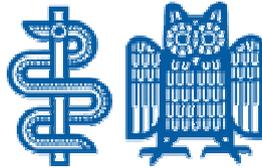


Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Abteilung für Neurobiologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar



**Der Einfluss des Geschlechts auf
die Neuronenzahl in einem
APP/PS1- doppeltransgenen Mausmodell
der Alzheimer-Krankheit**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2006

vorgelegt von Ulrike Maria Schuler
geboren am 06. Mai 1981 in Püttlingen

Zusammenfassung

Epidemiologische Untersuchungen der Alzheimer-Erkrankung haben einen Geschlechtseffekt sowohl bezüglich der Inzidenz, d.h. der Anzahl neu aufgetretener Krankheitsfälle innerhalb einer definierten Population in einem bestimmten Zeitraum, als auch bezüglich der Prävalenz, d.h. der Häufigkeit einer Krankheit in einer Bevölkerung zu einem bestimmten Zeitpunkt aufgezeigt.

Dabei weisen Frauen ein erhöhtes Risiko auf. Interessanterweise ist die Alzheimer-Erkrankung die einzige Demenzform, die relevante Geschlechtsunterschiede bezüglich Epidemiologie, Risikofaktoren und kognitiven Defiziten zeigt. Mausmodelle, die mit dem Ziel entwickelt werden, genauere Kenntnisse über die Alzheimer-Erkrankung zu erlangen, spiegeln typische Merkmale der Erkrankung wieder. Zu diesen typischen neuropathologischen Kennzeichen gehören vor allem Amyloidplaques und Neurofibrillen, aber auch Synapsenveränderungen, Neuronenverlust und reaktive Astrozytose sowie Mikrogliose.

Bei Mäusen des Alzheimer-Modells APP751^{SL}PS1KI zeigt sich im Alter von zehn Monaten ein einzigartig früher Neuronenverlust in der hippocampalen Region CA1/2. Dieser degenerative Prozess wurde bislang nicht auf Geschlechtsunterschiede untersucht. Daher wurde in dieser Arbeit mittels eines stereologischen Programms, das als „State-of-the-art“-Methode gilt, der Neuronenverlust in hippocampalen CA1-Regionen bei sechs Monate alten Mäusen quantifiziert und im Hinblick auf einen Geschlechtsunterschied untersucht. Dabei ergab sich ein signifikant höherer hippocampaler Neuronenverlust bei den weiblichen Mäusen im Vergleich zu den männlichen Tieren. Eine eindeutige Erklärung für den Geschlechtseffekt gibt es nicht, es existieren jedoch verschiedene Erklärungsansätze. So können extrazelluläre A β -Ablagerungen in Form der Amyloidplaques als Ursache für den Geschlechtseffekt des Neuronenverlustes angesehen werden. Da ein direkter Zusammenhang zwischen extrazellulärer Amyloidablagerung und Neuronenverlust bislang jedoch nicht gezeigt werden konnte, tritt die Akkumulation von intrazellulärem A β in den Vordergrund. Von diesem ist nicht nur eine Korrelation zur Schwere der Erkrankung und ein direkter Zusammenhang zum Neuronenverlust bekannt, es zeigen sich zudem auch geschlechtsspezifische Unterschiede.

Summary

Epidemiologic studies concerning the Alzheimer Disease have shown a gender effect regarding incidence (by which should be understood the number of new discovered disease cases in a specific population and time) and prevalence (which is the total of disease cases in a specific population and time).

Women prove to have a higher risk. It is interesting that the Alzheimer Disease is the only type of demence that shows the relevant gender differences relating to epidemiology, risk factors and cognitive deficits. Mouse models which were developed in the objective to get deeper knowledge of the AD reflect the typical characteristics of the disease. Part of these typically neuropathological hallmarks are especially amyloid plaques and neurofibrillary tangles, but also synaptic changes, neuron loss and reactive astrozytosis as well as microgilosis.

Already at the age of 10 months, mice of the AD-model APP751^{SL}PS1KI show a uniquely early neuron loss located in the hippocampal area CA1/2. So far, this degenerative proces has not yet been analysed in view of gender differences. That is the reason why this thesis deals with the quantifying the neuron loss of six months old mice in the hippocampal area CA1 as well as the analysis of the gender differences using the stereological program that is the state of the art method. This analysis showed a significantly higher hippocampal neuron loss of female mice compared to their male counterparts. There is no definite explanation for the gender difference. However, different starting points for explanations exist. Extracellular β -amyloid deposits in form of amyloid plaques might be seen as the cause fort the gender effect of the neuron loss. As no direct connection between extracellular amyloid deposits and neuron loss have been shown so far, the main focus becomes nowadays on the accumulation of intracellular A β . Not only a correlation of the intracellular A β to the severity of the disease and a direct connection to the neuron loss is known, but in addition, gender specific differences appear.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A β	β -Amyloid
AD	Alzheimer Disease / Alzheimer Demenz
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
AICD	APP-Intrazelluläre Domäne
Aph	Anterior Pharynx–Defective
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor Protein / Amyloid-Vorläufer-Protein
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
BACE 1, 2	Beta-site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme
bzw.	beziehungsweise
CA	Cornu Ammonis (Ammonshorn)
CTF	C-terminales Fragment
d.h.	das heißt
DNA	Deoxyribonucleic Acid
etc.	et cetera
EOAD	Early Onset Alzheimer Disease
FAD	Familiäre Form der Alzheimer Demenz
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
HET	Hormon-Ersatz-Therapie
hAPP	Humanes APP
ICD-10	International Classification Of Diseases, 10.Revision

IDE	Insulin-Degrading Enzyme / Insulysin
LH	Luteinisierendes Hormon
MAP	Mikrotubuli-Assoziierte Proteine
MVB	Multivesicular Body
NCT	Nicastrin
NEP	Neprilysin
NFT	Neurofibrillary Tangles (Neurofibrillen)
NGF	nerve growth factor
NSAID	Nonsteroid Antiinflammatory Drug
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pen	Presenilin-enhancer
PHF	Paired Helical Filaments (Gepaarte helikale Filamente)
PS 1, 2	Präsenilin 1, 2
SAE	Subkortikale Arteriosklerotische Enzephalopathie / Morbus Binswanger
sAPP α , β	sezerniertes APP α , β
SSPE	Subakute Sklerosierende Panenzephalitis
TACE	Tumor necrosis factor α converting enzyme

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Summary.....	3
Abkürzungen	4
Inhaltsverzeichnis	6
1. Einleitung	9
1.1 Definition Demenz	9
1.2 Demographische Daten zur Demenz.....	9
1.3 Einteilung der Demenzen	10
1.4 Alzheimer-Erkrankung	12
1.4.1 Demographische Daten	12
1.4.2 Historisches zur Alzheimer-Erkrankung.....	12
1.4.3 Klinischer Verlauf	13
1.4.4 Neuropathologie der Alzheimer Erkrankung	15
1.4.4.1 Makroskopische Pathologien der Alzheimer-Demenz.....	15
1.4.4.2 Mikroskopische Pathologien der AD	16
1.4.4.2.1 Plaques	17
1.4.4.2.2 Neurofibrillen	18
1.4.4.2.3 Amyloidangiopathie	19
1.4.4.2.4 Synaptische Veränderungen.....	19
1.4.4.2.5 Neuronenverlust	20
1.4.5 Risikofaktoren der Alzheimer Erkrankung	21
1.4.5.1 Erbliche Faktoren im Zusammenhang mit familiärer Alzheimer-Demenz.....	21
1.4.5.2 Apolipoprotein E4	22

1.4.5.3 Kopfverletzungen	23
1.4.5.4 Bildungsstand und soziales Niveau	23
1.4.5.5 Geschlecht	23
1.4.5.6 Potentielle Schutzfaktoren.....	25
1.4.6 Pathogenese der Alzheimer Erkrankung	27
1.4.6.1. Die β -Amyloid-Kaskaden-Hypothese	27
1.4.6.2 Das Amyloid-Vorläufer-Protein APP	29
1.4.6.3 Die APP-Prozessierung	29
1.4.7 Mausmodelle der Alzheimer Demenz.....	31
2. Material und Methoden	33
2.1. Mäuse	33
2.2. Perfusion.....	33
2.3. Arbeit am Kryostat	34
2.4. Nissl-Färbung	34
2.5. Stereologische Untersuchung	36
2.6 Berechnung der hippocampalen Neuronenzahl.....	42
2.7 Berechnung des Volumens.....	43
2.8 Statistische Auswertung	43
3. Ergebnisse	44
3.1 Neuronenzahl	45
3.1.1 Modell APP751 ^{SL} PS1KI	45
3.1.2 Modell PS1KI.....	46
3.1.3 Vergleich der Modelle APP751 ^{SL} PS1KI und PS1KI.....	47
3.2 Volumen	48
3.2.1 Modell APP751 ^{SL} PS1KI	48

3.2.2 Modell PS1KI.....	49
3.2.3 Vergleich der Modelle APP751 ^{SL} PS1KI und PS1KI.....	51
4. Diskussion	53
5. Literaturverzeichnis.....	65
6. Danksagungen	81
7. Curriculum Vitae.....	82

1. Einleitung

1.1 Definition Demenz

Unter dem Begriff Demenz versteht man eine „über Monate bis Jahre chronisch progrediente degenerative Veränderung des Gehirns mit Verlust von früher erworbenen kognitiven Fähigkeiten“ (Pschyrembel, 2002).

Laut ICD-10 liegt eine Demenz vor, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

Symptome	Beeinträchtigung höherer kortikaler Funktionen einschließlich Gedächtnis, Denken, Orientierung, Auffassung, Lernfähigkeit, Sprache
Ausprägungsgrad	Beeinträchtigung in den persönlichen Aktivitäten des täglichen Lebens
Dauer	mindestens sechs Monate
Ausschlusskriterien	Bewusstseinsstörungen
Verlauf	chronisch-progredient

Tabelle 1 : Demenz-Definition der ICD-10

1.2 Demographische Daten zur Demenz

In Deutschland leben zur Zeit zwischen 1,2 und 1,4 Millionen Demenzkranke. In der Altersgruppe der über 65-Jährigen sind davon ungefähr 954.000 Menschen betroffen, das sind 7,2 % dieser Altersgruppe. Die Prävalenzrate, d.h. der Anteil von Kranken in der Bevölkerung zu einem bestimmten Zeitpunkt, steigt mit dem Alter signifikant an (Bickel, 2000).

Dies kann die folgende Tabelle verdeutlichen:

Alter (Jahre)	Betroffene pro Altersgruppe	Betroffene in Zahlen
65 – 69	1,20%	48.000
70 – 74	2,80%	99.000
75 – 79	6,00%	171.000
80 – 84	13,30%	173.000
85 – 89	23,90%	272.000
90 +	34,60%	172.000

Tabelle 1: Prävalenz von Demenzen nach dem Alter (Bickel, 2000)

Ausgehend von einer unveränderten Prävalenzrate ist mit zunehmendem Durchschnittsalter der Bevölkerung in den nächsten Jahren von einer deutlichen Zunahme der Fallzahlen auszugehen. So vermutet man, dass sich die Gesamtzahl der Demenzkranken bis zum Jahre 2050 auf ca. 2 Millionen beinahe verdoppeln wird (www.demenztechnik.de).

Somit ist anzumerken, dass das Alter als der wichtigste Risikofaktor angesehen werden kann, an einer Demenz zu erkranken.

1.3 Einteilung der Demenzen

Demenzen werden in primäre und sekundäre Formen unterteilt (siehe Abbildung 1). Sekundäre Formen der Demenz kommen insgesamt seltener vor (10%) und sind gekennzeichnet durch das Auftreten im Zusammenhang anderer Erkrankungen, wie zum Beispiel im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen (13%), Alkoholabusus (8%), Hydrocephalus malresorptivus (4%), metabolischen Erkrankungen wie Hyperthyreose (2-3%), Avitaminosen (2%) und auch als Nebenwirkung von Medikamenten wie Anticholinergika, Benzodiazepinen, Neuroleptika und anderen. Diese Demenzercheinungen treten meist vorübergehend auf und sind reversibel.

Primäre Formen der Demenz treten wesentlich häufiger (90%) auf und können in degenerative (50%), vaskuläre (30%) und gemischte Formen (20%) unterteilt werden.

Mögliche Ursachen für die zweithäufigste Form der Demenz, die vaskuläre Demenz können Mikroangiopathien wie Morbus Binswanger/SAE (subkortikale arteriosklerotische

Enzephalopathie) oder die Leukenzephalopathie sein. Aber auch strategische Einzelinfarkte wie ein Posteriorinfarkt oder Vaskulitiden können zu dieser Form der Demenz führen.

Die größte Gruppe der Demenzen ist die der degenerativ verursachten Demenzen. Auch hier sind mehrere Erkrankungen als mögliche Ursachen zu nennen. So wird in diese Gruppe der Demenzerkrankungen zum Beispiel der Parkinson-Demenz-Komplex mit Lewy-Körperchen eingeordnet, ebenso der Morbus Pick, eine frontotemporal betonte degenerative Gehirnerkrankung, und schließlich die Erkrankung, die mit zwei Drittel aller Demenzerkrankungen die häufigste Ursache einer Demenz darstellt: die Alzheimer-Erkrankung.

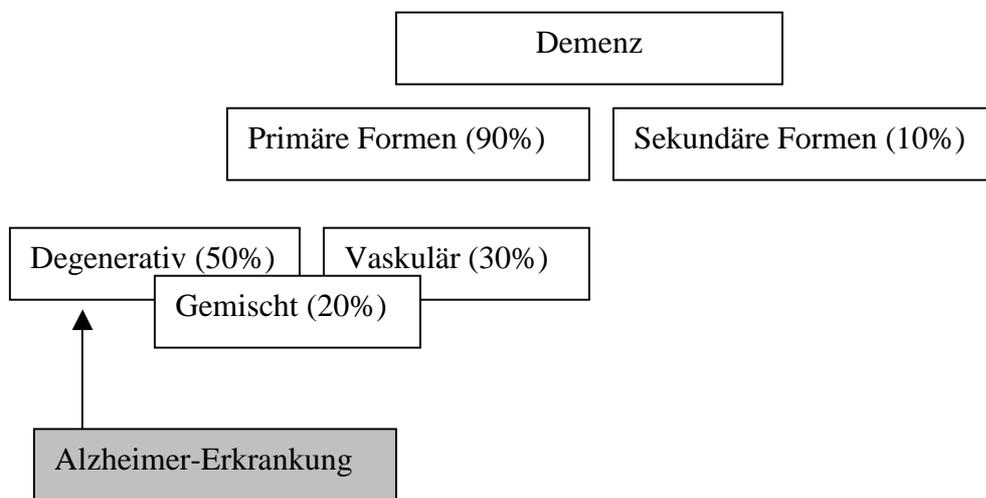


Abbildung 1: Einteilung der Demenzen

1.4 Alzheimer-Erkrankung

1.4.1 Demographische Daten

Die Alzheimer-Erkrankung ist die Hauptursache altersabhängiger Demenz. Mit ungefähr zwei Dritteln aller Demenzfälle sind in Deutschland ca. 750.000 Menschen von dieser Erkrankung betroffen. Es wurde ermittelt, dass in westlichen Ländern ca. 5% der Bevölkerung über 65 Jahren und ca. 20% der Bevölkerung über 80 Jahren betroffen sind. Direkt nach Schlaganfällen ist die Demenz vom Alzheimer-Typ die häufigste schwere Störung der Hirnfunktion im Alter und liegt an vierter Stelle der Todesursachen-Statistik (www.alzheimer.de).

1.4.2 Historisches zur Alzheimer-Erkrankung

Bereits im Jahre 1906 beschrieb der bayerische Nervenarzt Dr. Alois Alzheimer eine „eigenartige Krankheit der Hirnrinde“. Seine 51-jährige Patientin namens Auguste D. war im Jahre 1901 erstmals durch Eifersuchtsanfälle gegen ihren Mann auffällig geworden. Später



machten sich bei ihr rasch zunehmende Gedächtnisschwächen bemerkbar: sie fand sich in ihrer Wohnung nicht mehr zurecht, schleppte Gegenstände hin und her, versteckte sie und glaubte zuweilen, man wolle sie umbringen. Nachdem sie fünf Jahre später verstorben war, untersuchte A. Alzheimer ihr Gehirn und fand dabei arteriosklerotische Veränderungen, Neuronenverlust und steinharte Ablagerungen, die sogenannten Neurofibrillen und Plaques. Dieser wird als der erste dokumentierte Fall der Alzheimer-Erkrankung angesehen.

Abbildung 2: Auguste D.

1.4.3 Klinischer Verlauf

Bei der Demenz vom Alzheimer-Typ handelt es sich um eine langsam fortschreitende Erkrankung, die meist schon mehrere Jahrzehnte vor dem Auftreten erster Symptome beginnt. So beträgt die verbleibende Lebenszeit nach Diagnosestellung durchschnittlich sieben Jahre, wobei dies von Fall zu Fall unterschiedlich sein kann. Der Verlauf der Krankheit wird medizinisch in drei Stadien eingeteilt. Diese durchlebt jeder Patient in unterschiedlichem Tempo und unterschiedlicher Intensität, da das Alter, die Lebensumstände und auch der gesundheitliche Allgemeinzustand des einzelnen Patienten eine große Rolle spielen (www.alzheimer.de).

Im frühen Stadium bemerken Patienten zunächst ihre Vergesslichkeit, die hauptsächlich das Speichern neuer Information betrifft. Es kommt zur Veränderung der Charakterzüge und Stimmungsschwankungen. Wortfindungsstörungen treten auf, der Patient kann Sätze nicht zu Ende sprechen und gebraucht umständliche sprachliche Formulierungen. Die örtliche Desorientierung beschränkt sich noch auf die nicht vertraute Umgebung, die zeitliche Desorientierung vor allem auf Datum und Uhrzeit. Als Folge dieser Symptome fallen die Patienten in eine geistige Passivität, während ihre körperliche Aktivität zunimmt: sie sind unruhig und müssen immer in Bewegung sein.

Im mittleren Stadium, welches pflegende Angehörigen als das am schwierigsten zu bewältigende beschreiben, kann die Erkrankung nicht mehr ignoriert werden. Das selbständige Erledigen von alltäglichen Tätigkeiten wie Waschen, Ankleiden, etc. wird für die Patienten unmöglich. Auch hier zeigen sich emotionale Instabilität und Stimmungsschwankungen, die Patienten fühlen sich rastlos und in Aufruhr. Es kann zu zwanghaftem Verhalten, Wahnvorstellungen und Halluzinationen kommen. Die Vergesslichkeit bezieht sich in diesem Stadium auch auf die Namen von vertrauten Personen und auf Ereignisse. Zu den Wortfindungsstörungen kommen Schwierigkeiten beim Sprachverständnis hinzu. Die örtliche Desorientierung betrifft nun auch die vertraute Umgebung, die zeitliche Desorientierung neben Datum und Uhrzeit auch die Jahreszeit.

Im späten Stadium erkennen die Patienten vertraute Personen und ihre Angehörigen nicht mehr, ihr Gedächtnis versagt völlig, sie sind vollkommen abhängig. Alltägliche Tätigkeiten wie Essen und Trinken werden immer schwieriger. Die Vergesslichkeit betrifft nun auch das

Langzeitgedächtnis. Die Sprache der Patienten beschränkt sich auf wenige Worte oder Silben, wenn sie nicht sogar komplett verstummen. Die motorischen Fähigkeiten verschlechtern sich zunehmend, der Gang wird unsicher und kleinschrittig. Viele Patienten sitzen im Rollstuhl oder sind bettlägerig. Durch die körperlichen Beeinträchtigungen (unter anderem kompletter Kontrollverlust über Darm und Blase, Hustenanfälle und Aspiration bei Essversuchen) kommt es zur allgemeinen Schwäche der Patienten. Dadurch werden sie höchst anfällig für Infektionen (grippale Infekte, Pneumonie, Zystitis, Nephritis, etc.), welche meist zum Tode führen.

1.4.4 Neuropathologie der Alzheimer Erkrankung

Nur selten findet man die Alzheimer Erkrankung bei Menschen, die jünger als 60 Jahre sind. Ab dieser Altersstufe jedoch steigt die Inzidenz stark an: 20 % der Bevölkerung über 80 Jahren sind betroffen. Aus diesem Grund muss man beachten, dass sich die für AD typischen neuropathologischen Veränderungen zusätzlich zu denen finden, die physiologisch im gealterten Gehirn vorhanden sind. Denn auch dort zeigen sich neben milder Gehirnatrophie möglicherweise wenige Fibrillen und Plaques in Neocortex, Hippocampus und entorhinalen Regionen (Hof et al., 1996).

Bei Gehirnen, die durch die Alzheimer Erkrankung beeinflusst wurden, finden sich sowohl makroskopische als auch mikroskopische Veränderungen.

1.4.4.1 Makroskopische Pathologien der Alzheimer-Demenz

Makroskopisch ist unter anderem eine leichte Verdickung der Leptomeningen über der Konvexität und besonders in der Nähe der Mittellinie festzustellen. Diese beruht mikroskopisch auf einer Anhäufung von Fibroblasten und Kollagen. Die Blutgefäße innerhalb der Meningen sind mit β -Amyloid infiltriert, wobei die Aminosäuresequenz gegenüber der des β -Amyloid im Parenchym leichte Unterschiede aufweist (Miller et al., 1989). Die Hirnnerven sind unbeteiligt, abgesehen von einer signifikanten Atrophie des olfaktorischen Bulbus bis hin zur Durchsichtigkeit. Weiterhin zeigen sich makroskopische Veränderungen wie ein verdünntes kortikales Band und geschrumpfte Gyri in frontotemporalen Regionen und im Temporallappen. Dort ist vor allem der parahippocampale Gyrus betroffen. Aus dem Schrumpfen der Gyri ergibt sich eine Erweiterung der Sulci und der Ventrikel. Dabei zeigt sich besonders durch das Schrumpfen von Amygdala und Hippocampus eine Vergrößerung der Seitenventrikel. In den meisten Hirnschnitten zeigt sich der Hippocampus auf die Hälfte der ursprünglichen Größe geschrumpft. Die Atrophie des Hippocampus findet schon früh im Verlauf der Alzheimer Erkrankung statt (Foundas et al., 1997; Laakso et al., 1998) und wird als Ursache für die allmählichen kognitiven Defizite zu Beginn der Erkrankung vermutet (Jodar-Vicente, 2001).



