n.s.]	0,759+/-0,78 (4) [n.s.]	0,29+/-0,12 (3) [n.s.]	
Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-like 1A (GRINL1A)	0,097+/-0,059 (7) [n.s.]		0,096+/-0,068 (7) [n.s.]		0,113+/-0,04 (6)
	0,079+/-0,068 (3) [n.s.]	0,1+/-0,057 (4) [n.s.]	0,145+/-0,036 (4) [n.s.]	0,03+/-0,022 (3) [0,03]	
	MP2/3:MP5/6 [0,006]				
Monoamine oxidase A (MAOA)	0,05+/-0,057 (7) [n.s.]		0,103+/-0,113 (7) [n.s.]		0,117+/-0,096 (6)
	0,034+/-0,04 (3) [n.s.]	0,062+/-0,07 (4) [n.s.]	0,168+/-0,11 (4) [n.s.]	0,016+/-0,015 (3) [n.s.]	
Monoamine oxidase B (MAOB)	0,063+/-0,033 (6) [n.s.]		0,085+/-0,07 (7) [n.s.]		0,081+/-0,055 (6)
	0,057+/-0,047 (3) [n.s.]	0,068+/-0,023 (3) [n.s.]	0,088+/-0,051 (4) [n.s.]	0,08+/-0,11 (3) [n.s.]	
Olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 3 (OR10H3)	0,321+/-0,32 (7) [n.s.]		0,156+/-0,146 (7) [0,1]		0,316+/-0,18 (5)
	0,337+/-0,36 (3) [n.s.]	0,309+/-0,34 (4) [n.s.]	0,096+/-0,11 (4) [n.s.]	0,235+/-0,17 (3) [n.s.]	
Solute carrier family 1, member 3 (SLC1A3)	0,459+/-0,37 (7) [n.s.]		0,35+/-0,22 (7) [n.s.]		0,389+/-0,225 (5)
	0,456+/-0,42 (3) [n.s.]	0,462+/-0,4 (4) [n.s.]	0,462+/-0,21 (4) [n.s.]	0,208+/-0,16 (3) [n.s.]	
Synaptotagmin I (SYT1)	0,99+/-0,958 (7) [n.s.]		0,721+/-0,854 (7) [n.s.]		0,58+/-0,72 (5)
	1,19+/-1,05 (3) [n.s.]	0,84+/-1,01 (4) [n.s.]	0,972+/-0,98 (4) [n.s.]	0,386+/-0,667 (3) [n.s.]	
Vacuolar protein sorting 35 homolog (VPS35)	0,21+/-0,19 (7) [n.s.]		0,17+/-0,15 (7) [n.s.]		0,115+/-0,016 (5)
	0,232+/-0,26 (3) [n.s.]	0,195+/-0,16 (4) [n.s.]	0,257+/-0,14 (4) [n.s.]	0,055+/-0,035 (3) [0,09]	
	MP2/3:MP5/6 [0,04]				
Vacuolar protein sorting 41 homolog (VPS41)	0,346+/-0,2 (7) [n.s.]		0,259+/-0,15 (7) [n.s.]		0,227+/-0,04 (5)
	0,377+/-0,37 (3) [n.s.]	0,322+/-0,18 (4) [n.s.]	0,372+/-0,048 (4) [0,01]	0,109+/-0,087 (3) [0,06]	
	MP2/3:MP5/6 [0,0007]				

