

**Aus dem Institut für Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin**

DISSERTATION

**Filipin-Darstellung des
Cholesterins der
Tangle-tragenden Neurone in Gehirnen
von Patienten mit Alzheimer- und
Niemann-Pick-Typ C-Krankheit**

**Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)
vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin**

von

Roland Distl

aus

Kandel

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Thomas G. Ohm
2. Prof. Dr. med. Klaus Harzer
3. Prof. Dr. med. Andreas von Deimling

Datum der Promotion: **15. September 2003**

Teile der vorliegenden Dissertation wurden auf Postern präsentiert auf:

dem FENS (Forum of European Neuroscience)-Meeting Juni 2000 in Brighton/Großbritannien (Nr. 187.01),

der 17. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft September 2000 in Würzburg (Nr. 36) und

dem 30th Annual Meeting der Society for Neuroscience November 2000 in New Orleans/Louisiana (Nr. 577.11),

und in folgenden Artikeln publiziert:

Distl, Roland; Meske, Volker; Ohm, Thomas G. (2001): Tangle-bearing neurons contain more free cholesterol than adjacent tangle-free neurons, *Acta Neuropathol.* 101: 547-554,

Distl, Roland; Treiber-Held, Stephanie; Albert, Frank; Meske, Volker; Harzer, Klaus; Ohm, Thomas G. (2003): Cholesterol storage and tau pathology in the brain in Niemann-Pick type C disease, *J. Pathol.* 200: 104-111,

Treiber-Held, Stephanie; Distl, Roland; Meske, Volker; Albert, Frank; Ohm, Thomas G. (2003): Spatial and temporal distribution of intracellular free cholesterol in brains of Niemann-Pick type C mouse model showing hyperphosphorylated tau protein. Implications for Alzheimer's disease, *J. Pathol.* 200: 95-103.

Abstract

M. Niemann-Pick Typ C (NPC) ist eine juvenile Demenz mit intrazellulärer Anreicherung von freiem Cholesterin, M. Alzheimer (AD) eine senile Demenz, die mit einem Polymorphismus im Gen des Cholesterintransportproteins Apolipoprotein E (ApoE) assoziiert ist. Bei beiden Erkrankungen treten im Gehirn zahlreiche neurofibrilläre Tangles (NFT), bestehend aus Protein Tau, auf. Es sollte mit einer für freies Cholesterin spezifischen Filipin-Färbung herausgefunden werden, ob sich bei beiden Erkrankungen der Cholesteringehalt Tangle-tragender Neurone von dem Tangle-freier unterscheidet. Zur Verfügung standen diverse Teile aus dem Zentralen Nervensystem von 5 NPC- und Gyri temporales superficiales von 9 AD-Fällen. In Material von 3 NPC-Fällen und 1 AD-Fall fanden sich intraneuronale, mit Tangles assoziierte Cholesterinakkumulationen. In 3 AD-Fällen fanden sich außerdem Cholesterinakkumulationen in Assoziation mit Senilen Plaques. Der Cholesteringehalt Tangle-tragender Neurone war in 6 Regionen der NPC-Fälle und in 3 AD-Fällen erhöht. Für alle Neuronenpaare der AD-Fälle insgesamt ergab sich ein erhöhter Cholesteringehalt des Tangle-tragenden Neurons. Cholesterinspeicherung im NPC-Hirn könnte über oxidativen Stress oder eine Veränderung der cholesterinabhängigen Signaltransduktion zur Tangle-Bildung führen. Argumente für die Unterstützung der Tangle-Bildung durch Cholesterin über oxidativen Stress und veränderte Signaltransduktion in AD werden angeführt. Diese Untersuchung erlaubt, neue Hypothesen zu gemeinsamen Mechanismen der Tangle-Entstehung in AD und NPC zu formulieren.

Niemann-Pick Typ C – Alzheimer – neurofibrilläre Tangles - Cholesterin - Filipin

Abstract

Niemann-Pick type C disease (NPC) is a juvenile dementia with intracellular accumulation of free cholesterol, whereas Alzheimer's disease (AD) is a senile dementia associated with a gene polymorphism of a cholesterol transport protein, apolipoprotein E (apoE). In both conditions, there are abundant neurofibrillary tangles (NFT) in brain, consisting of protein tau. This study addresses the issue whether cholesterol content of tangle-bearing neurons is the same compared to tangle-free neurons, in both diseases.