Abbildung 3: AD-Gehirn (links) mit geschrumpften Gyri und erweiterten Sulci im Vergleich zum gesunden Gehirn (rechts) (St George-Hyslop, 2000)

1.4.4.2 Mikroskopische Pathologien der AD

Zu den mikroskopischen Veränderungen in AD-Gehirnen zählen zunächst diejenigen, die auch Alois Alzheimer bereits bei seiner Patientin festgestellt hatte: Plaques und Neurofibrillen. Diese sind in AD-Gehirnen durchschnittlich in höheren Konzentrationen zu finden als in gesunden älteren Gehirnen oder bei anderen Erkrankungen. Trotzdem gibt es sowohl Fälle, bei denen sich eine große Dichte an Plaques im Gehirn fand, obwohl keine Alzheimer-Erkrankung vorlag (Katzman et al., 1988), als auch Berichte von Demenzpatienten mit einer Vielzahl an Plaques ohne jedoch eine signifikante Anzahl an Neurofibrillen (Terry et al., 1987). Ein solcher Fall lag auch bei dem zweiten von Alois Alzheimer beschriebenen Patienten vor (Graeber et al., 1997).

1.4.4.2.1 Plaques

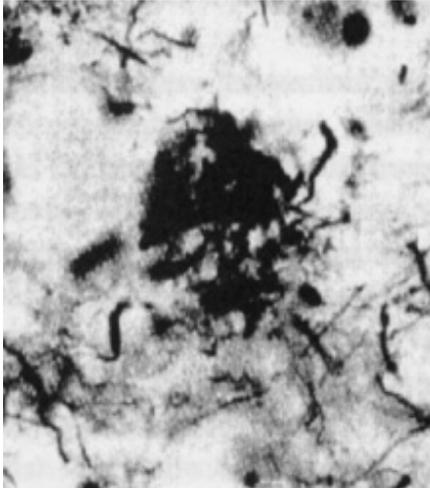


Abbildung 4: Plaques

Extrazelluläre Plaques, die man lange Zeit senile Plaques nannte, obwohl man sie auch im Präsenium findet (Terry et al., 1964), kann man bei der AD in zwei verschiedenen Arten vorfinden: als diffuse Plaques und als neuritische Plaques.

Die diffusen Plaques von amorpher Gestalt enthalten unstrukturierte β -Amyloidpeptide, die mit Thioflavin S angefärbt werden können und nur winzige Büschel an geformten Amyloidfilamenten. Abnorme Neuriten fehlen im Gegensatz zu den neuritischen Plaques völlig. Man findet die diffusen Plaques sowohl bei der Alzheimer Erkrankung als auch bei nicht-dementen älteren Menschen.

Die neuritischen Plaques enthalten dagegen einen extrazellulären Kern aus dichten Bündeln von Amyloidfibrillen, die mit Thioflavin S angefärbt werden können und zwei Arten von dystrophen Neuriten: entweder solche mit gepaarten helikalen Filamenten/PHF (sogenannte fusiforme Neuriten), die typischerweise bei Alzheimer-Patienten gefunden werden, oder dystrophe Neuriten ohne PHF, welche man sowohl bei Alzheimer-Patienten als auch bei nicht-dementen älteren Menschen findet. Zusätzlich enthalten die dystrophen Neuriten unter anderem Amyloidvorläufer-Protein/APP (Ishii et al., 1989; Cole et al., 1991; Cras et al., 1991; Joachim et al., 1991), Tauprotein (Joachim et al., 1987), Proteinkinase C (Masliah et al., 1990; Clark et al., 1991), Synaptophysin (Brion et al., 1991; Masliah et al., 1991; Masliah and Terry, 1993), Ubiquitin (Perry et al., 1987) und verschiedene Neurotransmitter (Armstrong and Terry, 1985; Armstrong et al., 1986; Armstrong et al., 1989; Munoz, 1991). In der Umgebung der neuritischen Plaques finden sich zusätzlich reaktive Astrozyten und Mikrogliazellen (Terry et al., 1964).

1.4.4.2 Neurofibrillen



Abbildung 5: Neurofibrillen

Die zweite von Alois Alzheimer beschriebene Veränderung im Gehirn von Alzheimer-Patienten sind die intrazellulären Neurofibrillen (neurofibrillary tangles, NFT). Diese werden jedoch nicht nur als spezifisch für die Alzheimer Erkrankung angesehen, da man sie unter anderem auch im Rahmen der postenzephalitischen Parkinson-Erkrankung (Greenfield and Bosanquet, 1953) und der subakuten sklerosierenden Panenzephalitis (SSPE) (Mandybur et al., 1977) findet. Im Neocortex gesunder älterer Menschen sind sie nur sehr selten vorhanden, während sie bei den meisten Fällen der AD in großer Anzahl unter anderem in entorhinalen und hippocampalen Regionen und im Neocortex auftreten. Bei manchen älteren Alzheimer-Patienten (älter als 70 Jahre) fehlen die Neurofibrillen größtenteils oder sogar völlig (Terry et al., 1987), wie bereits Alois Alzheimer an seinem zweiten AD-Patienten bemerkte (Graeber et al., 1997). Die Neurofibrillen bestehen aus gepaarten helikalen Filamenten (PHF) (Kidd, 1963; Terry, 1963). Betrachtet man die Struktur der PHFs genauer, lassen sich zwei unterschiedliche Formen erkennen: zum einen gerade verlaufende Filamente mit Abständen von 12-18 nm voneinander, zum anderen umeinander geschlungene Filamente mit Abständen von 15-25 nm. Hauptbestandteil der PHF ist das abnormal phosphorylierte Tau-Protein (Grundke-Iqbal et al., 1986; Pollock et al., 1986), welches zur Familie der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAP) gehört.

1.4.4.2.3 Amyloidangiopathie

Ein weiteres neuropathologisches Merkmal der Alzheimer Erkrankung ist die Amyloidangiopathie. Bereits im Jahre 1938 fand Scholz in den Blutgefäßen von Alzheimer-Patienten Amyloidablagerungen (Scholz, 1938) und folgte dabei der Entdeckung von Divry, der als erster zeigen konnte, dass das homogene Material in den Plaques aus Amyloid besteht (Divry, 1927). Eine Infiltration der Blutgefäßwände mit β -Amyloid findet sich beinahe bei allen Fällen der AD, wobei hauptsächlich leptomeningeale Gefäße von geringer bis mittlerer Größe und kortikale Gefäße betroffen sind. Während hippocampale Regionen weniger involviert sind, sind in occipitalen und zerebellären Regionen diese Infiltrate häufig vorhanden. Daher scheint es offensichtlich, dass zwischen der Intensität der Amyloidangiopathie und der Anzahl an parenchymatösen Plaques oder Fibrillen nur ein sehr geringer Zusammenhang besteht.

1.4.4.2.4 Synaptische Veränderungen

Mit Hilfe des präsynaptischen Markers Synaptophysin konnte im Neokortex von AD-Gehirnen ein durchschnittlicher Rückgang der Dichte an präsynaptischen Endungen um 45% gezeigt werden (Davies et al., 1987; Brion et al., 1991; Honer et al., 1992). Quantitative Studien mittels Elektronenmikroskop an Autopsiematerial, vor allem am präfrontalen Kortex, ergaben einen Synapsenverlust von 27%-42%, gleichzeitig mit starken pathologischen Veränderungen der Synapsen (Hamos et al., 1989; Weiler et al., 1990). Auch in bestimmten Regionen des Hippocampus ist die Synaptophysin-Immunreaktivität verändert (Samuel et al., 1994; Scheff et al., 1996). Mittels des synaptischen Markers EP10 lässt sich zeigen, dass man in Gehirnen von Alzheimerpatienten vor allem in Hippocampus und Neokortex einen selektiven regionalen Synapsenverlust findet, während dies im Hippocampus und im temporalen und occipitalen Kortex von gesunden Gehirnen nicht der Fall ist (Honer et al., 1992). Klinisch macht sich die Abnahme der Dichte an Synapsen in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten vor allem am Verlust der kognitiven Fähigkeiten bemerkbar (Coleman and Yao, 2003).

1.4.4.2.5 Neuronenverlust

Schon bei oberflächlicher Untersuchung kann man im Neokortex von AD-Gehirnen eine verminderte Konzentration an größeren Neuronen feststellen. Zur Quantifizierung dieses Neuronenverlustes werden bildgebende Verfahren und in letzter Zeit immer häufiger stereologische Methoden verwendet. Während jüngere Patienten (50-69 Jahre) im Vergleich zu älteren Patienten (70-90 Jahre) einen großen Verlust aufweisen, ist die Abnahme dennoch in beiden Gruppen signifikant. Whitehouse et al. berichteten als erste über einen Neuronenverlust im cholinergen Basalkern Meynert (Whitehouse et al., 1982; Vogels et al., 1990), welcher die cholinerge Aktivität in Hippocampus und Neokortex beeinträchtigt. Auch im Locus caeruleus kommt es zu Verlusten von pigmentierten Neuronen, wodurch es hier zur Beeinträchtigung der noradrenergen Aktivität kommt (Bondareff et al., 1981). Auf ähnliche Art wird auch der Raphekern durch Neuronenverlust und Schrumpfung in Mitleidenschaft gezogen (Sisodia and Price, 1995). Von allen Regionen des Gehirns sind Hippocampus und der angrenzende entorhinale Kortex besonders früh und stark vom Neuronenverlust betroffen (Wirhth et al., 2004). Kril et al. fanden eine starke Korrelation zwischen der Neuronenanzahl und dem Gehirn- bzw. Hippocampus-Volumen, was sie vermuten ließ, dass die hippocampale Atrophie bei der AD das Ergebnis des Neuronenverlustes darstellt (Kril et al., 2004). Trotz der höchst signifikanten Neuronenverluste zeigt sich dennoch keine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl an kortikalen Neuronen und der Schwere der Krankheit, gemessen mittels globaler psychologischer Demenz-Tests (Terry et al., 1991).

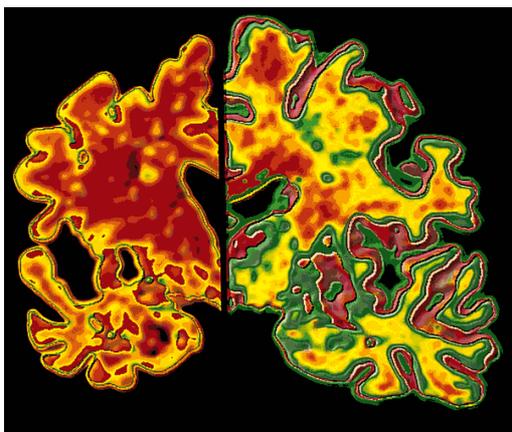


Abbildung 6 : Vergleichende MRT-Bilder eines gesunden Gehirns im Alter von 25 Jahren (rechts) und eines AD-Gehirns (links) (St George-Hyslop, 2000)

1.4.5 Risikofaktoren der Alzheimer Erkrankung

Neben dem wohl wichtigsten Risikofaktor, dem Alter, lassen sich verschiedene weitere Faktoren aufführen, die im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko stehen, an der Demenz vom Alzheimer-Typ zu erkranken.

1.4.5.1 Erbliche Faktoren im Zusammenhang mit familiärer Alzheimer-Demenz

Während in den meisten Fällen die Alzheimer-Demenz eine altersabhängige Erkrankung darstellt, verursacht die autosomal-dominante Vererbung verschiedener mutierter Gene die sogenannte familiäre Alzheimer-Erkrankung (FAD), die bereits im jüngeren Alter auftritt (EOAD, Early Onset Alzheimer Disease). Es handelt sich hierbei im Besonderen um mutierte Formen der Gene, die für das Amyloid-Vorläufer-Protein APP (Chromosom 21), Präsenilin 1 (PS1) (Chromosom 14) und Präsenilin 2 (PS2) (Chromosom 1) kodieren.

Bislang sind sowohl 23 Mutationen im APP-Gen, als auch mehr als 100 Mutationen im PS1-beziehungsweise 6 Mutationen im PS2-Gen bekannt, die zum Auftreten der AD im Alter von 45-60 Jahren bzw. vor dem 50. Lebensjahr führen (Rogaeva, 2002; Tandon and Fraser, 2002). Die genauen Mechanismen sind noch unklar, man vermutet jedoch, dass die Mutationen im APP-Gen in einer Überproduktion des A β -Peptids resultieren, vor allem der Isoformen mit einer Länge von 42 oder 43 Aminosäuren (Cai et al., 1993; Haass et al., 1994; Suzuki et al., 1994; Haass et al., 1995), welche als besonders neurotoxisch gelten (Yankner et al., 1990; Jarrett and Lansbury, 1993; Lorenzo and Yankner, 1994). Die Mutationen führen zu Veränderungen der APP-Prozessierung, da sie in der Nähe der dazu nötigen Sekretase-Schnittstellen lokalisiert sind. So befindet sich die London-Mutation APP_{V717F} in der Nähe der γ -Sekretase-Schnittstelle und ist gekennzeichnet durch den Basenaustausch Valin gegen Phenylalanin, Isoleucin oder Glycin an Position 717 (Chartier-Harlin et al., 1991; Goate et al., 1991; Mullan et al., 1993), während die schwedische Doppelmutation APP_{K670N,M671L} in der Nähe der β -Sekretase an den Positionen 670 und 671 den Basenaustausch Lysin und Methionin gegen Asparagin und Leucin (Mullan et al., 1992) verursacht. Im Falle der London-Mutation kommt es sowohl zu einem erhöhten Verhältnis A β ₄₂/A β ₄₀ (Suzuki et al., 1994; Storey and Cappai, 1999), als auch zum fünf- bis achtfachen Anstieg der Gesamtmenge an A β , während bei der schwedischen Doppelmutation vor allem die Bildung von A β ₄₀ zunimmt (Cai et al., 1993).

Interessante Untersuchungsergebnisse zeigten sich bei Patienten mit Down-Syndrom. Da in ihrem Chromosomensatz das Chromosom 21 dreifach vorhanden ist, kommt es zu einer übermäßigen Expression von APP und Generation von A β (Tokuda et al., 1997). Die bedeutende Rolle des β -Amyloid bei der AD-Pathogenese wird an Patienten deutlich, deren Down-Syndrom-Erkrankung durch eine Chromosomentranslocation verursacht ist, was in sehr seltenen Fällen vorkommen kann. Diese Patienten sind diploid bezüglich des Chromosoms 21 und weisen keinerlei für die AD typische Anzeichen wie zum Beispiel Amyloidplaques auf (Prasher et al., 1998).

Mutationen der Gene, die die Proteine Präsenilin 1 bzw. Präsenilin 2 kodieren, führen zu einer gesteigerten A β 42-Produktion, was eine beschleunigte A β -Aggregation begünstigt (Borchelt et al., 1996; Sisodia and St George-Hyslop, 2002). Man vermutet außerdem, dass Präsenilin 1 und 2 mit anderen Proteinen einen Komplex bilden, der die Aktivität der γ -Sekretase besitzt oder zumindest unterstützt (Tandon and Fraser, 2002; De Strooper, 2003).

1.4.5.2 Apolipoprotein E4

Das Risiko, die vorherrschende sporadische Form der Alzheimer Erkrankung – im Gegensatz zur familiären Form – zu entwickeln, wird mit dem Gen für das Apolipoprotein E (ApoE) auf dem Chromosom 19 in Verbindung gebracht. Vor allem Menschen homozygot bezüglich des ApoE ϵ 4-Allels zeigen eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit, ab dem Alter von 80 Jahren eine Alzheimer Erkrankung zu entwickeln (Saunders et al., 1993a).

Das ApoE-Gen weist beim Menschen 3 Varianten auf: Die meist verbreitete Variante ist ApoE ϵ 3, welche durch das Vorhandensein von Cystein am Codon 112 determiniert ist. Die zweite Variante, ApoE ϵ 4, weist an dieser Stelle eine Substitution durch Arginin auf, während die dritte, ApoE ϵ 2, Cystein sowohl am Codon 112 als auch am Codon 158 enthält. Man verglich Alzheimer-Patienten mit gesunden Kontrollgruppen und fand heraus, dass die Häufigkeit des ApoE ϵ 4-Allels bei AD-Patienten erhöht ist, d.h., das ϵ 4-Allel war bei annähernd 40 % der Alzheimer-Patienten vorhanden (Saunders et al., 1993b), während nur ungefähr 2 % der Patienten das ϵ 2-Allel aufwiesen (Corder et al., 1994). Zudem scheint auch die Anzahl der ApoE ϵ 4-Allele eine große Rolle zu spielen: so tritt bei ApoE ϵ 4-homozygoten Patienten die Alzheimer-Erkrankung früher auf als bei heterozygoten Patienten (Corder et al., 1993). Bei Menschen mit ApoE ϵ 2-Allel zeigt sich möglicherweise ein spätes Auftreten der AD (Corder et al., 1994). Wie der Zusammenhang zwischen ApoE ϵ 4 und dem frühen

Auftreten der AD erklärt werden kann, ist noch unklar. Man vermutet, dass die Apolipoprotein Produktion, Verteilung und Abbau des A β -Peptides beeinflusst.

1.4.5.3 Kopfverletzungen

Kopfverletzungen stellen ebenfalls einen bedeutenden Risikofaktor bei der Alzheimer Erkrankung dar. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich um ein einmaliges Geschehen mit folgender Bewusstlosigkeit oder Krankenhausaufenthalt oder um wiederholte Traumata wie zum Beispiel bei Boxern handelt (Mortimer et al., 1985). Eine mögliche Erklärung bietet die Beobachtung, dass die Promoterregion des APP-Gens Elemente enthält, die durch Noxen wie Traumata zur übermäßigen Produktion von APP und β -Amyloid aktiviert werden. Dies wiederum führt zur Entwicklung von β -Amyloid-enthaltenden diffusen Plaques, welche man tatsächlich in Neokortex von Boxern zusammen mit Neurofibrillen im typischen AD-Muster finden kann (Roberts et al., 1990; Roberts et al., 1994).

1.4.5.4 Bildungsstand und soziales Niveau

Im Jahre 1998 berichtete Mortimer, dass möglicherweise ein niedriger Bildungsstand ein Risikofaktor für die Alzheimer Erkrankung darstellen könnte (Mortimer et al., 1998). Mit der großen Shanghai-Studie wurde diese Vermutung bestätigt: mehr als ein Viertel der untersuchten Alzheimer-Patienten hatte keinerlei Bildung erfahren (Hill et al., 1993). Cummings et al. erklären, dass das Vorhandensein von Bildung und Intelligenz vermutlich eine Art kognitive Reserve und Schwelle darstellt, die das Auftreten der Alzheimer Erkrankung erschwert (Cummings et al., 1998).