**Tabelle 7.1-4: Expressionsdaten signifikanter Gene im Hippocampus**

Gen (Symbol)	Hippocampus				
	AD		MP		KG
	ADIII/IV	ADV/VI	MP2/3	MP5/6	
Mean+/-SD (n) Signifikanzniveau [p]		Mean+/-SD (n) Signifikanzniveau [p]		Mean+/-SD (n)	
Beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1)	0,004+/-0,006 (9) [0,03]		0,01+/-0,009 (7) [0,1]		0,036+/-0,04 (6)
	0,001+/-0,001 (4) [n.s.]	0,006+/-0,007 (5) [n.s.]	0,008+/-0,01 (5) [n.s.]	0,014+/-0,001 (2) [n.s.]	
Channel Kinase 2 (CHAK2)	0,165+/-0,2 (11) [n.s.]		0,164+/-0,148 (8) [0,03]		0,162+/-0,14 (6)
	0,056+/-0,04 (4) [n.s.]	0,227+/-0,23 (7) [n.s.]	0,181+/-0,17 (6) [n.s.]	0,114+/-0,08 (2) [n.s.]	
Cytochrome b5 type A (CYB5A)	0,011+/-0,025 (11) [0,03]		0,02+/-0,27 (7) [n.s.]		0,094+/-0,1 (6)
	0,0+/-0,0 (4) [n.s.]	0,017+/-0,03 (7) [n.s.]	0,014+/-0,031 (5) [n.s.]	0,034+/-0,005 (2) [n.s.]	
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	0,108+/-0,163 (10) [n.s.]		0,023+/-0,039 (7) [0,04]		0,143+/-0,125 (5)
	0,019+/-0,026 (4) [n.s.]	0,167+/-0,19 (6) [n.s.]	0,029+/-0,046 (5) [n.s.]	0,008+/-0,01 (2) [n.s.]	
Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-like 1A (GRIN1A)	0,019+/-0,03 (10) [n.s.]		0,056+/-0,052 (8) [n.s.]		0,042+/-0,037 (5)
	0,001+/-0,001 (4) [n.s.]	0,031+/-0,034 (6) [n.s.]	0,052+/-0,059 (6) [n.s.]	0,067+/-0,039 (2) [n.s.]	
Monoamine oxidase A (MAOA)	0,008+/-0,01 (11) [0,002]		0,053+/-0,081 (8) [n.s.]		0,048+/-0,32 (5)
	0,0+/-0,0 (4) [0,01]	0,012+/-0,012 (7) [0,03]	0,067+/-0,09 (6) [n.s.]	0,012+/-0,016 (2) [n.s.]	
Monoamine oxidase B (MAOB)	0,054+/-0,11 (10) [n.s.]		0,023+/-0,052 (7) [n.s.]		0,077+/-0,11 (6)
	0,002+/-0,003 (4) [n.s.]	0,089+/-0,127 (6) [n.s.]	0,029+/-0,009 (5) [n.s.]	0,008+/-0,105 (2) [n.s.]	
Olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 3 (OR10H3)	0,087+/-0,048 (9) [0,03]		0,085+/-0,052 (8) [0,04]		0,312+/-0,27 (6)
	0,09+/-0,06 (4) [n.s.]	0,084+/-0,04 (5) [n.s.]	0,073+/-0,046 (6) [0,1]	0,119+/-0,07 (2) [n.s.]	
Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3 (SLC1A3)	0,033+/-0,068 (10) [0,04]		0,028+/-0,1 (6) [0,07]		0,18+/-0,185 (6)
	6,3E-5+/-1,3E-4 (4) [n.s.]	0,055+/-0,083 (6) [n.s.]	0,07+/-0,03 (5) [n.s.]	0,053+/-0,039 (2) [n.s.]	
Synaptotagmin I (SYT1)	4,77E-4+/-0,001 (11) [0,03]		3,74E-4+/-0,001 (7) [0,08]		0,012+/-0,016 (6)
	1,1E-4+/-1,0E-4 (4) [n.s.]	0,001+/-0,001 (7) [n.s.]	3,3E-4+/-0,001 (5) [n.s.]	4,8E-4+/-4,0E-4 (2) [n.s.]	
Vacuolar protein sorting 35 homolog (VPS35)	0,054+/-0,086 (11) [0,07]		0,078+/-0,08 (8) [n.s.]		0,209+/-0,24 (6)
	0,001+/-0,002 (4) [n.s.]	0,085+/-0,097 (7) [n.s.]	0,078+/-0,092 (6) [n.s.]	0,076+/-0,05 (2) [n.s.]	
Vacuolar protein sorting 41 homolog (VPS41)	0,056+/-0,06 (11) [0,02]		0,035+/-0,042 (8) [0,03]		0,234+/-0,2 (6)
	0,044+/-0,075 (3) [n.s.]	0,061+/-0,058 (8) [0,1]	0,026+/-0,042 (6) [0,1]	0,062+/-0,042 (2) [n.s.]	