For this purpose, staining with the free cholesterol-specific fluorochrome filipin was used. Several CNS tissue specimen of 5 NPC cases and superior temporal gyri of 9 AD cases were available. In 3 NPC cases and 1 AD case, intraneuronal cholesterol accumulations were found associated with neurofibrillary tangles. Furthermore, cholesterol accumulations were found associated with senile plaques in 3 AD cases. Cholesterol content of tangle-bearing neurons was increased in 6 regions of the NPC cases and in 3 AD cases. For all neurons analysed in AD, the tangle-bearing neuron showed more cholesterol than the adjacent tangle-free neuron. Cholesterol storage in NPC brain could lead to neurofibrillary degeneration by enhancing oxidative stress or by altering cholesterol-dependent signal transduction. Cholesterol accumulation in AD neurons could lead to neurofibrillary degeneration by the same mechanisms. This study allows the creation of new hypotheses concerning common mechanisms of neurofibrillary degeneration in both Niemann-Pick type C and Alzheimer's diseases.

Niemann-Pick type C – Alzheimer's – neurofibrillary tangles – cholesterol - filipin

Inhaltsübersicht

1	Einleitung	1
1.1	M. Niemann-Pick Typ C	1
1.2	M. Alzheimer	2
1.3	Neurofibrilläre Degeneration.....	4
1.4	Cholesterin	7
1.5	Filipin.....	9
2	Aufgabenstellung	10
3	Material	11
4	Methoden	13
4.1	Herstellung der Schnitte	13
4.2	Filipin-Färbung	13
4.2.1	Evaluierung	13
4.3	Immunhistochemie	15

4.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	16
4.5	Fotografie	17
4.6	Bildanalyse	18
4.7	Statistik.....	20
5	Ergebnisse	22
5.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	22
5.1.1	M. Niemann-Pick Typ C	22
5.1.2	M. Alzheimer	31
5.2	Fluorometrie (Fluorometrische Bestimmung des Cholesteringehalts Tangle-tragender Neurone).....	34
6	Diskussion	39
6.1	Nachweis der Cholesterinspeicherung im Niemann-Pick Typ C-Hirn.....	39
6.2	Assoziation der Cholesterinspeicherung mit neurofibrillärer Degeneration im Niemann-Pick Typ C-Hirn	40
6.3	Cholesterinanreicherung und neurofibrilläre Tangles in Alzheimer-Neuronen - drei spekulative Mechanismen.....	45
6.4	Assoziation von Cholesterinakkumulationen mit neuritischen Plaques im Alzheimer-Hirn	49
7	Zusammenfassung.....	50
8	Literatur.....	51

Abkürzungsverzeichnis

7KCh	7-Ketocholesterin
24OHCh	24-Hydroxycholesterin
AD	Alzheimer's disease
ApoE	Apolipoprotein E
CA	Cornu ammonis
CCD	charge-coupled device
cdk5	cyclin dependent kinase 5
FFS	freie Fettsäuren
HMGR	β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

NFT	neurofibrillary tangle
NP	neuritic plaque
NPC	Niemann-Pick type C disease
NT	neuropil thread
PHF	paired helical filament
ROS	reactive oxygen species
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SF	straight filament
SP	senile plaque
SREBP	sterol regulatory element-binding protein

1 Einleitung¹

1.1 M. Niemann-Pick Typ C

M. Niemann-Pick Typ C (NPC) ist eine seltene, autosomal-rezessiv vererbte neuroviszerale Speicherkrankheit (**Tab.1**). Die Krankheit beginnt zu 95% der Fälle vor und zu 5% nach dem 15. Lebensjahr (infantile und juvenile bzw. adulte Fälle [103]). In infantilen Fällen steht die viszerale Symptomatik mit Hepatosplenomegalie im Vordergrund [45,103]. Kognitive Defizite und Ataxie sind die ersten Krankheitszeichen der juvenilen Fälle. Für die adulte Verlaufsform ist eine vertikale supranukleäre Blicklähmung charakteristisch. Alle Verlaufsformen der Krankheit sind durch eine progressive Neurodegeneration charakterisiert, die rasch zu Demenz und Tod führt, in adulten Fällen allerdings oft erst nach Jahren [45].