1.4.5.5 Geschlecht

Verschiedene epidemiologische Studien haben gezeigt, dass bezüglich der Inzidenz und Prävalenz der Alzheimer Erkrankung ein Geschlechtsunterschied vorliegt. Frauen weisen hierbei ein erhöhtes Risiko auf (Jorm and Jolley, 1998; Andersen et al., 1999; Fratiglioni et al., 2000). Eine eindeutige Erklärung für den Geschlechtseffekt gibt es nicht, es existieren jedoch verschiedene Erklärungsansätze. Studien lassen vermuten, dass die

Geschlechtsunterschiede bei kognitiven Funktionen auf die verschiedenen Hormone zurückzuführen sind, die lebenslang das zentrale Nervensystem und die Kognition beeinflussen, besonders die gonadalen Steroidhormone wie Östrogen. Es zeigte sich, dass sogar exogenes Östrogen die kognitiven Fähigkeiten positiv beeinflusst (Phillips and Sherwin, 1992) und dass Östrogenmangel im Zusammenhang mit einer reduzierten Gedächtnisleistung steht (Newton et al., 1996). Erklären lassen sich diese Erkenntnisse durch die vielfältigen Wirkungen des Hormons Östrogen im Gehirn, zu denen man antioxidative Aktivität (Mooradian, 1993), Förderung der neuronalen Plastizität sowie Interaktion mit neurotrophischen und Wachstums-Faktoren (Sohrabji et al., 1994) zählt. Nach der Menopause sinkt der Östrogenspiegel ab und es wird vermutet, dass der Östrogenmangel die Entwicklung oder Manifestation einer neurodegenerativen Erkrankung wie AD begünstigt. So besitzen Östrogene im Gehirn auch Alzheimer-relevante Funktionen, wie Schutz vor dem zytotoxischen Effekt der β -Amyloid-Peptide (Sagara et al., 1996), Verminderung der Akkumulation der β -Amyloid-Peptide sowie Abschwächung der inflammatorischen Prozesse aufgrund neuritischer Plaques (Ershler, 1993). Interessanterweise fand sich auch eine Reduktion der zirkulierenden Spiegel an ApoE (Muesing et al., 1992) durch Östrogene, denn auch das Risiko, aufgrund des ApoE ϵ 4-Allels an AD zu erkranken, scheint bei Frauen größer zu sein als bei Männern (Poirier et al., 1993; Farrer et al., 1995). Östrogen scheint sowohl präventive als auch therapeutische Auswirkungen auf die AD zu besitzen (Robinson et al., 1994). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass eine postmenopausale Hormonersatztherapie (HET) das Risiko für AD vermindert (Paganini-Hill and Henderson, 1994; Mortel and Meyer, 1995; Manly et al., 2000). Jedoch nicht alle Studien zu diesem Thema kamen zum gleichen Ergebnis: Barrett-Connor and Kritz-Silverstein fanden keinen Effekt der HET auf kognitive Funktionen (Barrett-Connor and Kritz-Silverstein, 1993) und auch Graves et al. konnten keinen Zusammenhang zwischen HET und Alzheimer Erkrankung feststellen (Graves et al., 1990). Während einige Studien von sinkender Inzidenz und verzögertem Auftreten der AD unter HET berichten (Tang et al., 1996; Asthana et al., 2001), konnten andere den Nutzen der HET nicht bestätigen (Mulnard et al., 2000; Wang et al., 2000) oder berichteten sogar von einem wachsenden Risiko, unter einer Östrogen-Ersatz-Therapie eine Demenz zu entwickeln (Shumaker et al., 2003). Nach neuesten Untersuchungen scheint der Beginn der HET ein kritischer Punkt zu sein: demnach wird der größtmögliche Schutz gegen AD erreicht, wenn die HET unmittelbar in der frühen Postmenopause begonnen wird, wobei die protektiven Effekte der Behandlung über einen langen Zeitraum anhalten (Jacobs et al., 1998; Marder and Sano, 2000). Weitere Studien konzentrieren sich auf die

Rolle anderer Hormone der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse, denen man bislang wenig Beachtung geschenkt hat, vor allem auf die Gonadotropine. Unter physiologischen Bedingungen besteht zwischen dem gonadalen Steroidhormon Östrogen und dem Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) des Hypothalamus ein negativer feedback-Mechanismus, der in der Postmenopause durch das abrupte Absinken der Östrogenspiegel aus dem Gleichgewicht gerät (Couzinet and Schaison, 1993). Dadurch kommt es zu erhöhten Serumkonzentrationen der Gonadotropine Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikelstimulierendes Hormon (FSH) (Chakravarti et al., 1976). Dieser Konzentrationsanstieg ist bei Alzheimer-Patienten zweifach höher als der Anstieg in der Kontrollgruppe (Bowen et al., 2000; Short et al., 2001). Webber et al. vermuten, dass gerade der postmenopausale Anstieg der Gonadotropin-Konzentrationen - und nicht der sinkende Östrogenspiegel - für das erhöhte Risiko für AD verantwortlich ist (Webber et al., 2004). Bowen et al. konnten die Rolle der Gonadotropine bei AD zusätzlich untermauern: sie lokalisierten erstmals LH im Zytoplasma von hippocampalen CA1-Pyramidenzellen, wobei auch hier ein um mehr als das Zweifache erhöhter Wert bei AD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen gezeigt werden konnte. Bemerkenswerterweise fand sich LH nur in den Neuronen, die bei der AD-Pathologie eine Rolle spielen, einschließlich Neuronen, die Neurofibrillen enthalten, aber nicht in Amyloidplaques (Bowen et al., 2002). Ein weiterer Geschlechtsunterschied lässt sich bei Betrachtung der Gehirne von Alzheimer-Patienten feststellen: in weiblichen Gehirnen zeigen sich stärkere neuropathologische Veränderungen sowie eine größere Anzahl an Neurofibrillen (Barnes et al., 2005) und Plaques (Kraszpulski et al., 2001). Abschließend lässt sich sagen, dass die Alzheimer Erkrankung die einzige Demenzform ist, die relevante Geschlechtsunterschiede bei Epidemiologie, Risikofaktoren und kognitiven Defiziten zeigt (Nedoschill et al., 1999).

1.4.5.6 Potentielle Schutzfaktoren

Von manchen Faktoren wird vermutet, dass sie die Entstehung der Alzheimer Erkrankung verhindern oder zumindest verzögern können. Einige dieser möglichen Schutzfaktoren sind neben der bereits erwähnten Hormonersatztherapie (HET) antiinflammatorische Medikamente wie NSAIDs (nonsteroid antiinflammatory drugs) und Antioxidantien.

Seit Jenkinson et al. über die interessante Beobachtung berichteten, dass Patienten mit Rheumatoider Arthritis ein vermindertes Risiko für AD aufweisen (Jenkinson et al., 1989), widmeten sich mehrere epidemiologische Studien dem Zusammenhang zwischen der

Risikoreduktion für AD unter der Einnahme von NSAIDs (McGeer et al., 1990; Andersen et al., 1995; Fourrier et al., 1996). Einen möglichen biologischen Erklärungsansatz bietet McGeer: bei in vivo- und in vitro- Modellen zeigte sich, dass Entzündungsprozesse zur Entstehung der typischen Pathologie der AD beitragen könnten. Neuritische Plaques, die typischerweise bei der Alzheimer Erkrankung vorkommen, wurden mit entzündungstypischen Erscheinungen wie den Akute-Phase-Proteinen, den aktivierten Mikroglia und der Komplementaktivierung in Verbindung gebracht. Somit scheint es verständlich, dass eine pharmakologische Entzündungshemmung auch die Entwicklung der Alzheimer Erkrankung zu hemmen vermag (McGeer et al., 1996).

Eine weitere Möglichkeit, das Auftreten der Alzheimer Erkrankung hinauszuzögern, könnte die Einnahme von Antioxidantien wie Vitamin E, Vitamin C und Coenzym Q sein. So zeigte sich in einer Studie, dass hohe Dosen an Vitamin E (2000IU/d) sowohl den geistigen Abbau als auch die Einweisung von mäßig dementen Patienten in ein Pflegeheim verzögerten (Zaman et al., 1992).

1.4.6 Pathogenese der Alzheimer Erkrankung

1.4.6.1. Die β -Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Hardy und Allsop formulierten im Jahre 1991 ihre Vermutung zur Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung als sogenannte „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ (Hardy and Allsop, 1991). Diese besagt, dass die extrazelluläre Akkumulation von β -Amyloid-Peptiden, vor allem von A β 42 in sogenannten Amyloidplaques aufgrund einer Fehlregulation der APP-Prozessierung zu den typischen pathologischen Veränderungen der AD führt, die schließlich über Neuronenverlust und Synapsenfunktionsverlust in Gehirnatrophie mit den klinischen Zeichen der Demenz münden (siehe Abbildung 7).

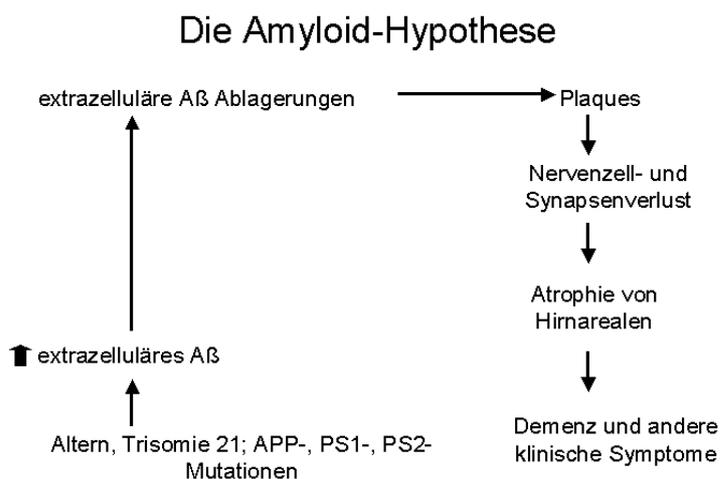


Abbildung 7: Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese (nach Hardy und Allsop (Hardy and Allsop, 1991))

Ein tatsächlicher kausaler Zusammenhang zwischen Amyloidplaques und Neuronenverlust konnte bislang noch nicht hergestellt werden. Vielmehr zeigte sich in einem Mausmodell, dass der deutliche hippocampale Neuronenverlust nicht mit den extrazellulären Amyloidablagerungen korreliert (Casas et al., 2004). Dies führte zu einer Neuformulierung der Hypothese, die nun auch intrazelluläres A β (Wertkin et al., 1993) berücksichtigt, welches schon früh am Krankheitsprozess beteiligt sein könnte. So gelang es Wirths et al., die intrazellulären Synthesorte des β -Amyloid zu lokalisieren (Wirths et al., 2004) und

Fernandez-Vizarra et al. konnten zeigen, dass intrazelluläre A β -Ablagerungen vermutlich als erste neurodegenerative Veränderung in AD-Gehirnen stattfinden (Fernandez-Vizarra et al., 2004). Somit kann man es wagen, eine modifizierte Amyloid-Kaskaden-Hypothese zu formulieren, die besagt, dass ansteigende Konzentrationen an intraneuronalem A β 42 einerseits zu den typischen neurodegenerativen Veränderungen wie Verlust an Synapsen und Neuronen mit konsekutiver Gehirnatrophie und Demenz, andererseits zu einer gesteigerten Sekretion und extrazellulärer Ablagerung von A β mit Bildung der typischen Amyloidplaques führen (siehe Abbildung 8).

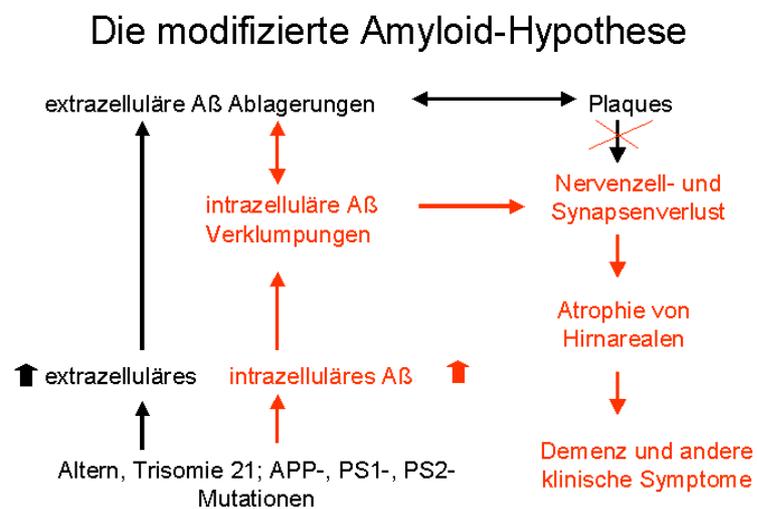


Abbildung 8: Die modifizierte Amyloid-Kaskaden-Hypothese (nach Wirths et al.(Wirths et al., 2004))

1.4.6.2 Das Amyloid-Vorläufer-Protein APP

Die bereits vielfach erwähnten Amyloid-Peptide, die in Form von Amyloidplaques ein typisches Merkmal der Alzheimer Erkrankung darstellen, entstehen durch mehrfache proteolytische Spaltung aus dem Amyloid-Vorläufer-Protein (Amyloid Precursor Protein, APP). Dieses Protein wird auf Chromosom 21 kodiert und besitzt in seiner längsten Form 770 Aminosäuren. Durch alternatives Spleißen können mindestens acht verschiedene Isoformen entstehen, die nach der Anzahl ihrer Aminosäuren benannt werden: APP 677, 695, 696, 714, 733, 751, 752 und APP 770 (Kang et al., 1987; Tanzi et al., 1987; Kitaguchi et al., 1988; Ponte et al., 1988; Yoshikai et al., 1990). Das Amyloid-Vorläufer-Protein ist ein Transmembranprotein Typ I mit einer Transmembrandomäne, einer großen extrazellulären Region und einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz (Kang et al., 1987). Die A β -Sequenz (1-43) befindet sich sowohl im extrazellulären Bereich (28 Aminosäuren) als auch in der Transmembranregion (15 Aminosäuren).

1.4.6.3 Die APP-Prozessierung

Die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins mittels verschiedener Sekretasen ist die bedeutendste posttranslationale Veränderung dieses Proteins. Dabei unterscheidet man zwei verschiedene Prozessierungswege: einen über das Enzym β -Sekretase, wobei es im letzten Schritt zur Freisetzung des A β -Peptids kommt (der sogenannte „amyloidogenic pathway“) und einen über das Enzym α -Sekretase, wobei keine β -Amyloid-Peptide freigesetzt werden (der sogenannte „non-amyloidogenic pathway“).

Der Hauptweg der APP-Prozessierung läuft über die α -Sekretase, die das Amyloid-Vorläufer-Protein innerhalb der A β -Sequenz zwischen den Aminosäuren 16 und 17 spaltet (Esch et al., 1990). Als Spaltprodukte entstehen einerseits lösliches sAPP α , andererseits das membrangebundene COOH-terminale C83-bzw. α -CTF-Fragment. Anschließend wird dieses C83-Fragment mittels des Enzyms γ -Sekretase in die Produkte p3 und CT-57-59 bzw. AICD (APP-intrazelluläre Domäne) gespalten. Als Enzyme mit α -Sekretase-Aktivität kommen Metalloproteasen aus der ADAM-Disintegrin-Familie in Betracht: zum einen ADAM 10, zum anderen ADAM 17, auch bekannt als TACE (tumor necrosis factor converting enzyme) (Buxbaum and Greengard, 1996; Lammich et al., 1999).

Der alternative Weg der APP-Prozessierung führt zur Bildung der A β -Peptide. Hierbei wird das Amyloidvorläufer-Protein mittels des Enzyms β -Sekretase am N-terminalen Ende der A β -Sequenz gespalten. Als Spaltprodukte entstehen dabei das lösliche sAPP β und das membrangebundene COOH-terminale C99-bzw. β -CTF-Fragment. Die wiederum anschließend stattfindende Spaltung dieses Fragmentes mittels γ -Sekretase führt letztendlich zur Freisetzung von A β -Peptiden einerseits und von CT-57-59 bzw. AICD andererseits. Kürzlich wurden die Proteasen, die als β -Sekretasen fungieren, identifiziert. Sie gehören zur kleinen Klasse der Aspartyl-Proteasen und werden BACE 1 und BACE 2 genannt (Vassar et al., 1999). Man vermutet, dass die Präseniline PS1 und PS2 eine entscheidende Rolle beim proteolytischen Schritt der γ -Sekretase spielen. So führten PS1- und PS2-knockouts zu einer Akkumulation von C83 und C99, aber auch zu einer Abnahme an A β -Peptiden andererseits (De Strooper et al., 1998). Es erscheint zunehmend wahrscheinlich, dass die Präseniline eher einen Kofaktor der γ -Sekretase als die Protease selbst darstellen, da Wilson et al. eine γ -Sekretase-Aktivität fanden, die unabhängig von Präsenilinen A β -Peptide erzeugt (Wilson et al., 2002). Die γ -Sekretase ist ein Proteinkomplex, der neben Präsenilin auch Nicastrin, Aph-1 und Pen-2 enthält (Fernandez-Vizarra et al., 2004).

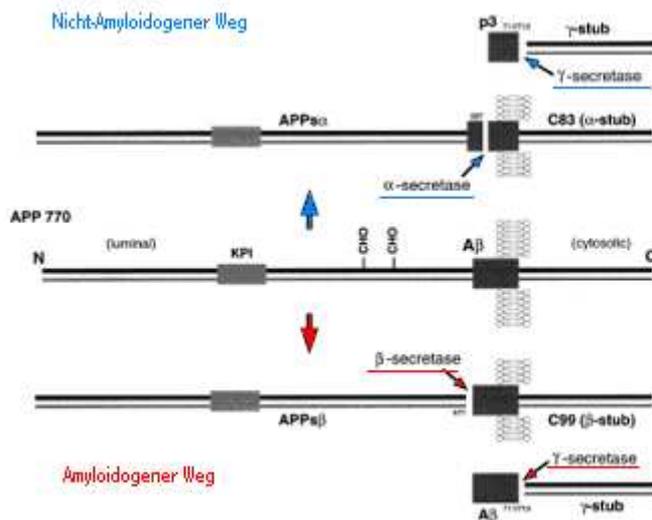


Abbildung 9: Schema der APP-Prozessierung mit dem amyloidogenen Weg (rot) und dem alternativen nicht-amyloidogenen Weg (blau)

1.4.7 Mausmodelle der Alzheimer Demenz

Mit dem Ziel, die Pathogenese der Alzheimer Erkrankung besser zu verstehen und gezielte Therapien entwerfen zu können, werden Mausmodelle entwickelt, die die typischen Merkmale der Alzheimer Erkrankung möglichst genau widerspiegeln sollen. In vielen Fällen wird dabei auf Mutationen der Gene für APP und PS1 zurückgegriffen. So zeigte sich, dass überexprimiertes humanes APP (hAPP) kombiniert mit entweder der schwedischen Doppelmutation APP_{K670N,M671L} oder der London-Mutation APP_{V717F}, zu A β -Spiegeln führt, die für eine stabile Amyloidablagerung ausreichen. Mutationen der Präsenilin-Gene, die zu gesteigerten A β 42-Konzentrationen führen, sind bei Mausmodellen für eine gesicherte Amyloidose zu früheren Zeitpunkten verantwortlich. Im Laufe der Zeit wurden Mausmodelle entwickelt, die die Pathogenese der Alzheimer Erkrankung zunehmend genauer imitieren.

Die Entwicklung des PDAPP-Modells stellte 1995 einen bedeutenden Wendepunkt in der Entwicklung transgener Alzheimer-Mausmodelle dar. Die Mäuse zeigten erstmals Alzheimer-typische Merkmale einschließlich neuritischer Plaques, umgeben von dystrophen Neuriten, Astrogliose, Mikrogliose und Synapsenverlust. Zudem waren die pathologischen Merkmale in diesem Modell in ähnlichen Hirnregionen zu finden wie bei der AD, d.h. hauptsächlich im Hippocampus und Neokortex (Games et al., 1995). Es konnte jedoch nicht der typische Neuronenverlust nachgewiesen werden (Irizarry et al., 1997b).

Das von Novartis entwickelte APP23-Mausmodell dagegen besitzt diese Eigenschaft. Mit stereologischen Methoden wurde ein hippocampaler Neuronenverlust in der Region CA1 ermittelt (Calhoun et al., 1998). Die Ursache des Neuronenverlustes bleibt jedoch unklar.

Während im Modell APP23 der Neuronenverlust mit Plaqueablagerungen korreliert und sich bei weiblichen Mäusen eine höhere Anzahl an Plaques finden lässt (Sturchler-Pierrat and Staufenbiel, 2000), zeigt das Mausmodell APP^{SL}PS1^{M146L} einen Neuronenverlust an Stellen der Amyloidablagerung aber auch darüber hinaus (Schmitz et al., 2004). Dies führt zu der Vermutung, dass zusätzliche Mechanismen am Neuronenverlust beteiligt sein müssen.

Ein weiteres Modell, welches diese Vermutung unterstützt, ist das Mausmodell APP751^{SL}PS1KI, das von Casas et al. entwickelt wurde, indem sie zunächst ein PS1-knock-in-Mausmodell (PS1KI) mit den Mutationen M233T und L235P im endogenen Präsenilin-Lokus erzeugten, welches daraufhin mit APP751^{SL}-Mäusen gekreuzt wurde (Casas et al., 2004). Diese überexprimieren humanes APP₇₅₁ und tragen neben der Londoner Mutation (V717I) auch die schwedische Doppelmutation (K670N/M671L). Die knock-in-Mutationen im Präsenilin-Gen wurden speziell gewählt, da zwischen ihnen und dem sehr frühen Auftreten

des Krankheitsbildes in der familiären Form der Alzheimer-Erkrankung FAD ein Zusammenhang gesehen wird. So macht man die Mutation L235P für das Auftreten der Krankheit im Alter von ca. 29 Jahren, die Mutation M233T im Alter von ca. 35 Jahren verantwortlich. Im so erhaltenen Mausmodell APP751^{SL}PS1KI zeigt sich einzigartig früh bereits im Alter von zehn Monaten ein massiver Neuronenverlust in der hippocampalen Region CA1/2, der mit intraneuronalem A β und Thioflavin-S-positivem Material, aber nicht mit extrazellulären A β -Ablagerungen korreliert. Dieses Modell spiegelt zudem die Neuropathologie der Alzheimer Erkrankung sehr genau wieder: mit zunehmendem Alter zeigt sich eine steigende Anzahl an unterschiedlich gekürzten A β 42-Isovarianten und Dimeren, der Neuronenverlust wird gefolgt von starker reaktiver Astroglie. Interessanterweise berichteten Casas et al. auch über einen Geschlechtseffekt des Neuronenverlustes: bereits im Alter von sechs Monaten ist makroskopisch ein Neuronenverlust bei allen weiblichen Mäusen erkennbar, jedoch bei keiner der gleichaltrigen männlichen Mäuse. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob weibliche Mäuse früher als männliche Mäuse von den neuropathologischen Veränderungen bei AD betroffen sind, was besonders im Hinblick auf Inzidenz und Prävalenz dieser Erkrankung mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Frauen interessant ist. Bislang wurde dieser potentielle geschlechtsabhängige Neuronenverlust im Alter von sechs Monaten bei APP751^{SL}PS1KI-Mäusen noch nicht genauer untersucht. Ziel dieser Arbeit ist es, mittels stereologischer Methoden den Neuronenverlust in der hippocampalen CA1-Region bei sechs Monate alten Mäusen des APP751^{SL}PS1KI-Modells zu quantifizieren und im Hinblick auf einen Geschlechtsunterschied zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Mäuse

Folgende Mäuse wurden untersucht: sechs Monate alte doppeltransgene Mäuse des Alzheimer-Modells APP751^{SL}PS1KI, davon sechs Männchen und vier Weibchen. Als Kontrollgruppe dienten sechs Monate alte PS1KI-Mäuse, davon drei Männchen und drei Weibchen. Somit wurden insgesamt 16 Mäuse zu stereologischen Untersuchungen verwendet. Der transgene Status der Tiere wurde mittels PCR der Mausschwanz-DNA ermittelt. Alle Tiere wurden gemäß deutscher Richtlinien für Tierschutz behandelt.