## 7.2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Peter Riederer danke ich für die Überlassung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. Edna Grünblatt für den Vorschlag und die Überlassung dieses Themas, die Betreuung meiner Arbeit sowie für die Übernahme des Gutachtens. Weiterhin danke ich ihr, dass sie mir trotz der Zeit, die diese Promotionsarbeit benötigt hat, immer unterstützend und mit Rat zur Seite stand und alle Fragen geduldig beantwortete.

Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Miryame Hofmann möchte ich für die Einarbeitung in die experimentellen Techniken meiner Arbeit und für ihre Hilfe bei den Problemen, die während der praktischen Durchführung aufgetreten sind, danken.

Michael Cremer möchte ich herzlich dafür danken, dass er sich die Zeit genommen hat, diese Arbeit wiederholt und intensiv Korrektur zu lesen. Ihm und Christa Cremer danke ich darüber hinaus, dass sie in der Schlussphase dieser Arbeit so liebevoll unseren Felix gehütet haben.

Meiner gesamten Familie bin ich für ihre immer währende Unterstützung dankbar, für ihr Interesse an dieser Arbeit und die Aufmunterung, wenn es nicht so gut voran ging. Mein größter Dank gilt meiner Mutter, die immer versucht, uns das Beste zu ermöglichen, für Ihren unendlichen Einsatz, ihre Unterstützung und ihr Vertrauen. Danke, dass wir dich haben.

Meinem lieben Ehemann Matthias kann ich nicht genug danken für die Liebe, die Geduld und die Ausdauer, die er mir entgegen bringt und mit der er mich nicht nur bei der Fertigstellung dieser Arbeit unentwegt unterstützt. Ich danke dir! Das Glück über Felix, der unser Leben um viele Ereignisse und besondere Momente bereichert und uns

so viel Freude schenkt, ist kaum in Worte zu fassen. Danke, dass ihr meine Familie seid!

### **7.3 Lebenslauf**

#### **Persönliche Daten**

Name: Nicole Cremer, geb. Zander

Geburtsdatum: 19.01.1982

Geburtsort: Bad Salzungen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Kinder: 1 Sohn

#### **Berufstätigkeit**

Seit 11/2011           Ärztin in Weiterbildung in der Klinik für Neurologie,  
HELIOS Klinikum Erfurt, 4. Ausbildungsjahr

07/2010 - 10/2011    Elternzeit

04/2007 - 06/2010    Ärztin in Weiterbildung in der Klinik für Neurologie,  
HELIOS Klinikum Erfurt

#### **Schulbildung**

06/2000                Abitur am Staatlichen Gymnasium Bad Salzungen

#### **Hochschulstudium**

10/2000 - 10/2006    Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-  
Maximilians-Universität Würzburg

#### **Praktische Erfahrungen**

02-03/2003            Famulatur in der Allgemein- und Unfallchirurgie des  
Katholischen Krankenhauses im Siebengebirge, Bad Honnef

02-03/2004            Famulatur in den Abteilungen Pädiatrie und Geburtshilfe des  
Ilembula Lutheran Hospital, Tansania

- 03-04/2004 Famulatur in den Abteilungen Chirurgie und Geburtshilfe des Government Hospital Handeni, Tansania
- 08-09/2004 Famulatur in der Gemeinschaftspraxis für Kinder- und Jugendmedizin, Dr. med. J. Neuhann/L. Kortenhaus, Münster
- 10/2005 - 02/2006 1. Tertial des Praktischen Jahres: Neurologische Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg
- 02 - 05/2006 2. Tertial des Praktischen Jahres: Abteilung für Innere Medizin, Klinikum Bad Salzungen
- 05 - 08/2006 3. Tertial des Praktischen Jahres: Klinik und Poliklinik für Viszerale und Transplantationschirurgie, Inselspital Bern