NPC wird ausgelöst durch Mutationen in den Genen *NPC1* [14] (95%) und *HE1* (=NPC2) [78] (5%), die für Proteine mit wesentlichen Funktionen im zellulären Cholesterinstoffwechsel (s. 1.4.) kodieren. NPC1 kontrolliert den Sorting-Mechanismus von Cholesterin in einem späten endosomalen Kompartiment - bei NPC1-Fehlfunktion wird die Weiterleitung endozytierten Cholesterins blockiert [18,58,63]. Vermutlich weil dadurch endozytisiertes Cholesterin verzögert an die Cholesterinsensoren des Endoplasmatischen Retikulums gelangt, kommt es zur Verzögerung homöostatischer Kompensationsmechanismen auf externe Cholesteringabe [18]. Endozytisiertes Cholesterin akkumuliert in der Folge in lysosomenähnlichen Vesikeln [18,63]. Über die genaue Funktion des lysosomalen, ubiquitär auftretenden, Cholesterin bindenden Proteins HE1 ist bisher wenig bekannt, es ist aber möglich, dass es mit dem NPC1-Protein in einem Komplex zusammenarbeitet [78].

Neuropathologisch äußert sich der Speicherungsprozess im NPC-Hirn in ballonierten Perikaryen und geschwollenen Zellfortsätzen [24,42]. Histochemische Färbungen für Ganglioside und neutrale Glykolipide zeigen granuläre Strukturen [24,25], die sich ultrastrukturell als multilamelläre, zytoplasmatische Einschlüsse - 'polymorphous cytoplas-

¹ Im Dissertationstext durchgängig verwendete Abkürzungen:
7KCh - 7-Ketocholesterin, 24OHCh - 24-Hydroxycholesterin, AD - Alzheimer's disease, ApoE - Apolipoprotein E, BSA - bovin Serumalbumin, CA - Cornu ammonis, CCD - charge-coupled device, cdk5 - cyclin dependent kinase 5, CYP46 - cytochrome P450 No. 46, FFS - freie Fettsäuren, HMGR - β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase, MAPK - Mitogen-aktivierte Proteinkinase, NFT - neurofibrillary tangle, NP - neuritic plaque, NPC - Niemann-Pick type C disease, NT - neuropil thread, PHF - paired helical filament, ROS - reactive oxygen species, SCAP - SREBP cleavage-activating protein, SF - straight filament, SP - senile plaque, SREBP - sterol regulatory element-binding protein

mic bodies' - darstellen [24,42]. Es gelang aber bis vor Kurzem nicht, mit histochemischen Methoden eine Anreicherung von Cholesterin im NPC-Hirn nachzuweisen, im Gegensatz zur ausgeprägten Cholesterinspeicherung in Fibroblasten und viszeralem Gewebe. Ebensowenig konnte in Hirnhomogenaten, mit einer Ausnahme [79], eine signifikante Erhöhung von freiem Cholesterin festgestellt werden (Überblick in [102], **Tab.2**).

Neurofibrilläre Tangles (NFT - kurz 'Tangles', s. 1.3.) sind ein gemeinsames neuropathologisches Merkmal von NPC und M. Alzheimer (AD). Immunologisch und ultrastrukturell sind NFT in beiden Erkrankungen nicht zu unterscheiden [3], obwohl sie lichtmikroskopisch morphologische Unterschiede aufweisen - NFT in AD sind eher schlank, flammen- oder haarförmig [89], NFT in NPC eher rundlich, globös [48]. Das Sterbealter der juvenilen und adulten NPC-Fälle, in denen NFT beschrieben wurden [3,48,61,100], liegt zwischen 10 und 62 Jahren. Diese Fälle scheinen durch einen verhältnismäßig langsamen Verlauf der Erkrankung charakterisiert zu sein.