2.2. Perfusion

Die Mäuse wurden mittels eines Narkotikums betäubt. Zur Perfusion des Gehirns wurde mit einer Kanüle in die linke Herzkammer gestochen und so zunächst ca. 5 bis 10 ml eiskaltes 0,01M PBS in den großen Körperkreislauf eingebracht. Der rechte Vorhof des Herzens wurde aufgeschnitten, um den Kreislauf zu entlasten. Anschließend wurde über die gleiche Kanüle ca. 5 bis 10 ml eiskaltes 4% Paraformaldehyd eingeleitet bis die Maus fixiert war. Der Kopf wurde mit einem Schnitt entlang der atlanto-axialen Verbindung abgetrennt und der Schädel in anteriorer Richtung geöffnet, nachdem Haut und Muskeln entfernt worden waren. Die Schädeldecke wurde vorsichtig geöffnet und das Gehirn entnommen. Entlang der Mittellinie wurden die beiden Hemisphären voneinander getrennt. Die linken Gehirnhälften wurden anschließend zwei Stunden lang bei 4°C in Paraformaldehyd inkubiert und danach in 30%ige Saccharoselösung überführt, in der sie über Nacht bei 4°C zum Gefrierschutz inkubiert wurden. Am nächsten Tag, nach Absinken der Hemisphären in der Zuckerlösung, wurden diese auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die rechten Hemisphären wurden direkt nach der Entnahme auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.3. Arbeit am Kryostat

Microtom-Kryostat MICROM HM550

Einstellungen:

- Schnittwinkel: 12°
- Schnittdicke: 30µm
- Temperatur: -20°C (variabel, aber nicht zu kalt)



Abbildung 10: Kryostat

Gewebekleber: Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, SAKURA Finetek Europe B.V.

Gefäße: Straight-Side Wide-Mouth Jar PC, Size 15ml, Nalge Nunc International

Jede Hemisphäre wurde am jeweiligen Abend vor dem geplanten Arbeitstag am Kryostat aus -80°C in -20°C überführt.

Am nächsten Tag wurde das Cerebellum etwa zur Hälfte abgeschnitten und mit der so entstandenen Fläche auf dem Schneideblock mittels TissueTek® fixiert. Der Kleber wurde pyramidenförmig in mehreren Lagen um das Gehirn herum aufgetragen, wobei nach jeder Lage gewartet wurde, bis der Kleber trocken war.

Die linken Hemisphären der Gehirne wurden koronar vom Bulbus aus in 10er-Serien geschnitten, wobei eine Schnittdicke von 30 µm gewählt wurde. Alle Gefäße wurden bis zur Färbung bei -80°C gelagert.

2.4. Nissl-Färbung

Alle gesammelten Schnitte aus einem beliebigen Gefäß wurden mittels free-floating-Methode (eiskaltes PBS) auf elektrostatisch geladene Objektträger („Superfrost® Plus“) gezogen und über Nacht bei Raumtemperatur trocknen gelassen (mindestens zwei Stunden).

Objektträger: Superfrost® Plus, 25 x 75x 1,0 mm, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig

Für die Nissl-Färbung, die Zytoplasma und Nucleolus anfärbt, benötigt man unter anderem Natriumacetat (Nr.A121), Cresylviolett (Nr.A103), Triton X-100 (Nr.A197).

Färbeanleitung:

1) Puffer:

1A (Stocklösung): 1M Natriumacetat (136,08g Na-Acetat-Trihydrat in 1 Liter Milli-Q)

1B (Arbeitslösung): 40 ml 1M Natriumacetat (1A) + 9,6 ml Essigsäure konz., auffüllen auf 1 Liter mit Milli-Q

2) Färbelösung (am Vortag herstellen):

0,1 g Cresylviolett in 1 Liter der Lösung 1B lösen

30 min rühren,

über Nacht stehen lassen,

kurz vor Gebrauch filtern

3) Entfettungslösung:

3A (Stocklösung): 2%ige Triton X-100 (980 ml Milli-Q + 20 ml Triton X-100),
ungefähr 1h rühren (lange haltbar)

3B (Arbeitslösung): 2,5 ml 3A + 50 ml Milli-Q + 150 ml 100% Ethanol

Färbeprotokoll:

1. 2 x 10 min in 1B (2 verschiedene Küvetten)
2. 20 min in 3B
3. 2 x 10 min in 1B (2 verschiedene Küvetten)
4. 2 x 8 min in 2 (2 verschiedene Küvetten)
5. 3 x 1 min in 1B (3 verschiedene Küvetten)
6. 3 min in 100% Ethanol
7. 1 x 10 min in Isopropanol (= 2-Propanol)
8. 2 x 5 min in Xylol
9. mit Corbit-Balsam einschließen und über Nacht trocknen lassen

2.5. Stereologische Untersuchung

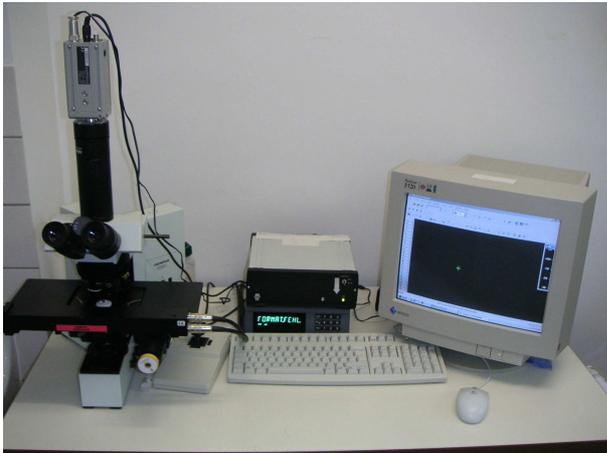


Abbildung 11: Stereologie-Mikroskop

Die sogenannte „Design Based Stereology“ ist eine statistische Methode, die es ermöglicht, morphologische Eigenschaften wie z.B. Volumen, Zellzahlen oder Dichte von dreidimensionalen Strukturen auf der Grundlage von zweidimensionalen Bildern oder dünnen Schnitten zu beurteilen. Der Grund für die Verlässlichkeit der Ergebnisse dieser Untersuchungen liegt darin, dass sie erwartungstreu („unbiased“) sind.

Zur stereologischen Untersuchung wurde das Programm „Stereo Investigator 2000“ (MicroBrightField, Inc.) verwendet, wobei zur Bestimmung der Zellzahlen in der hippocampalen CA1-Region das Programm „Optical Fractionator“ genutzt wurde.

Grundlage jeder stereologischen Untersuchung ist das sogenannte „Systematic Random Sampling“, eine unbefangene und effiziente Prozedur der Stichprobenerhebung. Dabei legt man einen zufälligen Auswahlprozess fest, um aus einer vollständigen Schnittsequenz eine geringe Anzahl gleichmäßig verteilter Schnitte auszuwählen. „Systematisch“ ist hierbei die Verteilung der Stichproben, wie zum Beispiel die Distanz zwischen den einzelnen Stichproben. In vorliegendem Fall beträgt die Distanz zwischen den einzelnen Stichproben 300 μm , da jeder zehnte Schnitt mit einer jeweiligen Schnittdicke von 30 μm ausgewählt wurde. „Zufällig“ dagegen ist die Entscheidung, mit welchem Schnitt die Auswahl begonnen wird.

Zur Zellzahlbestimmung werden dreidimensionale Zählrahmen, die sogenannten „Counting Frames“ verwendet, die aus X-, Y- und Z-Achse aufgebaut sind. Unter Einhaltung bestimmter Vorschriften („Counting Rules“) innerhalb dieser Zählrahmen wird eine fehlerfreie Bestimmung der Zellzahlen garantiert.

Die Zählregeln lauten folgendermaßen:

- 1) Nur Objekte, die sich innerhalb des dreidimensionalen Zählrahmens scharf stellen, während man von oben nach unten durch den Schnitt fokussiert, werden gezählt. Stellen sich Zellen oberhalb des Zählrahmens oder an dessen oberer Grenze scharf, darf man sie nicht mitzählen. Eine Zelle, die sich innerhalb des Zählrahmens scharf darstellt und sich über dessen untere Grenze hinaus erstreckt, darf mitgezählt werden.
- 2) Innerhalb des dreidimensionalen Zählrahmens werden drei aneinandergrenzende Seiten als Ausschluss-Begrenzungen angesehen - üblicherweise sind dies die Flächen XY, YZ und XZ -, während die drei übrigen Seiten keine Grenzschicht darstellen. Dies bedeutet, dass Objekte, die nur teilweise innerhalb des Zählrahmens liegen, genau dann mitgezählt werden dürfen, wenn sie keine der verbotenen Seiten kreuzen, sondern eine oder mehrere der übrigen (siehe Abb. 16).

Die stereologischen Untersuchungen wurden wie kürzlich beschrieben durchgeführt (Van de Berg et al., 2002). Auf allen Schnitten, die den Hippocampus zeigen, wurden die Pyramidenzellschicht der CA1-Region als auch der gesamte Hippocampus markiert (siehe Abb. 12, Abb. 13)

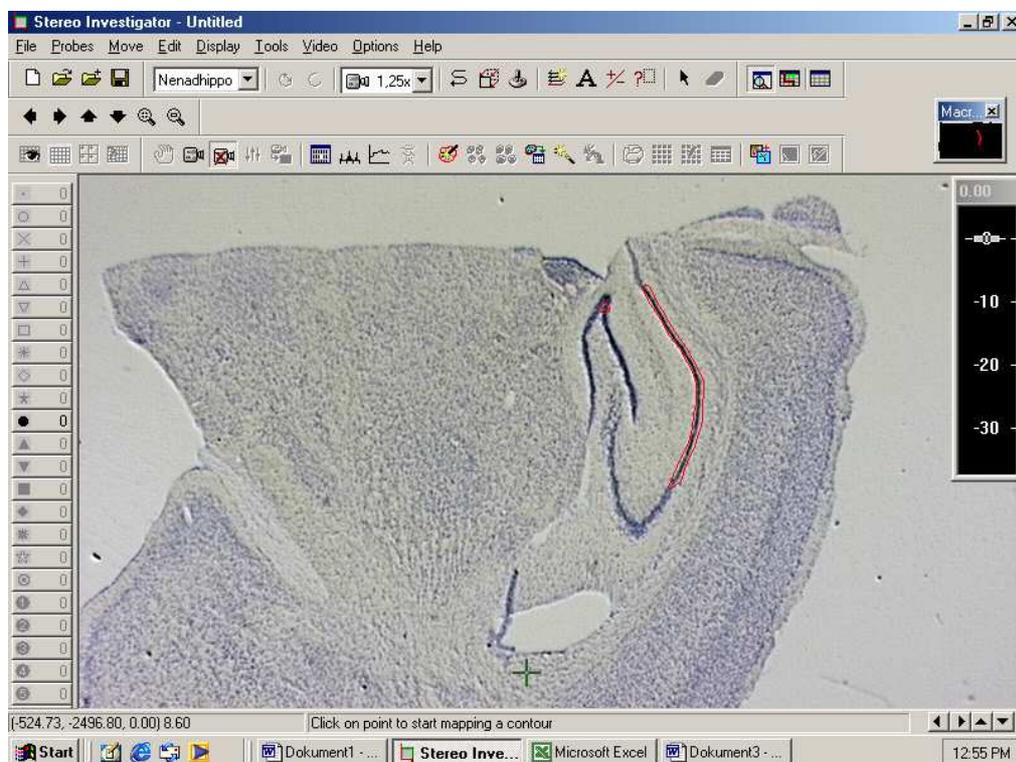


Abbildung 12: Markierung der hippocampalen CA1-Region, zur besseren Übersicht hier in der 1,25x Vergrößerung dargestellt

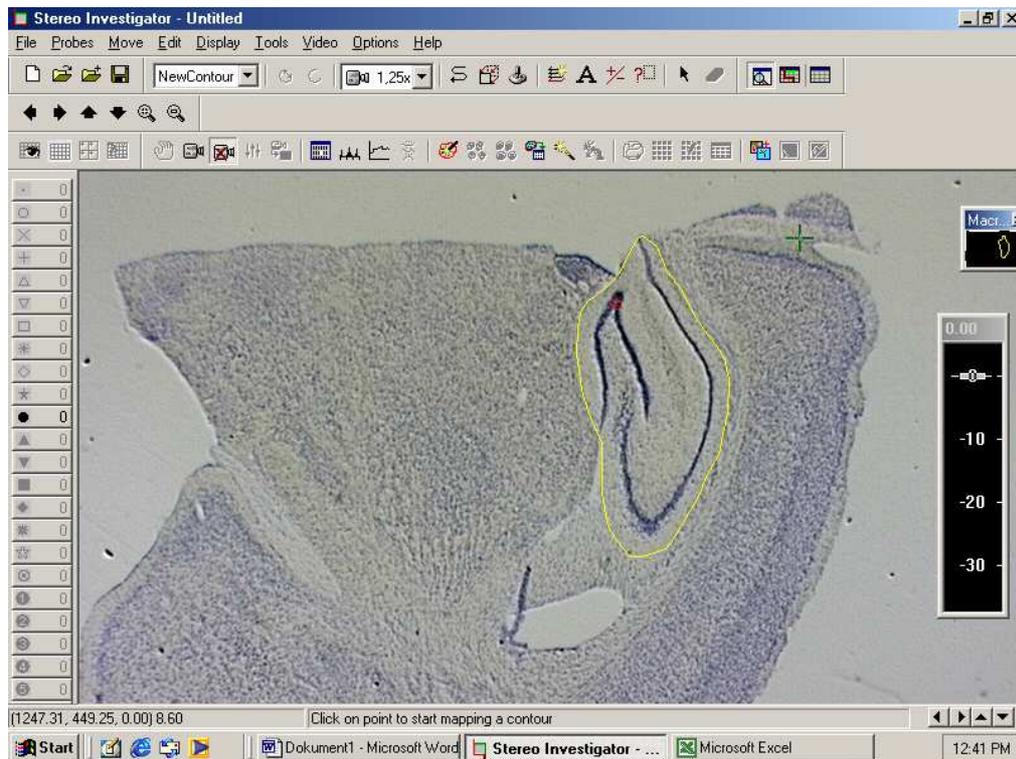


Abbildung 13: Markierung des Hippocampus, zur besseren Übersicht hier in der 1,25x Vergrößerung dargestellt

Zur Markierung der Pyramidenzellschicht in der CA1-Region wurde das Objektiv mit der 10x Vergrößerung, zum Auszählen der Neuronen das Objektiv mit der 100x Vergrößerung gewählt.

Als weitere Parameter wurden gewählt (siehe Abb.14):

- Counting frame: 30,00 x 30,00 μm
- XY Placement of Counting Frames: X = 100,00 μm , Y = 150,00 μm
- Desired sampling sites: 1
- Distance from section top to 3D counting frame: 2,00 μm
- 3D Counting frame height: 4,00 μm
- Section thickness: 30,00 μm
- Focus method: manual focus
- Refocus to top of section at each grid site
- Measure section thickness at each grid site
- Grid Rotation: 0,00 Degrees

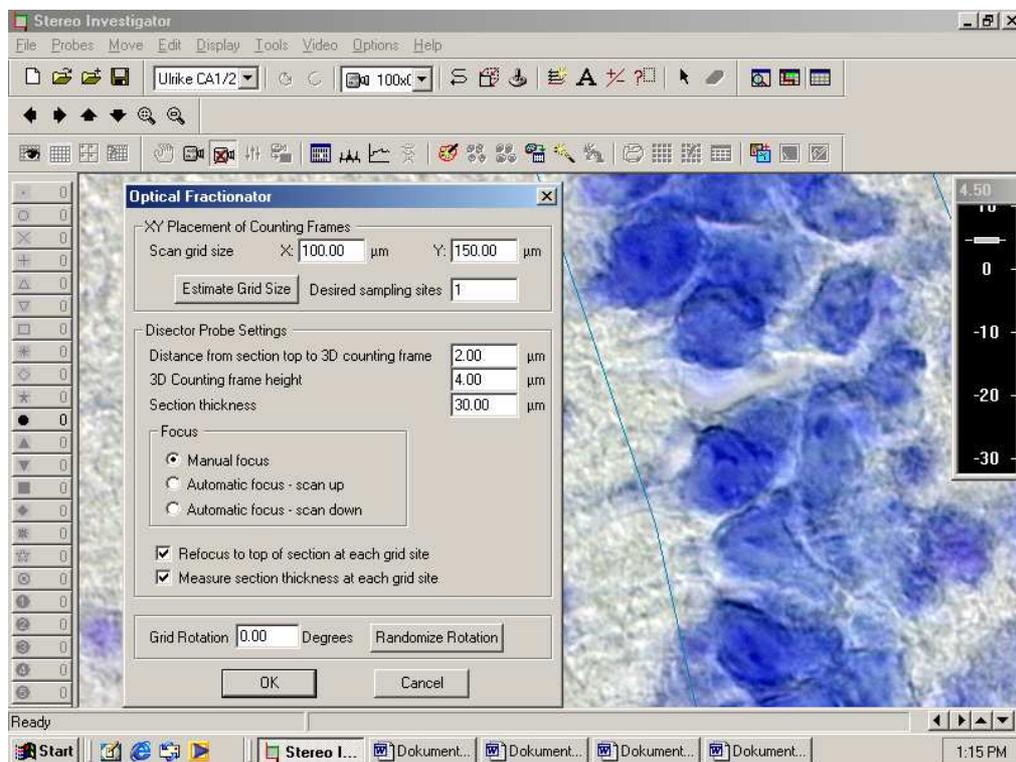


Abbildung 14: Einstellungen des Optical Fractionator-Programms

Zur Erfassung der Neuronenzahlen legt das Programm ein Raster über den markierten Bereich des Hirnschnittes und ermittelt somit automatisch die Anzahl und Lage der dreidimensionalen Zählrahmen, der sogenannten „Counting Frames“ (siehe Abb.15).

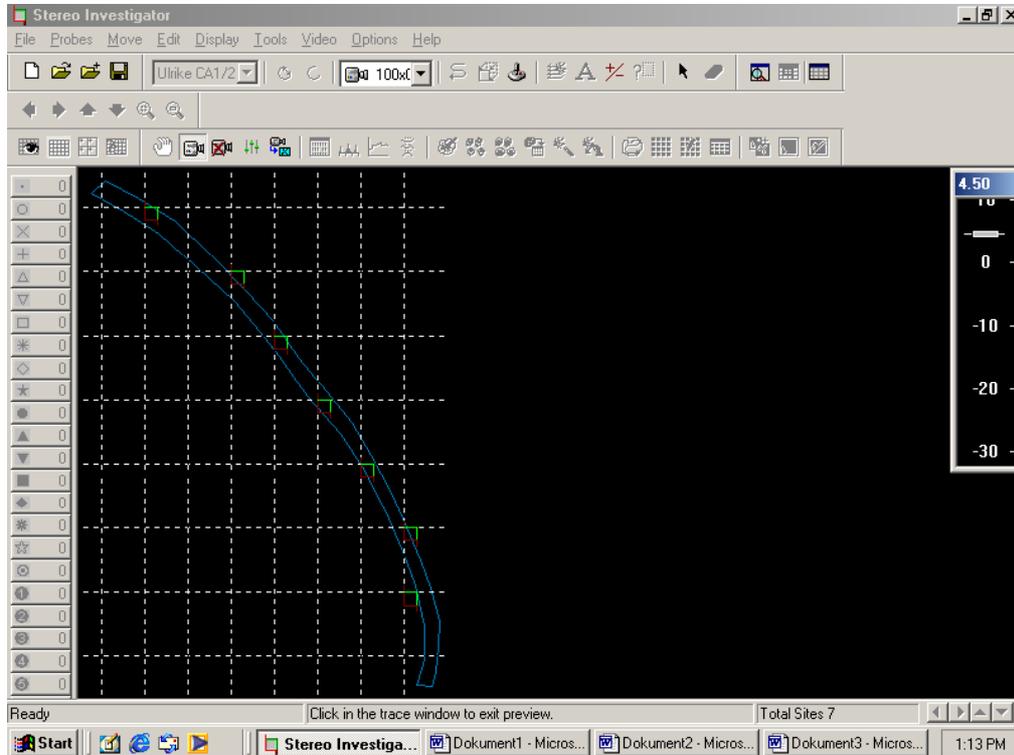


Abbildung 15: Vorschau auf die Anzahl und Verteilung der „Counting Frames“ (hier sieben Stück)

Während des Zählvorgangs wechselt das Programm automatisch von einem Zählrahmen zum Nächsten. Hierbei gelten die bereits erwähnten Zählregeln („Counting Rules“): Neuronen, die die grünen Linien des Counting Frames berühren, dürfen mitgezählt werden, wohingegen keine Neuronen gezählt werden dürfen, die die roten Linien berühren (siehe Abb.16).

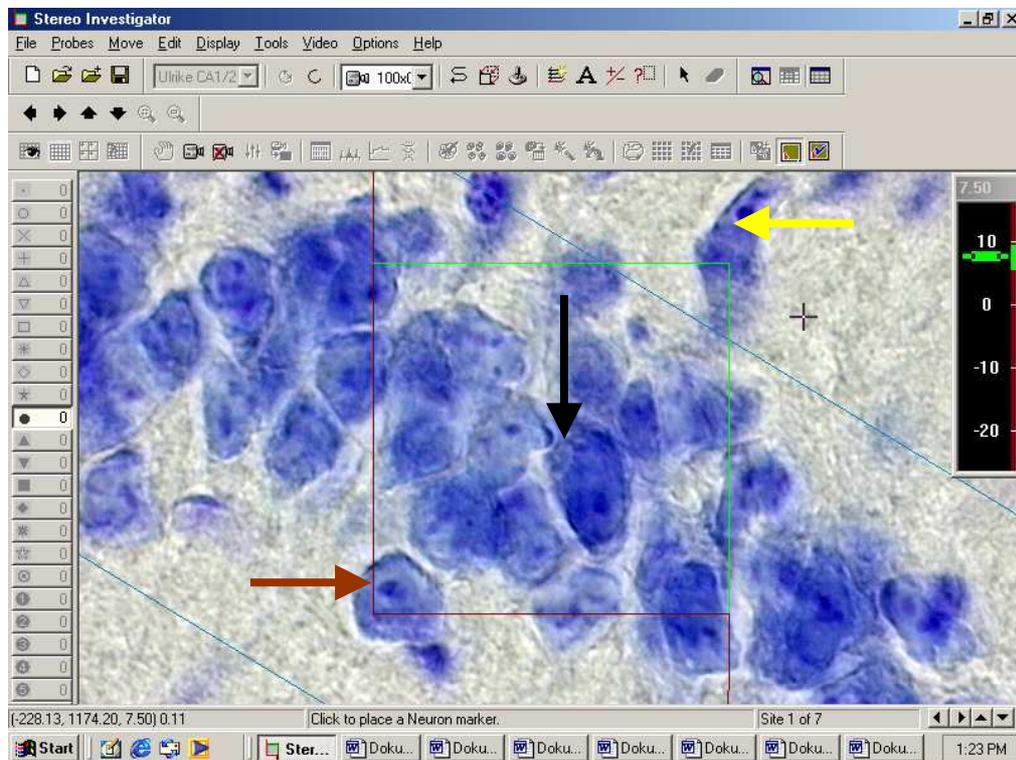


Abbildung 16: Ein Zählrahmen („Counting Frame“) mit roten und grünen Begrenzungslinien.