1.2 M. Alzheimer

AD ist eine häufige neurodegenerative Erkrankung des höheren Lebensalters mit Gedächtnis- und anderen kognitiven Defiziten, die zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Aktivitäten des täglichen Lebens führen können (Tab.1). Die Defizite sind wahrscheinlich Folge eines massiven Synapsen- und Zellverlustes [6,68]. Der Anteil von AD an allen Demenzformen liegt zwischen 40 und 50% der Fälle [107, S.40]. Die altersspezifische Inzidenz steigt von 5 pro 1000 Personenjahre für 65-Jährige auf über 30 für 85-Jährige [4,113]. Die Inzidenz ist bei Frauen erhöht [113].

Offensichtlich gibt es für AD keine einheitliche Pathogenese [8]. Als Ursachen für die neuronale Degeneration kommen u.a. mechanische und chemische Noxen und ein neuronales Energiedefizit in Frage: die Inzidenz von AD ist nach Schädel-Hirn-Traumen erhöht [73], die Demenz langjähriger Boxsportler (Dementia pugilistica) liefert ein ähnliches neuropathologisches Bild wie AD [47]; chemische Noxen sind in epidemiologischen Studien sehr schwierig als Risikofaktoren zu identifizieren, jedoch zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Aluminiumkonzentration des Trinkwassers und AD-Inzidenz [22]; Messungen des Glukose- und Sauerstoffumsatzes in einem frühen Entwicklungsstadium der Krankheit lassen auf einen defizitären Energiehaushalt vulnerabler Gehirnregionen schließen [49]. Die lebenslange Addition derartiger Schädigungen könnte zu einer Vor-

schädigung großer, stoffwechselaktiver Neurone führen, die besonders anfällig für AD-assozierte Pathologie sind [84]. Am Ende der Entwicklung steht Zelluntergang v.a. durch Nekrose, aber auch durch Apoptose.

Tab. 1: Gegenüberstellung der Merkmale von M. Niemann-Pick Typ C und M. Alzheimer

Merkmal	NPC	AD¹
Enidemiologie		
Häufigkeit	1:100.000 Lebendgeburten [104]	3-34:1000 Personenjahre [4,113]
Geographie	panethnisch	Prävalenz höher in Industriestaaten
Ätiologie	95%: NPC1 defekt [78] 5%: NPC2 (HE1) defekt [78]	ApoE ε4 [17,88], APP, PS1, PS2 defekt [34]
Klinik	[45]	[107, S. 617-643]
Alter	infantil - juvenil - adult	senil
Psychiatrie	progressive Demenz Wahnsymptome (spät)	progressive Demenz Wahnsymptome (spät) Orientierungsverlust (früh) Persönlichkeitsveränderungen (früh) Störung des Schlaf-Wach-Rhythmus
Neurologie	vertikale supranukleäre Blickparese (v.a. Abwärtsblick) Ataxie, Dysphagie, Dystonie Anfälle	Aphasie, Agnosie, Apraxie, Rigor u.a. Anfälle und Myoklonien (spät)
internistisch	Hepatosplenomegalie	
Neuropathologie	Atrophie [104] Speicherzellen [24,42,104] Verlust von Purkinje-Zellen(u.a.)[104] Demyelinisierung [102] dystrophische Axone [104] Meganeuriten [25,104] NFT,NT [3,48,61,100]	Atrophie [57, S.249-252] lysosomale Dysfunktion [15,16] massiver Zellverlust [68] massiver Synapsenverlust [68] Demyelinisierung (spät) [101] Meganeuriten [68] NFT,NT,NP [11,84,89] SP [89] Störung der Blut-Hirn-Schranke [40]

¹APP=amyloid precursor protein; PS1,2=Präsenilin 1 bzw. 2

Weniger als 5% aller AD-Fälle sind durch Mutationen in den Genen für das amyloid precursor protein (APP) und die Präseniline 1 und 2 bedingt [34]. Bei AD wird in unphysiologisch hohem Maße durch sog. β- und γ-Sekretasen von APP ein 39-43 Aminosäuren langes Peptid, das Aβ-Amyloid, abgespalten. Dieses aggregiert im Neuropil zu sog. Senilen Plaques (SP). Die Präseniline stellen wahrscheinlich Kofaktoren oder Teile der γ-Sekretase dar [26]. Sowohl APP- als auch Präsenilin-Mutationen führen zu einer verstärkten Produktion und Ablagerung von Aβ-Amyloid [34]. Diese Mutationen rechnet man zur „familiären Form“.

Alle anderen Fälle werden als „sporadische Form“ bezeichnet. Neben dem Alter stellt Vorliegen des ε4-Allels des Cholesterin-Transportproteins Apolipoprotein E (ApoE) den zahlenmäßig größten Risikofaktor für AD dar [17,88]. Das Erkrankungsalter wird durch

Besitz des $\epsilon 4$ -Allels bis um 20 Jahre vorverlegt [17]. AD-Fälle mit Vorhandensein des $\epsilon 4$ -Allels weisen eine größere numerische Dichte sowohl von SP als auch von NFT auf [75]. ApoE vermittelt den Transport des für Synapsenaufbau erforderlichen Cholesterins von der perisynaptischen Glia zu wachsenden und regenerierenden Neuronen [70].

ApoE $\epsilon 4$ -Träger haben höhere Serumcholesterinspiegel als Nicht- $\epsilon 4$ -Träger [80]. Einnahme von sog. Statinen, die den Serumcholesterinspiegel senken, scheint vor AD zu schützen [110]. Die Blut-Hirn-Schranke ist bei AD geschädigt [40]. Eine Erhöhung von Cholesterin in AD-Hirnen konnte bisher nur in einer Studie gefunden werden ([97], Tab.2).

Tab. 2: Lipidchemische Befunde in Niemann-Pick Typ C- und Alzheimer-Hirnen

Parameter	Methode ¹	NPC			AD		
		Gewebe	Befund	Ref.	Gewebe	Befund	Ref.
Cholesterin, frei	HPLC	-----	o. A.	-----	g	+	[97]
	HPTLC	w,g	0	[102]	g	0	[23]
	TLC	g	+	[79]	-----	o.A.	-----
Ganglioside	HPTLC	w,g	++	[102]	w,g	-	[101]
Cerebroside	HPTLC	w,g	+	[102]	w	-	[101]

--erniedrigt; 0=unverändert; +=erhöht; ++=stark erhöht

w – weiße Substanz, g - graue Substanz

Ref. - Referenz; o. A. - ohne Angabe

¹HPLC=hochauflösende Flüssigkeitschromatographie; HPTLC=hochauflösende Dünnschichtchromatographie, TLC=Dünnschichtchromatographie

Neuropathologische Hauptcharakteristika von AD sind extrazelluläre Senile Plaques (SP) aus aggregiertem A β -Amyloid und primär intrazelluläre neurofibrilläre Tangles (NFT) aus aggregiertem Protein Tau [89]. Tau-Aggregate in dystrophischen Dendriten im Bereich der SP und in gewundenen Dendriten des Neuropils werden als neuritische Plaques (NP) bzw. als Neuropilfäden ('neuropil threads', NT) bezeichnet [89]. Keine dieser Erscheinungen ist spezifisch für AD, und keine konnte bisher als direkt verantwortlich für Synapsen- und Zellverlusts erkannt werden. Die Anzahl der NFT korreliert jedoch besser mit dem kognitiven Defizit als die Anzahl der SP, allerdings nicht so gut wie der Synapsenverlust [6].

1.3 Neurofibrilläre Degeneration

Im AD-Hirn entwickeln sich SP und NFT bereits Jahre bis Jahrzehnte, bevor klinische Symptome erkennbar sind. Noch ausgeprägter als bei SP folgt die Ausbreitung der NFT

einem eigentümlichen Schema, das Braak und Braak [11] beschrieben und auf klinische Ausprägungen der Demenz bezogen haben: Transentorhinaler und Entorhinaler Kortex zeichnen sich durch ausgesprochene Vulnerabilität für die Tangle-Pathologie aus, sie werden zuerst von NFT befallen (Stadien I und II). In diesen Stadien zeigen sich nie Zeichen einer AD-Demenz. Daraufhin werden mehr und mehr limbische Areale einbezogen, wobei die Zahl der Tangles im medialen Temporallappen weiter zunimmt (Stadien III und IV). Diese Stadien entsprechen beginnender Demenz. Schließlich erfasst die Tangle-Pathologie auch die Assoziations- und zuletzt die Projektionsareale des Isokortex (Stadien V und VI). Diese Stadien entsprechen klinisch manifestem AD.