Gemäß der „Counting Rules“ würde hier gelten:

- Die Zelle, auf die der rote Pfeil zeigt, darf nicht mitgezählt werden, denn sie kreuzt die rote Begrenzung.
- Die Zelle, auf die der schwarze Pfeil zeigt, wird mitgezählt, denn sie liegt innerhalb des Zählrahmens.
- Die Zelle, auf die der gelbe Pfeil zeigt, wird ebenfalls mitgezählt, denn sie kreuzt die grüne Begrenzung.

2.6 Berechnung der hippocampalen Neuronenzahl

Die Gesamtneuronenzahl der hippocampalen CA1-Region einer Hemisphäre ermittelt man in drei Rechenschritten:

- Zunächst errechnet man anhand folgender Formel (Schmitz and Hof, 2005) das Produkt P:

$$P = \text{asf} \times \text{ssf} \times \text{tsf}$$

$\text{asf} = \text{„sampling grid area (XY)“} / \text{„counting frame area (XY)“}$

$$= 15000 \mu\text{m}^2 / 900 \mu\text{m}^2$$

$\text{ssf} = 10$ (jeder 10.Schnitt)

$\text{tsf} = \text{„number weighted mean section thickness“} / \text{„dissector height (Z)“}$

$$= \text{jeweilige aktuelle Schnittdicke } \mu\text{m} / 4 \mu\text{m}$$

Diese Daten kann man der Ergebnistabelle des Programms „Optical Fractionator“ entnehmen, nachdem man Neurone eines Schnittes ausgezählt hat.

- Die aus der obigen Formel errechnete Zahl P wird mit der anhand des Programms „Optical Fractionator“ ermittelten Neuronenzahl („total markers counted“) multipliziert und man erhält die Neuronenzahl des untersuchten Schnittes N_{SchnittX} .

$$N_{\text{SchnittX}} = P \times \text{„total markers counted“}$$

- Die Gesamtneuronenzahl N_{gesamt} der hippocampalen CA1-Region einer Hemisphäre erhält man nun, indem man die Neuronenzahlen aller Schnitte addiert.

$$N_{\text{gesamt}} = N_{\text{Schnitt1}} + N_{\text{Schnitt2}} + N_{\text{Schnitt3}} + \dots$$

2.7 Berechnung des Volumens

Zur Berechnung des Volumens des gesamten Hippocampus einer Hemisphäre verwendet man die Formel “Cavalieri`s Estimator of Morphometric Volume V_C ” (Rosen and Harry, 1990):

$$V_C = d \left[\sum_{i=1}^n (y_i) \right] - (t)y_{\max}$$

d = Abstand zwischen den analysierten Schnitten = 300 μm

y_i = Fläche von Schnitt i [μm^2]

t = jeweilige Schnittdicke [μm]

y_{\max} = größte gemessene Fläche [μm^2]

Das Produkt $(t)y_{\max}$ wird zur Korrektur einer möglichen “Überschätzung” von der

Basisformel $d \left[\sum_{i=1}^n (y_i) \right]$ subtrahiert.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der statistischen Programme „SPSS 13.0 für Windows“ und „GraphPad Prism“ (Version 4.02). Mittels der explorativen Datenanalyse ermittelte Ausreißer wurden ausgeschlossen. Ergab sich bei der anschließend durchgeführten univariaten Varianzanalyse (ANOVA) eine statistische Signifikanz, wurden anhand des „Student`s t-Test“ Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ermittelt. Es wurden p-Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

Im Zuge der Entwicklung adäquater Mausmodelle der Alzheimer Erkrankung entstand das doppeltransgene Mausmodell APP751^{SL}PS1KI. Dafür wurde zunächst ein PS1-knock-in-Mausmodell (PS1KI) erzeugt und anschließend mit APP751^{SL}-Mäusen gekreuzt. Casas et al. untersuchten dieses Modell auf Alzheimer-typische pathologische Veränderungen und berichteten von einem Neuronenverlust in der hippocampalen CA1-Region bereits im Alter von 10 Monaten, was bislang als einzigartig früh angesehen wird. Weiterhin berichteten Casas et al. von einem interessanten Geschlechtseffekt des Mausmodells APP751^{SL}PS1KI: bereits im Alter von sechs Monaten ist bei weiblichen Mäusen makroskopisch ein Neuronenverlust feststellbar, während dieser bei keiner der gleichaltrigen männlichen Mäuse zu finden ist (Casas et al., 2004). Aus dieser Beobachtung ergibt sich die Frage, ob die Alzheimer-typischen neuropathologischen Veränderungen bei weiblichen Mäusen bereits zu früheren Zeitpunkten eintreten als bei männlichen Mäusen. In der vorliegenden Arbeit wird dieser potentielle geschlechtsabhängige Neuronenverlust bei Mäusen des Alzheimer-Modells APP751^{SL}PS1KI erstmals genauer quantifiziert, da diese Beobachtung auch in Bezug auf die höhere Inzidenz und Prävalenz der Alzheimer-Erkrankung bei Frauen im Vergleich zu Männern sehr interessant ist.

3.1 Neuronenzahl

3.1.1 Modell APP751^{SL}PS1KI

Mit Hilfe stereologischer Verfahren wurden die Neuronenzahlen der hippocampalen CA1-Region von sechs Männchen und sechs Weibchen des Mausmodells APP751^{SL}PS1KI im Alter von sechs Monaten ermittelt. Dabei ergaben sich folgende Werte:

APP/PS1KI	Geschlecht	
	weiblich	männlich
Neuronenzahl	152871	262246
	172050	270421
	224579	270779
	231242	292458
	244375	295129
	246604	355033
Mittelwert	211953	291011

Tabelle 3: Anzahl der Neuronen in der hippocampalen CA1-Region des Modells APP751^{SL}PS1KI

Bezüglich der Neuronenzahl der hippocampalen CA1-Region ergab sich ein Geschlechtseffekt mit signifikant geringeren Neuronenzahlen bei den weiblichen Mäusen im Vergleich zu den männlichen Mäusen. Die statistische Signifikanz der univariaten Varianzanalyse (ANOVA) betrug hierbei $p = 0,032$. Im daraufhin durchgeführten „Student´s t-Test“ ergab sich für die hippocampale CA1-Neuronenzahl der weiblichen Mäuse ein Mittelwert von 211.953 bei einer Standardabweichung von $\sigma = \pm 39.664$, für die männlichen Mäuse ein Mittelwert von 291.011 bei einer Standardabweichung von $\sigma = \pm 33.996$. Der „Student`s t-Test“ war signifikant mit $p = 0,004$.

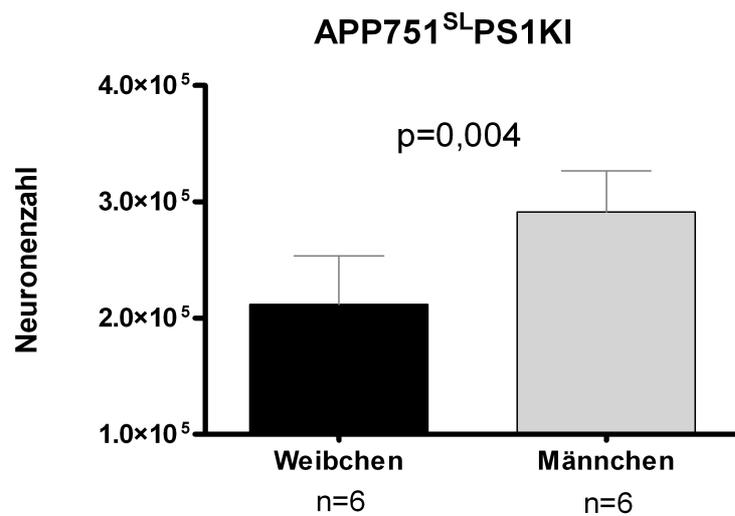


Abbildung 16: Anzahl der Neuronen bei Weibchen und Männchen des Modells APP751^{SL}PS1KI

3.1.2 Modell PS1KI

Als Kontrollgruppe dienten Mäuse des Alzheimer-Mausmodells PS1KI. Dabei wurden die Gehirne von drei Männchen und drei Weibchen im Alter von sechs Monaten auf die gleiche Weise stereologisch untersucht wie die Mäuse des Modells APP751^{SL}PS1KI. Es ergaben sich folgende Werte:

PS1KI	Geschlecht	
	weiblich	männlich
Neuronenzahl	40733	231142
	266980	244475
	310304	391163
Mittelwert	336006	288927

Tabelle 4: Anzahl der Neuronen in der hippocampalen CA1-Region des Modells PS1KI

Nachdem mittels der explorativen Datenanalyse keine Ausreißer gefunden wurden, wurde eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Für die hippocampale Neuronenzahl der Weibchen des Modells PS1KI ergab sich ein Mittelwert von 336.006 bei einer

Standardabweichung von $\sigma = \pm 84.849$. Bei den Männchen ergab sich ein Wert von 288.927 bei einer Standardabweichung von $\sigma = \pm 88.790$.

Im Gegensatz zu dem Modell APP751^{SL}PS1KI zeigte sich bei der stereologischen Untersuchung der Neuronenzahlen in der hippocampalen CA1-Region des Modells PS1KI somit kein Geschlechtsunterschied ($p = 0,543$).

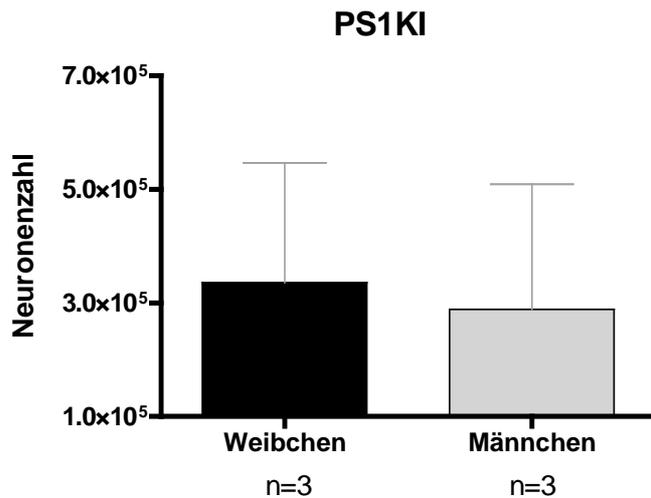


Abbildung 17: Anzahl der Neuronen bei Weibchen und Männchen des Modells PS1KI

3.1.3 Vergleich der Modelle APP751^{SL}PS1KI und PS1KI

Anschließend wurden beide Modelle geschlechtsspezifisch miteinander verglichen, um einen möglicherweise statistisch signifikanten Unterschied der Neuronenzahlen zu detektieren.

Dieser Vergleich beider Modelle ergab bei den Männchen keinen statistisch signifikanten Unterschied der Neuronenzahlen ($p = 0,959$).

Der Vergleich der Weibchen zeigte jedoch einen statistisch signifikanten Unterschied mit einer im Vergleich zum Modell PS1KI signifikant verminderten Neuronenzahl im Modell APP751^{SL}PS1KI ($p = 0,017$).

3.2 Volumen

3.2.1 Modell APP751^{SL}PS1KI

Nachdem sich bei der Untersuchung des Modells APP751^{SL}PS1KI bezüglich der hippocampalen Neuronenzahl ein signifikanter Geschlechtsunterschied bereits im Alter von sechs Monaten gezeigt hatte, stellte sich die Frage, ob sich der Neuronenverlust in einer Volumenabnahme des Hippocampus mit ebenfalls signifikantem Geschlechtsunterschied widerspiegeln würde. Die während der stereologischen Untersuchung ermittelten Daten wurden zur Volumenberechnung verwendet. Sowohl das Volumen der hippocampalen CA1-Region als auch des gesamten Hippocampus wurden berechnet und auf einen signifikanten Geschlechtsunterschied untersucht.

Die Untersuchung der hippocampalen CA1-Region des Alzheimer-Mausmodells APP751^{SL}PS1KI ergab folgende Werte:

APP/PS1KI	Geschlecht	
	weiblich	männlich
Volumen CA1	0,11	0,12
	0,13	0,12
	0,13	0,12
	0,16	0,14
	0,20	0,15
	0,21	0,18
Mittelwert	0,16	0,14

Tabelle 5: Volumen-Werte der hippocampalen CA1-Region des Modells APP751^{SL}PS1KI [mm³]

Für das Volumen der hippocampalen CA1-Region der Weibchen des Modells APP751^{SL}PS1KI ergab sich ein Mittelwert von 0,16 mm³ bei einer Standardabweichung von $\sigma = \pm 0,04$ mm³, bei den Männchen ergab sich ein Mittelwert von 0,14 mm³ bei einer Standardabweichung von $\sigma = \pm 0,02$ mm³. Es fand sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,4848$).

Die Untersuchung des gesamten Hippocampus des Alzheimer-Mausmodells APP751^{SL}PS1KI ergab folgende Werte:

APP/PS1KI	Geschlecht	
	weiblich	männlich
Hippocampus- Volumen	6,27	5,73
	6,59	6,15
	7,61	6,99
	7,72	7,05
	8,60	8,08
	11,52	8,09
	Mittelwert	8,05

Tabelle 6 : Volumen-Werte des gesamten Hippocampus des Modells APP751^{SL}PS1KI [mm³]

Für das Volumen des gesamten Hippocampus der Weibchen des Modells APP751^{SL}PS1KI ergab sich ein Mittelwert von 8,05 mm³ bei einer Standardabweichung von $\sigma = \pm 1,9$ mm³, bei den Männchen ergab sich ein Mittelwert von 7,02 mm³ bei einer Standardabweichung von $\sigma = \pm 0,97$ mm³. Es fand sich hier ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p = 0,3939$).

Insgesamt konnte man bei Mäusen des Alzheimer-Modells APP751^{SL}PS1KI im Alter von sechs Monaten weder in der hippocampalen CA1-Region noch im gesamten Hippocampus einen signifikanten Geschlechtsunterschied des Volumens feststellen. Somit lässt sich der signifikant stärkere Neuronenverlust der Weibchen in der hippocampalen CA1-Region in diesem frühen Alter noch nicht in einer signifikant stärkeren Volumenabnahme wiedererkennen.

3.2.2 Modell PS1KI

Nachdem sich bei dem Alzheimer-Modell APP751^{SL}PS1KI weder in der hippocampalen CA1-Region noch im gesamten Hippocampus ein signifikanter Geschlechtsunterschied des Volumens gezeigt hatte, wurden nun auch die als Kontrollgruppe dienenden Mäuse des Alzheimer-Modells PS1KI hinsichtlich eines signifikanten Geschlechtsunterschiedes des

Volumens untersucht. Zur Volumenberechnung wurden wiederum die während der stereologischen Untersuchung ermittelten Daten verwendet. Sowohl das Volumen der hippocampalen CA1-Region als auch des gesamten Hippocampus wurden berechnet.

Folgende Werte ergaben sich bei der Untersuchung der hippocampalen CA1-Region des Modells PS1KI:

PS1KI	Geschlecht	
	weiblich	männlich
Volumen CA1	0,30	0,32
	0,50	0,33
	0,53	0,66
Mittelwert	0,44	0,44

Tabelle 7: Volumen-Werte der hippocampalen CA1-Region des Modells PS1KI [mm³]

Für das Volumen der hippocampalen CA1-Region der Weibchen des Modells PS1KI ergab sich ein Mittelwert von 0,44 mm³ bei einer Standardabweichung von $\sigma = \pm 0,12$ mm³, bei den Männchen ergab sich ein Mittelwert von 0,44 mm³ bei einer Standardabweichung von $\sigma = \pm 0,19$ mm³. Es fand sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,968$).

Bei der Untersuchung des gesamten Hippocampus des Modells PS1KI ergaben sich folgende Werte:

PS1KI	Geschlecht	
	weiblich	männlich
Hippocampus-Volumen	6,03	4,42
	6,32	5,73
	6,97	8,58
Mittelwert	6,44	6,24

Tabelle 8: Volumen-Werte des gesamten Hippocampus des Modells PS1KI [mm³]

Für das Volumen des gesamten Hippocampus der Weibchen des Modells PS1KI ergab sich ein Mittelwert von 6,44 mm³, bei einer Standardabweichung von $\sigma = \pm 0,48$ mm³, bei den Männchen ergab sich ein Mittelwert von 6,24 mm³ bei einer Standardabweichung von $\sigma = \pm 2,13$ mm³. Es fand sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,883$).

Somit fand sich auch bei den Mäusen der Kontrollgruppe PS1KI weder in der hippocampalen CA1-Region noch im gesamten Hippocampus ein signifikanter Geschlechtsunterschied des Volumens.

3.2.3 Vergleich der Modelle APP751^{SL}PS1KI und PS1KI

Nachdem weder im Alzheimer-Mausmodell APP751^{SL}PS1KI noch im Modell PS1KI ein Geschlechtsunterschied bezüglich der Volumina der hippocampalen CA1-Region und des Hippocampus festzustellen war, stellte sich die Frage, ob sich ein Volumen-Unterschied zwischen den beiden Modellen zeigen würde. Dazu wurden die Mittelwerte der berechneten Volumina sowohl der hippocampalen CA1-Region als auch des gesamten Hippocampus beider Modelle miteinander verglichen. Da kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern bezüglich der Volumina zu detektieren war, wurden die Werte der Weibchen und Männchen zusammengefasst:

	Alzheimer-Mausmodell	
	APP751 ^{SL} PS1KI	PS1KI
CA1	0,15	0,44
Hippocampus _{ges}	7,53	6,34

Tabelle 9: Volumen-Mittelwerte beider Mausmodelle sowohl der CA1-Region als auch des gesamten Hippocampus [mm³]

Für das Volumen der hippocampalen CA1-Region aller untersuchten Tiere des Modells APP751^{SL}PS1KI ergab sich ein Mittelwert von 0,15 mm³, bei einer Standardabweichung von $\sigma = \pm 0,03$ mm³, während sich für das Volumen der CA1-Region aller untersuchten Tiere des Modells PS1KI ein Mittelwert von 0,43 mm³, bei einer Standardabweichung von $\sigma = \pm 0,14$ mm³ ergab. Der Vergleich der Volumenwerte der hippocampalen CA1-Region zeigte ein signifikant geringeres Volumen im Mausmodell APP751^{SL}PS1KI mit $p = 0,004$.

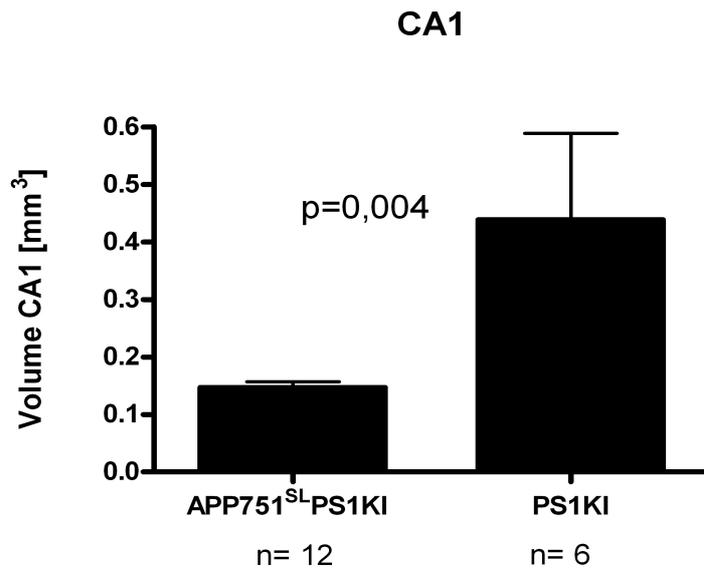


Abbildung 19: Volumen-Mittelwerte der CA1-Region beider Mausmodelle

Für das Volumen des gesamten Hippocampus aller untersuchten Tiere des Modells APP751^{SL}PS1KI ergab sich ein Mittelwert von 7,53 mm³, bei einer Standardabweichung von $\sigma = \pm 1,53$ mm³, während sich für das Volumen des gesamten Hippocampus aller untersuchten Tiere des Modells PS1KI ein Mittelwert von 6,34 mm³, bei einer Standardabweichung von $\sigma = \pm 1,38$ mm³ ergab. Im Bereich des gesamten Hippocampus zeigte sich somit zwischen den beiden Alzheimer-Mausmodellen APP751^{SL}PS1KI und PS1KI kein signifikanter Unterschied der Volumenwerte.