Elektronenmikroskopisch besteht der NFT überwiegend aus ca. 20nm breiten, aus zwei umeinander gewundenen Einzelfasern zusammengesetzten Filamenten, die alle 80nm eine Einschnürung aufweisen und als 'paired helical filaments' (PHF) bezeichnet werden [66]. Daneben treten auch 'straight filaments' (SF) mit einem Durchmesser von 15nm auf. Chemisch bestehen PHF und SF aus Protein Tau in einem hyperphosphorylierten Zustand [38]. Tau ist ein axonales, 352 bis 441 Aminosäuren langes, sehr lösliches Protein, das praktisch keine konstante Sekundärstruktur aufweist, über die C-terminale Domäne an Mikrotubuli bindet und ihnen Stabilität verleiht [66], indem es als „Schwelle“ für die „Gleise“ der Mikrotubuli fungiert. Es liegt im adulten menschlichen Hirn in sechs Isoformen vor, die durch alternatives Spleißen eines Gens entstehen [35,98]. Wird dabei Exon 10 inseriert, weist die Mikrotubuli-bindende Domäne vier je 18 Aminosäuren lange charakteristische Repeats auf, ansonsten nur drei.

NFT treten bei zahlreichen Erkrankungen und als Begleiterscheinung des normalen Alterungsprozesses [41] auf und können, müssen aber nicht, mit SP vergesellschaftet sein. Krankheitsentitäten mit NFT und SP sind neben AD u. a. das Down-Syndrom [109], Dementia pugilistica [47] und M. Parkinson [107, S. 200], solche nur mit NFT neben NPC bestimmte Prionenkrankheiten (M. Gerstmann-Sträussler-Scheinker und M. Creutzfeldt-Jakob [32]), der vermutlich durch Neurotoxin-Exposition hervorgerufene Parkinson-Demenz-Komplex von Guam [46], das 18q-Syndrom [39] und die durch Blei hervorgerufene Enzephalopathie [109]. Ultrastrukturelle Morphologie und Immunologie der Einschlüsse in den verschiedenen Entitäten unterscheiden sich teilweise erheblich, dies korreliert mit der Expression bestimmter Tau-Isoformen [98].

Tau, das aus PHF isoliert wird (PHF-Tau), weist eine Reihe von Besonderheiten auf: es ist hyperphosphoryliert [35], es bindet nicht an Mikrotubuli [66], es ist unlöslich [59] und

es ist im Gegensatz zur physiologischen axonalen Lokalisation im somatodendritischen Kompartiment zu finden [98]. Phosphorylierung an den Stellen Ser199 und Ser202 ist für PHF-Tau so charakteristisch, dass ihr Nachweis beim Adulten durch den monoklonalen Antikörper AT8 für PHF-Tau fast zu 100% spezifisch ist [10,71]. AT8-Immunreaktivität geht der Aggregation von Tau in PHF voraus [5,10].

Die Sequenz, in der Tau Eigenschaften des PHF-Tau erwirbt, ist letztlich nicht geklärt. Folgender Ablauf wird jedoch auf der Basis von in vitro-Aggregationsexperimenten diskutiert [28] (**Abb.1**):

- (1) Hyperphosphorylierung führt zur Loslösung von Tau von den Mikrotubuli [38];
- (2) Tau reichert sich im somatodendritischen Kompartiment an;
- (3) Tau verändert seine native Sekundärstruktur in einer Weise, dass die Repeat-Regionen zweier Moleküle aneinanderlagern (Konformationsänderung - [106]), dieser Prozess wird in vitro durch freie Fettsäuren (FFS) beschleunigt [108];
- (4) über Zysteinreste der Repeat-Regionen dimerisieren zwei Moleküle kovalent durch Sulfhydrylbrückenbildung, dieser Prozess wird durch ein oxidatives Milieu wesentlich beschleunigt [28];
- (5) 5-7 Dimere lagern sich zu einem Nukleationskeim ('nucleation seed') zusammen, dieser Prozess wird durch Polyanionen wie Heparin, Glykosaminoglykane und Ribonukleinsäure beschleunigt [36];
- (6) relativ rasche Elongation des Filaments durch Anlagerung weiterer Dimere an den Nukleationskeim, durch Anwesenheit von Polyanionen beschleunigt.