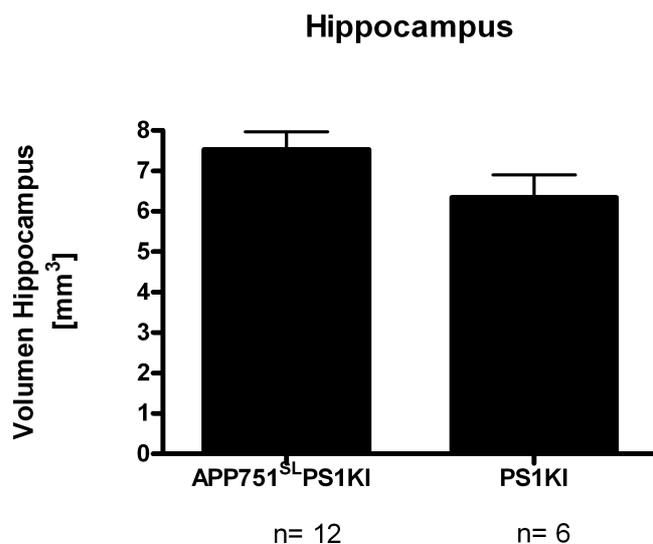


Abbildung 20: Volumen-Mittelwerte des gesamten Hippocampus beider Mausmodelle

4. Diskussion

Die Neuronenzahlen der hippocampalen CA1-Region wurden von mir mittels der „Design Based Stereology“ ermittelt. Dabei handelt es sich um eine „State of the Art“- Methode, deren großer Vorteil in der Verlässlichkeit der Ergebnisse („unbiased“) liegt.

Die stereologische Untersuchung der hippocampalen CA1-Region von Mäusen des Alzheimer-Modells APP751^{SL}PS1KI lieferte bereits im Alter von sechs Monaten einen signifikanten Geschlechtsunterschied in der Neuronenzahl ($p = 0,004$). Es ergab sich eine mittlere hippocampale CA1-Neuronenzahl von 291.011 bei den Männchen und von 211.953 bei den Weibchen. Betrachtet man Neuronenzahlen anderer Studien zum hippocampalen Neuronenverlust, welche an Mäusen im Alter von zwei bis zehn Monaten durchgeführt wurden, so lässt sich ein linearer Verlauf des Neuronenverlustes erkennen. Im Alter von zwei bis sechs Monaten ergibt sich ein prozentualer Neuronenverlust von 33,7%, im Alter von sechs bis zehn Monaten ein Neuronenverlust von 26,9%. Anstelle eines vermuteten exponentiellen Verlaufsmusters weist die Kurve einen linearen Zusammenhang zwischen Neuronenanzahl und Alter der Mäuse auf (siehe Abb. 22).

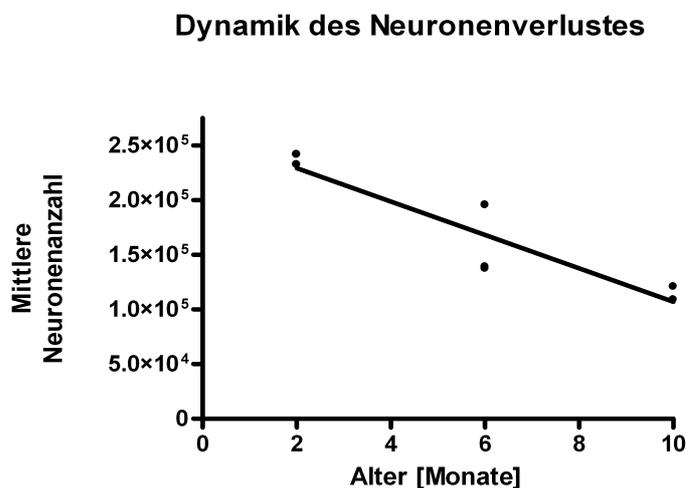


Abbildung 22: Dynamik des Neuronenverlustes: linearer Verlauf ($r^2 = 0,9697$)

Vergleicht man die von mir stereologisch ermittelten Neuronenzahlen der Männchen und Weibchen des Mausmodells APP751^{SL}PS1KI, erkennt man, dass weibliche Mäuse in der hippocampalen CA1-Region bereits im Alter von sechs Monaten ca. 27% weniger Neuronen besitzen als männliche Mäuse desselben Alters. Somit existiert neben dem altersbedingten

linear verlaufenden Neuronenverlust noch ein Geschlechtseffekt, der zu einer signifikant reduzierten Neuronenzahl der weiblichen Tiere führt.

Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, wie sich dieser signifikante Geschlechtseffekt der Neuronenanzahl begründen lässt.

Hardy und Allsop formulierten im Jahre 1991 ihre Vermutung zur Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung als sogenannte „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ (Hardy and Allsop, 1991). Diese besagt, dass die extrazelluläre Akkumulation von β -Amyloid-Peptiden, vor allem von A β 42, in sogenannten Amyloidplaques aufgrund einer Fehlregulation der APP-Prozessierung zu typischen neuropathologischen Veränderungen der AD führt. Diese zeigen sich als reaktive Astrozytose und Mikrogliose, Fibrillenformation und Tau-Phosphorylierung und münden schließlich über Neuronenverlust und Synapsenfunktionsverlust in Gehirnatrophie mit den klinischen Zeichen der Demenz.

Auf dieser Grundlage sollte man den Einfluss der Amyloidplaques auf den geschlechtsspezifischen Neuronenverlust genauer betrachten. Untersuchungen einiger AD-Mausmodelle lieferten tatsächlich einen Geschlechtseffekt bezüglich der zerebralen β -Amyloid-Konzentration und der A β -Plaqueablagerung. Über diesen Geschlechtseffekt wurde bislang in den Alzheimer-Mausmodellen Tg2576 (Callahan et al., 2001; Lee et al., 2002), APP23 (Sturchler-Pierrat and Staufenbiel, 2000; Bayer et al., 2003) APP/PS1-doppeltransgen (Wang et al., 2003) und APP^{SW}Tau^{VLW}-doppeltransgen (Lewis et al., 2001; Ribe et al., 2005) berichtet, welcher sich durch eine verstärkte extrazelluläre β -Amyloid-Akkumulation bei Weibchen im Vergleich zu Männchen äußert.

Das AD-Mausmodell Tg2576 wurde 1996 von Hsiao et al. (Hsiao et al., 1996) entwickelt und ist bis heute das meist erforschte transgene AD-Mausmodell. Mäuse dieses Modells exprimieren übermäßig die Isoform APP695 des humanen Amyloid-Vorläufer-Proteins mit der schwedischen Doppelmutation K670N/M671L und zeigen im Alter von sechs bis zehn Monaten zunehmende Konzentrationen an unlöslichem A β 40 und A β 42 (Kawarabayashi et al., 2001) und im Alter von neun bis zwölf Monaten ansteigende Mengen an Thioflavin-S-positiven Amyloidplaques (Higgins and Jacobsen, 2003). Ein Geschlechtseffekt lässt sich ab dem Alter von zwölf Monaten zunehmend deutlich detektieren. Callahan et al. quantifizierten die Amyloidablagerungen in 15 und 19 Monate alten Tieren und entdeckten signifikant höhere Werte bei den Weibchen als bei den Männchen. Im Alter von 15 Monaten lag die Menge der zerebralen Amyloidplaques bei den Weibchen sogar um das Dreifache höher als bei den Männchen. Mittels ELISA quantifizierten Callahan et al. auch die Menge an löslichem und unlöslichem A β 40 und A β 42. Hierbei entdeckten sie ebenfalls in 15 Monate

alten Tieren einen Geschlechtseffekt, der bei löslichem und unlöslichem A β 40, dem vorherrschenden A β -Typ in diesem Mausmodell, eine statistische Signifikanz erreichte (Callahan et al., 2001). Die Autoren vermuten einen Einfluss des Östrogens, da sich die 15 Monate alten Weibchen in der Menopause befinden und sich eventuell beim Absinken des Östrogenspiegels signifikant höhere Mengen an β -Amyloid im Gehirn ablagern im Vergleich zu den männlichen Tieren dieses Modells.

Mäuse des von Novartis Pharma (Basel) entwickelten AD-Mausmodells APP23, das 1997 erstmals von Sturchler-Pierrat et al. beschrieben wurde, exprimieren humanes APP751 mit der schwedischen Doppelmutation K670N/M671L unter der Kontrolle eines Thy1-Promoters. Sie weisen ab einem Alter von ungefähr sechs Monaten eine Amyloidplaque-Pathologie auf, die sich mit zunehmendem Alter verstärkt (Sturchler-Pierrat and Staufenbiel, 2000). Interessanterweise korreliert mit der Plaqueablagerung bei 14-18 Monate alten Mäusen dieses Modells ein signifikanter Neuronenverlust in der CA1-Region des Hippocampus (Calhoun et al., 1998). Ein Geschlechtseffekt wird auch bei diesem Modell deutlich, da Weibchen eine ausgeprägtere Amyloidplaque-Ablagerung aufweisen als Männchen (Sturchler-Pierrat and Staufenbiel, 2000). Man könnte spekulieren, dass sich dieser Geschlechtseffekt aufgrund der Korrelation zwischen Plaqueablagerung und Neuronenverlust auch in einem stärkeren Neuronenverlust bei den weiblichen Tieren widerspiegelt, was aber bislang nicht untersucht wurde.

Ein weiteres AD-Mausmodell, welches einen Geschlechtseffekt aufweist, ist das doppeltransgene Modell APP/PS1. Mäuse dieses Modells tragen sowohl die schwedische Doppelmutation K670N/M671L des humanen Amyloid-Vorläufer-Proteins als auch die Präsenilin1-Mutation A246E. Sie weisen β -Amyloid-Ablagerungen schon im Alter von neun Monaten auf und zeigen einen altersabhängigen Anstieg sowohl in der Anzahl der Amyloidplaques als auch in den Gesamtkonzentrationen von A β 40 und A β 42. Wang et al. untersuchten dieses Modell im Bereich des Hippocampus auf einen Geschlechtsunterschied. Sie entdeckten, dass weibliche Mäuse im Alter von 12 und 17 Monaten eine höhere Anzahl an Amyloidplaques und eine größere mit Plaques bedeckte Fläche aufweisen als Männchen im gleichen Alter. Mit zunehmendem Alter zeigt sich ein signifikanter Konzentrationsanstieg an Gesamt-A β 40 und A β 42 bei den weiblichen APP/PS1-Mäusen im Hippocampus. Dabei sind zu jedem Zeitpunkt die Konzentrationen sowohl an A β 40 als auch an A β 42 bei den Weibchen signifikant höher als bei den gleichaltrigen Männchen. Wang et al. schlussfolgerten aus diesen Daten, dass die extrazelluläre Amyloid-Akkumulation bei weiblichen APP/PS1-Mäusen zu

früheren Zeitpunkten stattfindet und sie eine größere Menge an β -Amyloid-Ablagerung im Hippocampus aufweisen als gleichaltrige Männchen desselben Modells (Wang et al., 2003).

Das vierte der bislang bekannten AD-Mausmodelle mit einem Geschlechtseffekt ist das doppeltransgene APP^{SW}Tau^{VLW}-Modell. Ribé et al. untersuchten Mäuse dieses AD-Mausmodells im Alter von neun und 16 Monaten, um die Bedeutung der β -Amyloid-Ablagerung sowohl für die Tau-Pathologie als auch für den Neuronenverlust zu detektieren. Während die Mäuse im Alter von neun Monaten nur eine geringe β -Amyloid-Ablagerung aufweisen, zeigt sich in diesem Alter bereits ein signifikanter Neuronenverlust im entorhinalen Kortex. Interessanterweise findet sich im Alter von 16 Monaten ein signifikanter Geschlechtseffekt: Weibchen des APP^{SW}Tau^{VLW}-Modells zeigen in allen untersuchten Regionen mit Ausnahme der hippocampalen CA1-Region signifikant stärkere Amyloidablagerungen als Männchen desselben Alters ($p < 0,01$) (Ribe et al., 2005).

Wie bereits erwähnt, besagt die „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ von Hardy und Allsop (Hardy and Allsop, 1991), dass die extrazelluläre Akkumulation von β -Amyloid-Peptiden in Form von Amyloidplaques letztendlich zu Neuronenverlust und anderen AD-typischen pathologischen Veränderungen mit dem klinischen Bild der Demenz führt.

Dennoch ist es bis zum heutigen Zeitpunkt nicht gelungen, einen direkten kausalen Zusammenhang zwischen Amyloidplaque-Ablagerung und Neuronenuntergang herzustellen (Urbanc et al., 2002). In verschiedenen transgenen AD-Mausmodellen fanden Irizarry et al. β -Amyloid-Ablagerungen, die denjenigen im AD-Patienten entsprachen, jedoch keinen damit korrelierenden Neuronenverlust (Irizarry et al., 1997a; Irizarry et al., 1997b). In einem anderen AD-Mausmodell zeigte sich sogar eine beschleunigte Neurodegeneration ohne Amyloidablagerungen (Chui et al., 1999).

Schmitz et al. griffen diese Beobachtung über die fehlende Korrelation zwischen Amyloidablagerung und Neuronenverlust auf und untersuchten das doppeltransgene AD-Mausmodell APP^{SL}PS1^{M146L}, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der β -Amyloid-Aggregation und deren Neurotoxizität zu entdecken. Mäuse dieses Modells exprimieren sowohl humanes Amyloid-Vorläufer-Protein der Isoform APP751 mit der schwedischen und der London-Mutation als auch mutiertes humanes Präsenilin PS1. Die stereologische Untersuchung dieses Modells zeigt einen signifikanten hippocampalen Neuronenverlust an Stellen der Amyloidablagerung und erstaunlicherweise auch darüber hinaus. So ist der „Plaque-Load“ durchschnittlich etwa 10% geringer als der hippocampale Neuronenverlust

(Schmitz et al., 2004), was somit die lokale neurotoxische A β -Aktivität als einzigen neuropathologischen Mechanismus der AD nicht bestätigt.

Im bereits erwähnten doppeltransgenen Mausmodell APP^{SW}Tau^{VLW} gelang es Ribé et al. ebenfalls zu keinem Zeitpunkt, eine Korrelation zwischen der β -Amyloid-Ablagerung und dem Neuronenverlust zu beweisen. (Ribe et al., 2005).

Somit können auch diese AD-Mausmodelle die „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ von Hardy und Allsop nicht beweisen.

Bei der Untersuchung der Gehirne von Alzheimer-Patienten ergab sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen extrazellulärer Amyloidablagerung und Neuronenverlust (Gomez-Isla et al., 1997). McLean et al. erkannten zudem, dass die Schwere der Alzheimer-Erkrankung mit der mittleren Menge des löslichen A β korreliert, aber nicht mit der Menge des unlöslichen A β als Maß des gesamten A β -Gehalts (McLean et al., 1999). Neuere Untersuchungen hierzu zeigen, dass die neuronale Toxizität des löslichen A β weniger von der Menge als von der molekularen Zusammensetzung bestimmt wird (Piccini et al., 2005).

Es verstärkt sich vielmehr die Vermutung, dass über die extrazelluläre β -Amyloid-Ablagerung hinaus zusätzliche Mechanismen am Neuronenverlust beteiligt sein müssen.

Bereits im Jahre 1985 berichteten Masters et al., dass während der Alzheimer-Pathogenese Amyloid zunächst innerhalb der Neuronen und erst später im Extrazellulärraum abgelagert wird (Masters et al., 1985). Seitdem konzentrieren sich verschiedene Untersuchungen verstärkt auf die potentielle Rolle des intrazellulären β -Amyloid bei der Alzheimer-Pathogenese.

Beobachtungen an Gehirnen von AD-Patienten zeigen, dass intraneuronales A β 42 bevorzugt in den Pyramidenzellen des Hippocampus und des entorhinalen Kortex akkumuliert. Da gerade diese Gehirnregionen früh von den pathologischen Veränderungen der Alzheimer-Erkrankung betroffen sind und die Immunreaktivität der intraneuronalen A β 42-Peptide interessanterweise mit Zunahme der Plaquebildung und kognitiver Dysfunktion abnahm, vermutet man, dass die intraneuronale A β 42-Akkumulation ein frühzeitiges Ereignis in der AD-Pathogenese darstellt (Gouras et al., 2000).

Auch an Mausmodellen der AD wurde diese Beobachtung untersucht: So weisen Mäuse des doppeltransgenen Mausmodells APP/PS1 bereits intraneuronale A β -Akkumulation auf, bevor sich Plaques erkennen lassen. Wirths et al. fanden bei diesen Mäusen sowohl in hippocampalen als auch in kortikalen Pyramidenzellen eine erhöhte intraneuronale A β -Immunreaktivität (Wirths et al., 2001), während in einem weiteren APP/PS1-Mausmodell

diese Beobachtung sogar noch stärker ausgeprägt ist (Blanchard et al., 2003). Bei jungen Mäusen des letzteren Modells zeigt sich in Pyramidenzellen eine ausgeprägte A β -Akkumulation, die mit zunehmendem Alter und zunehmender extrazellulärer Plaque-Akkumulation abnimmt (Wirhns et al., 2002), was der bereits erwähnten Beobachtung an menschlichen Alzheimer-Gehirnen entspricht.

Mögliche Auswirkungen der intrazellulären A β -Akkumulation beschrieben Takahashi et al.. So zeigten sie, dass die intraneuronale A β 42-Akkumulation hauptsächlich im Bereich der Synapsen, genauer gesagt in multivesikulären Körpern (multivesicular bodies, MVBs) innerhalb prä- und postsynaptischer Kompartimente erfolgt. Somit könnte die intraneuronale Akkumulation unmittelbar im Zusammenhang mit einer veränderten Synapsen-Morphologie stehen, welche der extrazellulären Plaque-Ablagerung zeitlich vorausgeht (Takahashi et al., 2002). Unterstützt wird diese Beobachtung durch ein APP/Tau/PS1-Tripel-transgenes-Mausmodell (3xTg-AD), bei dem vor der extrazellulären Plaque-Ablagerung intraneuronale A β -Akkumulation sowie Synapsen-Dysfunktion beobachtet werden können (Oddo et al., 2003). Sheng et al. berichten weiterhin von einem Zusammenhang zwischen intraneuronaler β -Amyloid-Akkumulation und Neuroinflammation (Sheng et al., 2003).

Die Frage, ob die intrazelluläre A β -Akkumulation nun auch im Zusammenhang mit dem für die AD typischen Neuronenverlust stehen könnte, versuchen unter anderem Chui et al. zu beantworten. Die Vermutung, dass der Prozess des Neuronenverlustes während der Alzheimer-Erkrankung durch apoptotischen Zelluntergang induziert sein könnte, konnten sie untermauern, als sie über eine Korrelation zwischen intrazellulären A β -Ablagerungen und Zellzerstörung sowie apoptotischem Zelluntergang berichteten (Chui et al., 2001). LaFerla et al. hatten schon 1997 an zahlreichen Zellen, die offensichtlich durch Apoptose zugrunde gegangen waren, eine A β -ähnliche Immunreaktion beobachtet (LaFerla et al., 1997).

Verschiedene Zellkultur-Versuche konnten die potentielle Apoptose-induzierende Rolle von intraneuronalem A β weiter unterstützen. So ist eine erhöhte intrazelluläre A β 42-Konzentration in kortikalen Ratten-Neuronen verbunden mit einer verminderten Überlebenszeit der Neurone und dem Auftreten von apoptotischen Zellkernen. Nach Gabe eines funktionellen γ -Sekretase-Hemmers ist die Produktion des intrazellulären A β 42 vermindert, was sich gleichzeitig in einer signifikanten Steigerung der Neuronen-Überlebenszeit äußert (Kienlen-Campard et al., 2002).

Wie LaFerla bereits im Jahre 1995 vermutete, scheint vor allem die intrazellulär vorhandene Menge an A β 42 bzw. das Verhältnis von A β 42 zu Gesamt-A β ein wichtiger Punkt bezüglich Neurotoxizität zu sein (LaFerla et al., 1995). So konnten Zhang et al zeigen, dass

Mikroinjektionen von A β 42 in menschliche Neurone einen Zelluntergang zur Folge hat, während die Injektion von A β 40 keinen toxischen Effekt zeigt (Zhang et al., 2002).

Die Erkenntnisse über die potentiell toxischen Wirkungen von intrazellulärem A β führen dazu, dass die ursprüngliche Amyloid-Kaskaden-Hypothese von Hardy und Allsop nochmals überdacht werden sollte.

Da auch Schmitz et al. am AD-Mausmodell APP^{SL}PS1^{M146L} erkannten, dass der hippocampale Neuronenverlust nicht mit den extrazellulären A β -Plaques-Ablagerungen korreliert, liegt die Vermutung nahe, dass intrazelluläres A β in einem Zusammenhang mit der Neurodegeneration stehen könnte (Schmitz et al., 2004).

So formulierten Wirths et al. eine modifizierte Amyloid-Kaskaden-Hypothese, die die Rolle des intrazellulären A β bei der Alzheimer-Pathogenese berücksichtigt. Nach dieser modifizierten Hypothese beginnt der neuropathologische Prozess der Alzheimer-Erkrankung mit erhöhten intraneuronalen A β -Spiegeln. Diese sind einerseits durch eine erhöhte intrazelluläre A β -Synthese, andererseits durch eine A β -Wiederaufnahme aus dem Extrazellulärraum bedingt, was auch bereits Echeverria und Cuervo vermuteten (Echeverria and Cuervo, 2002). Aus der intrazellulären A β -Akkumulation resultieren einerseits die neurodegenerativen Veränderungen wie Synapsendysfunktion und Neuronenverlust bis hin zur Atrophie verschiedener Gehirnregionen mit klinischen Zeichen der Demenz, andererseits die extrazelluläre Amyloid-Plaques-Ablagerung über eine A β -Sekretion in den Extrazellulärraum (Wirths et al., 2004).

Somit besteht gemäß dieser Hypothese kein direkter Zusammenhang zwischen der extrazellulären Ablagerung von Amyloidplaques und dem typischen Neuronenverlust.

Viele weitere Untersuchungen scheinen diese Hypothese zu bestätigen. So spricht auch Cuervo bei der Alzheimer-Pathogenese von einem kontinuierlichen Prozess von der intrazellulären A β -Ablagerung bis hin zur extrazellulären A β -Aggregation, welcher schließlich in der Bildung der Amyloidplaques und dystrophischer Neurone kumuliert (Cuervo, 2005). Marchesi spricht von der Möglichkeit, dass ein Teil des intrazellulär gebildeten A β die Zellmembran niemals überwindet, sondern die Funktion membrangebundener Proteine beeinflusst. Dabei spekuliert er sogar über eine mögliche Beeinflussung des γ -Sekretase-Komplexes durch intraneuronales A β (Marchesi, 2005).