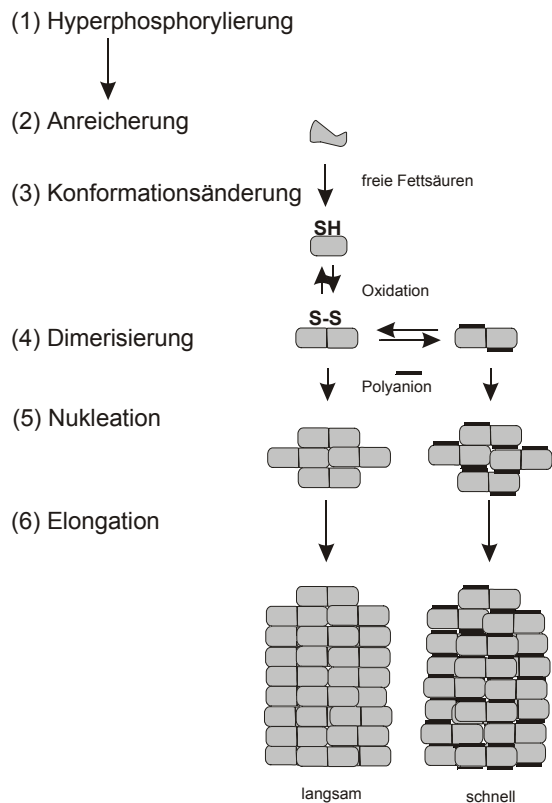


Abb. 1: Hypothetischer Ablauf der Bildung von paired helical filaments aus Tau-Molekülen (modifiziert nach [28])

1.4 Cholesterin

Das gering polare Isoprenoid Cholesterin (engl. cholesterol)² ist in Säugerzellen ein unverzichtbarer Bestandteil von Membranen [20] und Vorstufe für lebenswichtige Steroidhormone und für Gallensäuren [21]. Seitenwege des Cholesterinstoffwechsels führen zu weiteren Isoprenoiden mit wichtigen zellulären Funktionen, wie Dolichol, Ubichinon, Geranylgeranyl- und Farnesylpyrophosphat [12]. Physikalische (Dicke, Fluidität) und biologische Eigenschaften der Membran (Proteinfunktion) werden durch deren Gehalt an Cholesterin entscheidend beeinflusst [20]. Cholesterin- und Sphingolipid-reiche Membrandomänen, sog. Rafts ('Flöße'), tragen zur hoch organisierten Proteinverteilung in der

² Innerhalb der Zelle wird Cholesterin als Ester gespeichert. Nicht verestertes Cholesterin wird auch als „freies Cholesterin“ bezeichnet. In dieser Arbeit ist mit „Cholesterin“ immer „freies Cholesterin“ gemeint.

Plasmamembran bei und beeinflussen wichtige Membranfunktionen wie Substanzaufnahme, -abgabe und Signaltransduktion [96].

Die Leber hält als zentrales Organ des Cholesterinstoffwechsels die Cholesterinplasmaspiegel durch Verwertung von Cholesterin aus der Nahrung, Eigensynthese und Elimination mit der Gallenflüssigkeit weit gehend konstant, so dass die Versorgung extrahepatischen Gewebes mit Cholesterin gewährleistet ist. Der Transport von Cholesterin im Blut erfolgt in Lipoproteinen. Diese sind durch verschiedene Apolipoproteine charakterisiert, die zusammen mit zellulären Lipoproteinrezeptoren Aufnahme und Abgabe zellulären Cholesterins kontrollieren [21].