Somit bestätigen neueste Erkenntnisse die Vermutung, dass es vielmehr die Akkumulation an intraneuronalem A β ist, die bei den typischen neuropathologischen Veränderungen der Alzheimer-Erkrankung wie Neuronenverlust eine ursächliche Rolle zu spielen scheint.

Da ich bei der Untersuchung des AD-Mausmodells APP751^{SL}PS1KI einen signifikanten Geschlechtseffekt bezüglich des Neuronenverlustes feststellen konnte, bleibt nun die Frage, ob man bereits bei der Akkumulation von intraneuronalem β -Amyloid von geschlechtsspezifischen Unterschieden ausgehen kann.

In einer bislang unveröffentlichten Arbeit unserer Arbeitsgruppe detektierten wir in dem transgenen Mausmodell Thy-APP751^{SL} einen Geschlechtseffekt bei der APP-Prozessierung, der sich zeitlich vor einer offensichtlichen Plaque-Ablagerung, d. h. bereits im Alter von 14 Wochen zeigte. Untersucht wurden Mäuse beider Geschlechter im Alter von vier, acht und 14 Wochen. Obwohl sich eine konstante geschlechtsunabhängige APP-Expression zeigt, liegt bei den Weibchen A β 40 zu jedem Zeitpunkt in einer höheren Konzentration vor als bei den Männchen. Ein geschlechtsspezifischer Konzentrationsunterschied findet sich auch bezüglich des BACE-Produktes C99 im Alter von 14 Wochen.

Neben den Amyloidplaques und dem intrazellulären A β können letztendlich noch weitere Faktoren zu einem Geschlechtseffekt beitragen: So besitzt das Steroidhormon Östrogen vielfältige protektive zerebrale Wirkungen, die sich bei den weiblichen Mäusen mit Eintritt in die Menopause und dem daraus resultierenden relativen Östrogenmangel abschwächen und somit eventuell indirekt zum Neuronenverlust beitragen können. Da die von unserer Gruppe untersuchten weiblichen Mäuse des AD-Mausmodells Thy-APP751^{SL} bereits im Alter von 14 Wochen erhöhte Konzentrationen sowohl an β -Amyloid als auch an C99 im Vergleich zu den Männchen zeigen, scheidet der mögliche Einfluss des relativen Östrogenmangels als Begründung aus, da sich Mäuse im Allgemeinen erst ab einem Alter von ungefähr 12 Monaten in der Menopause und somit einem relativen Östrogenmangel-Zustand befinden.

Eine weitere mögliche Erklärung für erhöhte Konzentrationen an A β bzw. C99 wäre ein Ungleichgewicht zwischen ihrer Bildung und ihrem Abbau (Hardy and Selkoe, 2002; Kowalska, 2004). Laut Saido ist der Effekt eines um 30-50% reduzierten A β -Katabolismus gleichzusetzen mit einer A β -Überproduktion wie man sie bei der familiären Form der AD aufgrund verschiedener Mutationen findet (Saido, 1998). Daher sollte man sowohl die an der Synthese beteiligten Enzyme als auch die vielzähligen am Abbau beteiligten Proteasen wie IDE (insulin-degrading-enzyme/Insulysin) oder NEP (Nepilysin) auf einen Geschlechtseffekt untersuchen. Dem geschlechtsspezifischen Unterschied an A β und C99 könnte somit sowohl eine verstärkte Synthese bzw. ein verminderter Abbau bei den Weibchen, als auch eine verminderte Synthese bzw. ein verstärkter Abbau bei den Männchen zugrunde liegen.

Das Expressionsmuster der an der A β -Produktion beteiligten β -Sekretase (BACE1) zeigt mit zunehmendem Alter als auch zwischen den Geschlechtern der Tiere des Modells Thy-APP751^{SL} keinen Unterschied (Fukumoto et al., 2004). Während jedoch bei zunehmendem Alter die weiblichen Mäuse eine gleichbleibende BACE-Aktivität aufweisen, zeigt sich bei den Männchen eine Tendenz zur Aktivitäts-Abnahme. Da der limitierende Faktor der A β -Produktion in der β -Sekretase-Aktivität und nicht in der γ -Sekretase-Aktivität besteht (Bodendorf et al., 2002), könnte die reduzierte BACE-Aktivität möglicherweise in geringeren A β -Konzentrationen bei den Männchen resultieren.

Die für den A β -Abbau zuständigen Proteasen sind vielfältig. Leissring et al. konnten zeigen, dass unter anderem eine Überexpression von IDE (insulin-degrading enzyme) oder auch von NEP (Neprilysin) in APP-transgenen Mäusen zu signifikant reduzierten zerebralen A β -Konzentrationen führt und somit die Plaquebildung verzögert oder sogar vollständig verhindert (Leissring et al., 2003). Von dem Enzym IDE ist sogar ein Geschlechtseffekt bekannt (Bian et al., 2004).

Alle bisherigen Erklärungsansätze haben sich auf den Einfluss spezieller, teilweise hypothetischer Faktoren der Alzheimer-Pathogenese auf den geschlechtsspezifischen Neuronenverlust beschränkt. Jedoch möchte ich den potentiellen Einfluss der Hormone im AD-Patienten nicht unerwähnt lassen.

Nach der Menopause sinkt der Östrogenspiegel bei Frauen ab. Es wird diskutiert, dass unter anderem dadurch die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wie AD begünstigt werden könnte, da das Steroidhormon Östrogen spezielle Alzheimer-relevante zerebrale Effekte besitzt, wie zum Beispiel eine antioxidative Wirkung (Niki and Nakano, 1990), die einen Schutz vor den neurotoxischen β -Amyloid-Fragmenten darstellt (Behl et al., 1994) oder eine Östrogen-vermittelte Abschwächung der inflammatorischen Prozesse durch neuritische Plaques (Bauer et al., 1992). Da Östrogene zudem den amyloidogenen APP-Prozessierungsweg unterdrücken können, findet durch die verminderte Bildung von aggregationsfreudigen zytotoxischen β -Amyloid-Peptiden die A β -Akkumulation nur in geringerem Ausmaß statt (Smith and Levin-Allerhand, 2003). Aufgrund dieser und einer Vielzahl weiterer positiver Effekte des Hormons Östrogen ist denkbar, dass ein Zustand des (relativen) Östrogenmangels das Auftreten einer neurodegenerativen Erkrankung wie der Alzheimer-Demenz begünstigen könnte.

In diesem Zusammenhang wird vielfach diskutiert, ob die postmenopausale Hormonersatztherapie (HET) bei Frauen zur Alzheimer-Prävention sinnvoll eingesetzt

werden kann. Obwohl eine Meta-Analyse von zehn Studien ergab, dass das Risiko für AD bei Frauen mit postmenopausaler HET im Vergleich zu Frauen, die niemals Östrogen erhielten, um 29% reduziert war (Yaffe et al., 1998), konnten weitere Studien den Nutzen der HET nicht bestätigen. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es somit laut Sherwin keinen Grund, die HET als eine effektive Behandlungsmethode der AD anzusehen (Sherwin, 2003).

Neueste Studien konzentrieren sich auf andere Hormone der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse, die man bislang eher unbeachtet gelassen hatte: die Gonadotropine Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikel-stimulierendes Hormon (FSH). Webber et al. vermuten, dass vielmehr der postmenopausale Anstieg der Gonadotropin-Konzentrationen als das Absinken der Östrogen-Konzentrationen für ein erhöhtes AD-Risiko verantwortlich gemacht werden kann (Webber et al., 2004). Es wird die Aufgabe zukünftiger Forschungen sein, ihren potentiellen Einfluss auf die Alzheimer-Erkrankung in weiteren Studien genauer zu untersuchen.

Der Geschlechtseffekt in der hippocampalen CA1-Neuronenanzahl wurde an Mäusen des AD-Mausmodells APP751^{SL}PS1KI im Alter von sechs Monaten untersucht und als signifikant quantifiziert, was einen bislang einzigartig frühen Zeitpunkt darstellt. Aus demselben Grund ist es in diesem Falle unwahrscheinlich, den hormonellen Einfluss als mögliche Ursache des Geschlechtseffektes anzusehen, da die Menopause bei Mäusen nach vorherrschender Meinung erst ab einem Alter von ungefähr 12 Monaten eintritt und somit ein solcher hormoneller „Mangel“-Zustand bei den von mir untersuchten Tieren im Alter von sechs Monaten noch nicht vorliegt.

Nach der Untersuchung der Neuronenanzahl, die einen Geschlechtsunterschied im Alzheimer-Mausmodell APP751^{SL}PS1KI aufdeckte, befasste sich diese Arbeit mit der Volumenbestimmung in beiden Alzheimer-Mausmodellen sowohl im Bereich der hippocampalen CA1-Region als auch des gesamten Hippocampus. Anhand der während der Neuronenzählung gewonnenen Daten war es möglich, die Volumina zu berechnen. Als Konsequenz des Neuronenverlustes erwartete man verminderte Volumenwerte in den entsprechenden Gehirnregionen, wobei zunächst untersucht werden sollte, ob man auch bezüglich der Volumina einen möglichen signifikanten Geschlechtsunterschied finden würde. Anhand der errechneten Daten zeigte sich, dass sich in dem Alzheimer-Mausmodell APP751^{SL}PS1KI trotz des signifikanten Geschlechtsunterschiedes bezüglich der Neuronenzahl weder in der hippocampalen CA1-Region noch im Bereich des gesamten Hippocampus einen signifikanten Geschlechtsunterschied der Volumenwerte feststellen ließ.

Es ist denkbar, dass der signifikant stärkere Neuronenverlust der Weibchen zu diesem frühen Zeitpunkt der Untersuchung, nämlich im Alter von sechs Monaten, noch nicht stark genug ausgeprägt ist, um sich auch bereits in einer Abnahme der CA1- bzw. Hippocampus-Volumina bemerkbar zu machen, andererseits könnte auch die Gruppengröße nicht ausreichend gewesen sein.

Auch die Volumina der hippocampalen CA1-Region als auch des gesamten Hippocampus der als Kontrollgruppe dienenden Mäuse des Modells PS1KI wurden berechnet. Hierbei ergab sich ebenfalls weder in der CA1-Region noch im gesamten Hippocampus ein signifikanter Geschlechtsunterschied der Volumenwerte.

Vergleicht man die Mittelwerte aller Tiere des jeweiligen Modells sowohl für den Bereich der hippocampalen CA1-Region als auch des gesamten Hippocampus, ergibt sich ein signifikanter Volumenunterschied im Bereich der CA1-Region mit signifikant vermindertem Volumen der Tiere des Modells APP751^{SL}PS1KI ($p = 0,004$) im Gegensatz zum Modell PS1KI. Möglicherweise könnte man eine Begründung darin sehen, dass in dem Modell PS1KI der ungünstige Einfluss der APP-Komponente des doppeltransgenen Modells APP751^{SL}PS1KI fehlt. So führen APP-Mutationen, wie sie in diesem Modell verwendet wurden, zu einer Überproduktion von A β -Peptiden, deren ungünstige Effekte nach intrazellulärer Akkumulation wie zum Beispiel die Veränderung der Synapsen-Morphologie (Takahashi et al., 2002) oder apoptotischer Zelluntergang (Chui et al., 2001) bereits im vorangehenden Abschnitt des Neuronenverlustes diskutiert wurden. Denkbar wäre ebenfalls, dass der Phänotyp der Mäuse des Modells PS1KI bereits grundlegend eine im Vergleich zu anderen Modellen größere CA1-Region aufweist. So erreichen APP-doppeltransgene Mäuse verglichen mit PS1-Tieren ein geringeres Körpergewicht (Green, 1975). Bislang sind noch keine phänotypischen Volumenunterschiede der beiden von mir untersuchten Mausmodelle im Bereich verschiedener Gehirnareale, besonders der CA1-Region, publiziert worden.

Es bleibt unklar, welche genauen molekularen Mechanismen für den signifikanten Geschlechtseffekt des Neuronenverlustes im von mir untersuchten AD-Mausmodell APP751^{SL}PS1KI verantwortlich gemacht werden können. Verschiedene Erklärungsansätze wurden dargelegt und diskutiert. So könnten die extrazellulären A β -Ablagerungen in Form der Amyloidplaques als Ursache für den Geschlechtseffekt angesehen werden, während die neuere Forschung zeigt, dass die Begründung nicht darin alleine gesucht werden darf. Stattdessen wird deutlich, dass sich künftige Forschungsprojekte besonders auf die Rolle des intrazellulären A β bei der Alzheimer-Pathogenese konzentrieren sollten, da sich auch hier

geschlechtsspezifische Unterschiede gezeigt haben. Dennoch scheint es offensichtlich, dass man nicht eine einzige Ursache als Erklärung heranziehen kann, sondern dass man sich vor Augen führen muss, dass es sich immer um eine Vielzahl verschiedener Mechanismen handelt, die an der komplizierten Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung beteiligt sind.

Weitere Forschungen an geeigneten Alzheimer-Mausmodellen werden künftig nötig sein, um genaue Erkenntnisse über den geschlechtsspezifischen Neuronenverlust und weitere Geschlechtseffekte bei der AD erlangen zu können. Besonders im Hinblick auf erhöhte Inzidenzzahlen der AD bei Frauen und den weiterhin fortschreitenden Anstieg der Lebenserwartung ist es wichtig, das Risiko für Frauen, an Alzheimer-Demenz zu erkranken, abschätzen zu können und die zugrundeliegenden Pathomechanismen genau zu kennen, um die Erkrankung dadurch therapierbar zu machen oder sogar vermeiden zu können.

5. Literaturverzeichnis

- Andersen K, Launer LJ, Ott A, Hoes AW, Breteler MM, Hofman A (1995) Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease the risk for Alzheimer's disease? The Rotterdam Study. *Neurology* 45:1441-1445.
- Andersen K, Launer LJ, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Copeland JR, Dartigues JF, Kragh-Sorensen P, Baldereschi M, Brayne C, Lobo A, Martinez-Lage JM, Stijnen T, Hofman A (1999) Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology* 53:1992-1997.
- Armstrong DM, Terry RD (1985) Substance P immunoreactivity within neuritic plaques. *Neurosci Lett* 58:139-144.
- Armstrong DM, Bruce G, Hersh LB, Terry RD (1986) Choline acetyltransferase immunoreactivity in neuritic plaques of Alzheimer brain. *Neurosci Lett* 71:229-234.
- Armstrong DM, Benzing WC, Evans J, Terry RD, Shields D, Hansen LA (1989) Substance P and somatostatin coexist within neuritic plaques: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 31:663-671.
- Asthana S, Baker LD, Craft S, Stanczyk FZ, Veith RC, Raskind MA, Plymate SR (2001) High-dose estradiol improves cognition for women with AD: results of a randomized study. *Neurology* 57:605-612.
- Barnes LL, Wilson RS, Bienias JL, Schneider JA, Evans DA, Bennett DA (2005) Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology. *Arch Gen Psychiatry* 62:685-691.
- Barrett-Connor E, Kritz-Silverstein D (1993) Estrogen replacement therapy and cognitive function in older women. *Jama* 269:2637-2641.
- Bauer J, Ganter U, Strauss S, Stadtmuller G, Frommberger U, Bauer H, Volk B, Berger M (1992) The participation of interleukin-6 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Res Immunol* 143:650-657.
- Bayer TA, Schafer S, Simons A, Kemmling A, Kamer T, Tepest R, Eckert A, Schussel K, Eikenberg O, Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Staufenbiel M, Multhaup G (2003) Dietary Cu stabilizes brain superoxide dismutase 1 activity and reduces amyloid Abeta production in APP23 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14187-14192. Epub 12003 Nov 14114.

- Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77:817-827.
- Bian L, Yang JD, Guo TW, Sun Y, Duan SW, Chen WY, Pan YX, Feng GY, He L (2004) Insulin-degrading enzyme and Alzheimer disease: a genetic association study in the Han Chinese. *Neurology* 63:241-245.
- Bickel H (2000) Demenzsyndrom und Alzheimer Krankheit: Eine Schätzung des Krankenbestandes und der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland. *Das Gesundheitswesen* 62:211-218.
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, Bayer TA, Langui D, Duyckaerts C, Tremp G, Pradier L (2003) Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A β deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* 184:247-263.
- Bodendorf U, Danner S, Fischer F, Stefani M, Sturchler-Pierrat C, Wiederhold KH, Staufenbiel M, Paganetti P (2002) Expression of human beta-secretase in the mouse brain increases the steady-state level of beta-amyloid. *J Neurochem* 80:799-806.
- Bondareff W, Mountjoy CQ, Roth M (1981) Selective loss of neurones of origin of adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus coeruleus) in senile dementia. *Lancet* 1:783-784.
- Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG, Sisodia SS (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β ₁₋₄₂/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17:1005-1013.
- Bowen RL, Isley JP, Atkinson RL (2000) An association of elevated serum gonadotropin concentrations and Alzheimer disease? *J Neuroendocrinol* 12:351-354.
- Bowen RL, Smith MA, Harris PL, Kubat Z, Martins RN, Castellani RJ, Perry G, Atwood CS (2002) Elevated luteinizing hormone expression colocalizes with neurons vulnerable to Alzheimer's disease pathology. *J Neurosci Res* 70:514-518.
- Brion JP, Couck AM, Bruce M, Anderton B, Flament-Durand J (1991) Synaptophysin and chromogranin A immunoreactivities in senile plaques of Alzheimer's disease. *Brain Res* 539:143-150.
- Buxbaum JD, Greengard P (1996) Regulation of APP processing by intra- and intercellular signals. *Ann N Y Acad Sci* 777:327-331.

- Cai XD, Golde TE, Younkin SG (1993) Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* 259:514-516.
- Calhoun ME, Wiederhold KH, Abramowski D, Phinney AL, Probst A, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B, Jucker M (1998) Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature* 395:755-756.
- Callahan MJ, Lipinski WJ, Bian F, Durham RA, Pack A, Walker LC (2001) Augmented senile plaque load in aged female beta-amyloid precursor protein-transgenic mice. *Am J Pathol* 158:1173-1177.
- Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, van der Kolk N, Vingtdoux V, van de Steeg E, Ret G, Canton T, Drobecq H, Clark A, Bonici B, Delacourte A, Benavides J, Schmitz C, Tremp G, Bayer TA, Benoit P, Pradier L (2004) Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol* 165:1289-1300.
- Chakravarti S, Collins WP, Forecast JD, Newton JR, Oram DH, Studd JW (1976) Hormonal profiles after the menopause. *Br Med J* 2:784-787.
- Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J, et al. (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353:844-846.
- Chui DH, Dobo E, Makifuchi T, Akiyama H, Kawakatsu S, Petit A, Checler F, Araki W, Takahashi K, Tabira T (2001) Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular Abeta42 labeling. *J Alzheimers Dis* 3:231-239.
- Chui DH, Tanahashi H, Ozawa K, Ikeda S, Checler F, Ueda O, Suzuki H, Araki W, Inoue H, Shirotani K, Takahashi K, Gallyas F, Tabira T (1999) Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nat Med* 5:560-564.
- Clark EA, Leach KL, Trojanowski JQ, Lee VM (1991) Characterization and differential distribution of the three major human protein kinase C isozymes (PKC alpha, PKC beta, and PKC gamma) of the central nervous system in normal and Alzheimer's disease brains. *Lab Invest* 64:35-44.
- Cole GM, Masliah E, Shelton ER, Chan HW, Terry RD, Saitoh T (1991) Accumulation of amyloid precursor fragment in Alzheimer plaques. *Neurobiol Aging* 12:85-91.
- Coleman PD, Yao PJ (2003) Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24:1023-1027.

- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-923.
- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Jr., Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE, et al. (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 7:180-184.
- Couzinet B, Schaison G (1993) The control of gonadotrophin secretion by ovarian steroids. *Hum Reprod* 8:97-101.
- Cras P, Kawai M, Lowery D, Gonzalez-DeWhitt P, Greenberg B, Perry G (1991) Senile plaque neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7552-7556.
- Cuello AC (2005) Intracellular and extracellular A β , a tale of two neuropathologies. *Brain Pathol* 15:66-71.
- Cummings JL, Vinters HV, Cole GM, Khachaturian ZS (1998) Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurology* 51:S2-17; discussion S65-17.
- Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO (1987) A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 78:151-164.
- De Strooper B (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38:9-12.
- De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391:387-390.
- Divry P (1927) Etude histochemique des plaques seniles. *Neurol Psychiatry* 27:643-657.
- Echeverria V, Cuello AC (2002) Intracellular A-beta amyloid, a sign for worse things to come? *Mol Neurobiol* 26:299-316.
- Ershler WB (1993) Interleukin-6: a cytokine for gerontologists. *J Am Geriatr Soc* 41:176-181.
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ (1990) Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248:1122-1124.
- Farrer LA, Cupples LA, van Duijn CM, Kurz A, Zimmer R, Muller U, Green RC, Clarke V, Shoffner J, Wallace DC, et al. (1995) Apolipoprotein E genotype in patients with

- Alzheimer's disease: implications for the risk of dementia among relatives. *Ann Neurol* 38:797-808.
- Fernandez-Vizarra P, Fernandez AP, Castro-Blanco S, Serrano J, Bentura ML, Martinez-Murillo R, Martinez A, Rodrigo J (2004) Intra- and extracellular Abeta and PHF in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. *Histol Histopathol* 19:823-844.
- Foundas AL, Leonard CM, Mahoney SM, Agee OF, Heilman KM (1997) Atrophy of the hippocampus, parietal cortex, and insula in Alzheimer's disease: a volumetric magnetic resonance imaging study. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol* 10:81-89.
- Fourrier A, Letenneur L, Begaud B, Dartigues JF (1996) Nonsteroidal antiinflammatory drug use and cognitive function in the elderly: inconclusive results from a population-based cohort study. *J Clin Epidemiol* 49:1201.
- Fratiglioni L, Launer LJ, Andersen K, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, Lobo A, Martinez-Lage J, Soininen H, Hofman A (2000) Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology* 54:S10-15.
- Fukumoto H, Rosene DL, Moss MB, Raju S, Hyman BT, Irizarry MC (2004) Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain. *Am J Pathol* 164:719-725.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, et al. (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373:523-527.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706.
- Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT (1997) Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41:17-24.
- Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, Greengard P, Relkin NR (2000) Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol* 156:15-20.
- Graeber MB, Kosel S, Egensperger R, Banati RB, Muller U, Bise K, Hoff P, Moller HJ, Fujisawa K, Mehraein P (1997) Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics* 1:73-80.

- Graves AB, White E, Koepsell TD, Reifler BV, van Belle G, Larson EB, Raskind M (1990) A case-control study of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 28:766-774.
- Green EL (1975) *Biology of the Laboratory Mouse*, Dover Edition. New York: originally published by the McGraw-Hill Book Company.
- Greenfield JG, Bosanquet FD (1953) The brain-stem lesions in Parkinsonism. *J Neurochem* 16:213-226.
- 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* 83:4913-4917.
- Haass C, Hung AY, Selkoe DJ, Teplow DB (1994) Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem* 269:17741-17748.
- Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L, Selkoe DJ (1995) The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med* 1:1291-1296.
- Hamos JE, DeGennaro LJ, Drachman DA (1989) Synaptic loss in Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology* 39:355-361.
- Hardy J, Allsop D (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12:383-388.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Higgins GA, Jacobsen H (2003) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: phenotype and application. *Behav Pharmacol* 14:419-438.
- Hill LR, Klauber MR, Salmon DP, Yu ES, Liu WT, Zhang M, Katzman R (1993) Functional status, education, and the diagnosis of dementia in the Shanghai survey. *Neurology* 43:138-145.
- Hof PR, Glannakopoulos P, Bouras C (1996) The neuropathological changes associated with normal brain aging. *Histol Histopathol* 11:1075-1088.
- Honer WG, Dickson DW, Gleeson J, Davies P (1992) Regional synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 13:375-382.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99-102.

- Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT (1997a) APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:965-973.
- Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Schenk D, Games D, Hyman BT (1997b) Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci* 17:7053-7059.
- Ishii T, Kametani F, Haga S, Sato M (1989) The immunohistochemical demonstration of subsequences of the precursor of the amyloid A4 protein in senile plaques in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 15:135-147.
- Jacobs DM, Tang MX, Stern Y, Sano M, Marder K, Bell KL, Schofield P, Dooneief G, Gurland B, Mayeux R (1998) Cognitive function in nondemented older women who took estrogen after menopause. *Neurology* 50:368-373.
- Jarrett JT, Lansbury PT, Jr. (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73:1055-1058.
- Jenkinson ML, Bliss MR, Brain AT, Scott DL (1989) Rheumatoid arthritis and senile dementia of the Alzheimer's type. *Br J Rheumatol* 28:86-88.
- Joachim C, Games D, Morris J, Ward P, Frenkel D, Selkoe D (1991) Antibodies to non-beta regions of the beta-amyloid precursor protein detect a subset of senile plaques. *Am J Pathol* 138:373-384.
- Joachim CL, Morris JH, Selkoe DJ, Kosik KS (1987) Tau epitopes are incorporated into a range of lesions in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 46:611-622.
- Jodar-Vicente M (2001) [Initial deficits in Alzheimer's disease: 3 practical examples]. *Rev Neurol* 32:1173-1177.
- Jorm AF, Jolley D (1998) The incidence of dementia: a meta-analysis. *Neurology* 51:728-733.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733-736.
- Katzman R, Terry R, DeTeresa R, Brown T, Davies P, Fuld P, Renbing X, Peck A (1988) Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol* 23:138-144.

- Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG (2001) Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21:372-381.
- Kidd M (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197:192-193.
- Kienlen-Campard P, Miolet S, Tasiaux B, Octave JN (2002) Intracellular amyloid-beta 1-42, but not extracellular soluble amyloid-beta peptides, induces neuronal apoptosis. *J Biol Chem* 277:15666-15670. Epub 12002 Feb 15622.
- Kitaguchi N, Takahashi Y, Tokushima Y, Shiojiri S, Ito H (1988) Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331:530-532.
- Kowalska A (2004) [The beta-amyloid cascade hypothesis: a sequence of events leading to neurodegeneration in Alzheimer's disease]. *Neurol Neurochir Pol* 38:405-411.
- Kraszpulski M, Soininen H, Helisalmi S, Alafuzoff I (2001) The load and distribution of beta-amyloid in brain tissue of patients with Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 103:88-92.
- Kril JJ, Hodges J, Halliday G (2004) Relationship between hippocampal volume and CA1 neuron loss in brains of humans with and without Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 361:9-12.
- Laakso MP, Soininen H, Partanen K, Lehtovirta M, Hallikainen M, Hanninen T, Helkala EL, Vainio P, Riekkinen PJ, Sr. (1998) MRI of the hippocampus in Alzheimer's disease: sensitivity, specificity, and analysis of the incorrectly classified subjects. *Neurobiol Aging* 19:23-31.
- LaFerla FM, Tinkle BT, Bieberich CJ, Haudenschild CC, Jay G (1995) The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nat Genet* 9:21-30.
- LaFerla FM, Troncoso JC, Strickland DK, Kawas CH, Jay G (1997) Neuronal cell death in Alzheimer's disease correlates with apoE uptake and intracellular A beta stabilization. *J Clin Invest* 100:310-320.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3922-3927.

- Lee JY, Cole TB, Palmiter RD, Suh SW, Koh JY (2002) Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7705-7710.
- Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X, Frosch MP, Selkoe DJ (2003) Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 40:1087-1093.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293:1487-1491.
- Lorenzo A, Yankner BA (1994) Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12243-12247.
- Mandybur TI, Nagpaul AS, Pappas Z, Niklowitz WJ (1977) Alzheimer neurofibrillary change in subacute sclerosing panencephalitis. *Ann Neurol* 1:103-107.
- Manly JJ, Merchant CA, Jacobs DM, Small SA, Bell K, Ferin M, Mayeux R (2000) Endogenous estrogen levels and Alzheimer's disease among postmenopausal women. *Neurology* 54:833-837.
- Marchesi VT (2005) An alternative interpretation of the amyloid Abeta hypothesis with regard to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9093-9098. Epub 2005 Jun 9020.
- Marder K, Sano M (2000) Estrogen to treat Alzheimer's disease: too little, too late? So what's a woman to do? *Neurology* 54:2035-2037.
- Masliah E, Terry R (1993) The role of synaptic proteins in the pathogenesis of disorders of the central nervous system. *Brain Pathol* 3:77-85.
- Masliah E, Terry RD, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA (1991) Cortical and subcortical patterns of synaptophysinlike immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 138:235-246.
- Masliah E, Cole G, Shimohama S, Hansen L, DeTeresa R, Terry RD, Saitoh T (1990) Differential involvement of protein kinase C isozymes in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 10:2113-2124.
- Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *Embo J* 4:2757-2763.

- McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG (1996) Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 47:425-432.
- McGeer PL, McGeer E, Rogers J, Sibley J (1990) Anti-inflammatory drugs and Alzheimer disease. *Lancet* 335:1037.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46:860-866.
- Miller DL, Currie JR, Iqbal K, Potempska A, Styles J (1989) Relationships among the cerebral amyloid peptides and their precursors. *Ann Med* 21:83-87.
- Mooradian AD (1993) Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 45:509-511.
- Mortel KF, Meyer JS (1995) Lack of postmenopausal estrogen replacement therapy and the risk of dementia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 7:334-337.
- Mortimer JA, French LR, Hutton JT, Schuman LM (1985) Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease. *Neurology* 35:264-267.
- Mortimer JA, Fortier I, Rajaram L, Gauvreau D (1998) Higher education and socioeconomic status in childhood protect individuals at genetic risk of AD from expressing symptoms in late life: the Saguenay-Lac-Saint-Jean Health and Aging Study. *Neurobiol Aging* 19:215.
- Muesing RA, Miller VT, LaRosa JC, Stoy DB, Phillips EA (1992) Effects of unopposed conjugated equine estrogen on lipoprotein composition and apolipoprotein-E distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 75:1250-1254.
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1:345-347.
- Mullan M, Tsuji S, Miki T, Katsuya T, Naruse S, Kaneko K, Shimizu T, Kojima T, Nakano I, Ogihara T, et al. (1993) Clinical comparison of Alzheimer's disease in pedigrees with the codon 717 Val->Ile mutation in the amyloid precursor protein gene. *Neurobiol Aging* 14:407-419.
- Mulnard RA, Cotman CW, Kawas C, van Dyck CH, Sano M, Doody R, Koss E, Pfeiffer E, Jin S, Gamst A, Grundman M, Thomas R, Thal LJ (2000) Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. Alzheimer's Disease Cooperative Study. *Jama* 283:1007-1015.

- Munoz DG (1991) Chromogranin A-like immunoreactive neurites are major constituents of senile plaques. *Lab Invest* 64:826-832.
- Nedoschill JC, Lang CJ, Lanczik M (1999) [Dementia of the Alzheimer type in women]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 67:441-447.
- Newton C, Slota D, Yuzpe AA, Tummon IS (1996) Memory complaints associated with the use of gonadotropin-releasing hormone agonists: a preliminary study. *Fertil Steril* 65:1253-1255.
- Niki E, Nakano M (1990) Estrogens as antioxidants. *Methods Enzymol* 186:330-333.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409-421.
- Paganini-Hill A, Henderson VW (1994) Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am J Epidemiol* 140:256-261.
- Perry G, Friedman R, Shaw G, Chau V (1987) Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3033-3036.
- Phillips SM, Sherwin BB (1992) Effects of estrogen on memory function in surgically menopausal women. *Psychoneuroendocrinology* 17:485-495.
- Piccini A, Russo C, Gliozzi A, Relini A, Vitali A, Borghi R, Giliberto L, Armirotti A, D'Arrigo C, Bachi A, Cattaneo A, Canale C, Torrassa S, Saido TC, Markesbery W, Gambetti P, Tabaton M (2005) beta-amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280:34186-34192. Epub 32005 Aug 34115.
- Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S (1993) Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 342:697-699.
- Pollock NJ, Mirra SS, Binder LI, Hansen LA, Wood JG (1986) Filamentous aggregates in Pick's disease, progressive supranuclear palsy, and Alzheimer's disease share antigenic determinants with microtubule-associated protein, tau. *Lancet* 2:1211.
- Ponte P, Gonzalez-DeWhitt P, Schilling J, Miller J, Hsu D, Greenberg B, Davis K, Wallace W, Lieberburg I, Fuller F (1988) A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* 331:525-527.
- Prasher VP, Farrer MJ, Kessler AM, Fisher EM, West RJ, Barber PC, Butler AC (1998) Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. *Ann Neurol* 43:380-383.

- Pschyrembel (2002) Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 259.Auflage. Berlin, New York: Walter de Gruyter.
- Ribe EM, Perez M, Puig B, Gich I, Lim F, Cuadrado M, Sesma T, Catena S, Sanchez B, Nieto M, Gomez-Ramos P, Moran MA, Cabodevilla F, Samaranch L, Ortiz L, Perez A, Ferrer I, Avila J, Gomez-Isla T (2005) Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice. *Neurobiol Dis* 23:23.
- Roberts GW, Allsop D, Bruton C (1990) The occult aftermath of boxing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53:373-378.
- Roberts GW, Gentleman SM, Lynch A, Murray L, Landon M, Graham DI (1994) Beta amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57:419-425.
- Robinson D, Friedman L, Marcus R, Tinklenberg J, Yesavage J (1994) Estrogen replacement therapy and memory in older women. *J Am Geriatr Soc* 42:919-922.
- Rogaeva E (2002) The solved and unsolved mysteries of the genetics of early-onset Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 2:1-10.
- Rosen GD, Harry JD (1990) Brain volume estimation from serial section measurements: a comparison of methodologies. *J Neurosci Methods* 35:115-124.
- Sagara Y, Dargusch R, Klier FG, Schubert D, Behl C (1996) Increased antioxidant enzyme activity in amyloid beta protein-resistant cells. *J Neurosci* 16:497-505.
- Saido TC (1998) Alzheimer's disease as proteolytic disorders: anabolism and catabolism of beta-amyloid. *Neurobiol Aging* 19:S69-75.
- Samuel W, Masliah E, Hill LR, Butters N, Terry R (1994) Hippocampal connectivity and Alzheimer's dementia: effects of synapse loss and tangle frequency in a two-component model. *Neurology* 44:2081-2088.
- Saunders AM, Schmechel K, Breitner JC, Benson MD, Brown WT, Goldfarb L, Goldgaber D, Manwaring MG, Szymanski MH, McCown N, et al. (1993a) Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet* 342:710-711.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al. (1993b) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43:1467-1472.

- Scheff SW, Sparks DL, Price DA (1996) Quantitative assessment of synaptic density in the outer molecular layer of the hippocampal dentate gyrus in Alzheimer's disease. *Dementia* 7:226-232.
- Schmitz C, Hof PR (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 130:813-831.
- Schmitz C, Rutten BP, Pielen A, Schafer S, Wirths O, Tremp G, Czech C, Blanchard V, Multhaup G, Rezaie P, Korr H, Steinbusch HW, Pradier L, Bayer TA (2004) Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 164:1495-1502.
- Scholz W (1938) Studien zur Pathologie der Hirngefäße; die druzige Entartung der Hirnarterien und Capillaren (Eine Form seniler Gefäßerkrankung). *Neurol Psychiatry* 162:694-715.
- Sheng JG, Bora SH, Xu G, Borchelt DR, Price DL, Koliatsos VE (2003) Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APP^{swe} transgenic mice. *Neurobiol Dis* 14:133-145.
- Sherwin BB (2003) Estrogen and cognitive functioning in women. *Endocr Rev* 24:133-151.
- Short RA, Bowen RL, O'Brien PC, Graff-Radford NR (2001) Elevated gonadotropin levels in patients with Alzheimer disease. *Mayo Clin Proc* 76:906-909.
- Shumaker SA, Legault C, Rapp SR, Thal L, Wallace RB, Ockene JK, Hendrix SL, Jones BN, 3rd, Assaf AR, Jackson RD, Kotchen JM, Wassertheil-Smoller S, Wactawski-Wende J (2003) Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *Jama* 289:2651-2662.
- Sisodia SS, Price DL (1995) Role of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Faseb J* 9:366-370.
- Sisodia SS, St George-Hyslop PH (2002) gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci* 3:281-290.
- Smith JD, Levin-Allerhand JA (2003) Potential use of estrogen-like drugs for the prevention of Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 20:277-281.
- Sohrabji F, Miranda RC, Toran-Allerand CD (1994) Estrogen differentially regulates estrogen and nerve growth factor receptor mRNAs in adult sensory neurons. *J Neurosci* 14:459-471.
- St George-Hyslop PH (2000) Piecing together Alzheimer's. *Sci Am* 283:76-83.

- Storey E, Cappai R (1999) The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the Abeta peptide. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25:81-97.
- Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M (2000) Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. *Ann N Y Acad Sci* 920:134-139.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Jr., Eckman C, Golde TE, Younkin SG (1994) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264:1336-1340.
- Takahashi RH, Milner TA, Li F, Nam EE, Edgar MA, Yamaguchi H, Beal MF, Xu H, Greengard P, Gouras GK (2002) Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am J Pathol* 161:1869-1879.
- Tandon A, Fraser P (2002) The presenilins. *Genome Biol* 3:reviews3014. Epub 2002 Oct 3023.
- Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R (1996) Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 348:429-432.
- Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL (1987) Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235:880-884.
- Terry RD (1963) The Fine Structure of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 22:629-642.
- Terry RD, Gonatas NK, Weiss M (1964) Ultrastructural Studies in Alzheimer's Presenile Dementia. *Am J Pathol* 44:269-297.
- Terry RD, Hansen LA, DeTeresa R, Davies P, Tobias H, Katzman R (1987) Senile dementia of the Alzheimer type without neocortical neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol* 46:262-268.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572-580.
- Tokuda T, Fukushima T, Ikeda S, Sekijima Y, Shoji S, Yanagisawa N, Tamaoka A (1997) Plasma levels of amyloid beta proteins Abeta1-40 and Abeta1-42(43) are elevated in Down's syndrome. *Ann Neurol* 41:271-273.

- Urbanc B, Cruz L, Le R, Sanders J, Ashe KH, Duff K, Stanley HE, Irizarry MC, Hyman BT (2002) Neurotoxic effects of thioflavin S-positive amyloid deposits in transgenic mice and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13990-13995. Epub 2002 Oct 13999.
- Van de Berg WD, Schmitz C, Steinbusch HW, Blanco CE (2002) Perinatal asphyxia induced neuronal loss by apoptosis in the neonatal rat striatum: a combined TUNEL and stereological study. *Exp Neurol* 174:29-36.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735-741.
- Vogels OJ, Broere CA, ter Laak HJ, ten Donkelaar HJ, Nieuwenhuys R, Schulte BP (1990) Cell loss and shrinkage in the nucleus basalis Meynert complex in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 11:3-13.
- Wang J, Tanila H, Puolivali J, Kadish I, van Groen T (2003) Gender differences in the amount and deposition of amyloidbeta in APPswe and PS1 double transgenic mice. *Neurobiol Dis* 14:318-327.
- Wang PN, Liao SQ, Liu RS, Liu CY, Chao HT, Lu SR, Yu HY, Wang SJ, Liu HC (2000) Effects of estrogen on cognition, mood, and cerebral blood flow in AD: a controlled study. *Neurology* 54:2061-2066.
- Webber KM, Bowen R, Casadesus G, Perry G, Atwood CS, Smith MA (2004) Gonadotropins and Alzheimer's disease: the link between estrogen replacement therapy and neuroprotection. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 64:113-118.
- Weiler R, Lassmann H, Fischer P, Jellinger K, Winkler H (1990) A high ratio of chromogranin A to synaptin/synaptophysin is a common feature of brains in Alzheimer and Pick disease. *FEBS Lett* 263:337-339.
- Wertkin AM, Turner RS, Pleasure SJ, Golde TE, Younkin SG, Trojanowski JQ, Lee VM (1993) Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9513-9517.
- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215:1237-1239.

- Wilson CA, Doms RW, Zheng H, Lee VM (2002) Presenilins are not required for A beta 42 production in the early secretory pathway. *Nat Neurosci* 5:849-855.
- Wirhth O, Multhaup G, Bayer TA (2004) A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide--the first step of a fatal cascade. *J Neurochem* 91:513-520.
- Wirhth O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Moussaoui S, Tremp G, Pradier L, Beyreuther K, Bayer TA (2001) Intraneuronal A beta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett* 306:116-120.
- Wirhth O, Multhaup G, Czech C, Feldmann N, Blanchard V, Tremp G, Beyreuther K, Pradier L, Bayer TA (2002) Intraneuronal APP/A beta trafficking and plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenic mice. *Brain Pathol* 12:275-286.
- Yaffe K, Sawaya G, Lieberburg I, Grady D (1998) Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *Jama* 279:688-695.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250:279-282.
- Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y (1990) Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 87:257-263.
- Zaman Z, Roche S, Fielden P, Frost PG, Niriella DC, Cayley AC (1992) Plasma concentrations of vitamins A and E and carotenoids in Alzheimer's disease. *Age Ageing* 21:91-94.
- Zhang Y, McLaughlin R, Goodyer C, LeBlanc A (2002) Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide 1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J Cell Biol* 156:519-529. Epub 2002 Jan 2028.

Internet-Referenzen:

www.alzheimer.de

www.demenztechnik.de

6. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas A. Bayer für das spontane Anbieten einer Dissertationsarbeit in seiner Arbeitsgruppe, für die interessante Themenstellung und für seine engagierte Unterstützung. Ich habe es sehr geschätzt, dass ich mich jederzeit mit Fragen an ihn wenden konnte.

Auch Frau Dr. Stephanie Schäfer gilt mein herzlicher Dank. Sie hat mich an das selbständige wissenschaftliche Arbeiten herangeführt und mir immer hilfsbereit zur Seite gestanden. Ich möchte ihr für ihre Unterstützung sowohl während des experimentellen als auch des schriftlichen Teils der Arbeit meinen Dank aussprechen und ihr für ihre zukünftigen Projekte viel Erfolg wünschen.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die freundliche Aufnahme, die jederzeit spürbare Hilfsbereitschaft und überaus angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Vielen herzlichen Dank an Dr. Oliver Wirths, Henning Breyhan, Dr. med. Eleni Parlapani, Katrin Rubly, Karl-Heinz Hoffman und nicht zuletzt auch an unsere „Laborhündin“ Loukumina, die immer wieder dafür sorgte, dass es nie langweilig wurde.

Ich möchte mich bei Herrn PD Dr. Christoph Schmitz und Frau Imke van Kooten für ihre Hilfe und Unterstützung an der Universiteit Maastricht bedanken.

Besonders danke ich meiner Familie für ihren Beistand und ihre Zuversicht, meinen Freunden für die aufmunternden Gespräche und Uli für seine unermüdliche moralische Unterstützung.

Erst durch all diese Menschen wurde diese Arbeit möglich.

7. Curriculum Vitae

Name: Ulrike Maria Schuler
Geburtstag und -ort: 06.05.1981, Püttlingen

Schulbildung:

08/1987 – 06/2000 Schulische Laufbahn,
Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife am Realgymnasium
Völklingen (Saarland)

Studium:

Seit Oktober 2000: Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes,
Homburg

September 2002	Ärztliche Vorprüfung
September 2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2006	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit April 2006	Praktisches Jahr

Promotion:

Seit 02/2005 Promotion zum Doctor medicinae (Dr. med.) im
Neurobiologischen Labor der Unikliniken des Saarlandes
unter der Leitung von Prof. Dr. T. A. Bayer

Auslandsaufenthalt:

05/2005 Universiteit Maastricht (Niederlande),
Erlernen des Stereologie-Programms „Stereo Investigator“