Nach Aufnahme von Cholesterin durch Endozytose oder auf rezeptorunabhängigem Wege [27] unterliegt Cholesterin, wie andere Bestandteile des Endosoms, einem Sorting-Mechanismus: es wird an die Zelloberfläche zurücktransportiert oder im Zellinnern weiter verarbeitet [27,96]. Im letzteren Fall spalten lysosomale Hydrolasen die Cholesterinester auf, das Cholesterin gelangt direkt oder über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran [96]. Das NPC1-Protein signalisiert die Anwesenheit endozytierten Cholesterins an den zentralen Sensor der zellulären Cholesterinhomöostase im Endoplasmatischen Retikulum [53], vermutlich das Protein sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein (SCAP) [13]. SCAP vermittelt die Proteolyse von sterol regulatory element-binding protein (SREBP), welches im Zellkern u.a. die Transkription des cholesterinsynthetisierenden Enzyms 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMGR) und damit die endogene Cholesterinsynthese unterdrückt. Zusätzlich werden Cholesterinaufnahme und -veresterung gehemmt [96].

Obwohl fast alle extrahepatischen Gewebe ihren Cholesterinbedarf durch Aufnahme aus dem Blut decken, ist der Proteinapparat zur endogenen Cholesterinsynthese offensichtlich in allen Säugerzellen vorhanden [21]. Das im Endoplasmatischen Retikulum synthetisierte Cholesterin gelangt über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran, wo es zusammen mit der gesamten Membran an einem kontinuierlichen Rezyklierungsprozess teilnimmt [27,96]. Wichtige Aspekte der zellulären Cholesterinhomöostase sind weiterhin der Efflux von Cholesterin aus der Zelle [27] und seine Verstoffwechslung zu Oxysterolen [64].

Das adulte Gehirn ist zwar eines der cholesterinreichsten Organe des Säugerkörpers, was v.a. auf seinen Gehalt an Myelinmarkscheiden zurückzuführen ist [51], es nimmt aber am Cholesterinstoffwechsel des restlichen Körpers praktisch nicht teil: es

verstoffwechselt Cholesterin sehr langsam, nimmt es in nur verschwindend geringer Menge aus dem Blut auf und produziert es überwiegend selbst [21]. Der zelluläre Efflux scheint in erster Linie in Form von 24S-Hydroxycholesterin (24OHCh) zu erfolgen [64]. Bildung von 24OHCh aus freiem Cholesterin erfolgt durch die Zytochrom-Oxidase Cholesterin-24-Hydroxylase (CYP46=cytochrome P450 No. 46) im Endoplasmatischen Retikulum [62].

1.5 Filipin

Filipin, eine Mischung aus mindestens vier Einzelsubstanzen, bildet mit Cholesterin einen Komplex mit dem stöchiometrischen Verhältnis 1:1 [93,95]. In Membranen führen Aggregate solcher Filipin-Cholesterin-Komplexe zu Deformationen, die im gefrierbruch-elektronenmikroskopischen Bild als 'pits' und 'protrusions' von 15-25nm Durchmesser in Erscheinung treten. Die Dichte dieser Deformationen wird als Maß für den Cholesterin-gehalt von Membranen angesehen [95]. Filipin hat zwei Absorptionsmaxima bei 338 und 356nm. Es emittiert Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum von 490nm (blau). Durch die Bindung an Cholesterin wird die Intensität der Emission gesenkt [93]. Filipin wird als zytochemisches Fluorochrom zur Lokalisation [9] und Quantifizierung [43,56] von Cholesterin eingesetzt.

2 Aufgabenstellung

Das Vorhandensein neurofibrillärer Tangles (NFT) in M. Niemann-Pick Typ C-Hirngewebe (NPC) - einer Erkrankung mit intrazellulärer Cholesterinakkumulation - und die Assoziation von M. Alzheimer (AD) mit Apolipoprotein E (ApoE), einem Cholesterin-Transportprotein, ließen es möglich erscheinen, dass der neurofibrillären Degeneration in beiden Erkrankungen eine ähnliche Störung im zellulären Cholesterinstoffwechsel zu Grunde liegt.

Mit dem cholesterinspezifischen Fluorochrom Filipin konnte auf ein sensibles Instrument zur histologischen Darstellung und Quantifizierung von Cholesterin zurückgegriffen werden. Andererseits konnten einzelne Neurone durch Immunfärbung mit dem gegen NFT gerichteten Antikörper AT8 als 'Tangle-tragend' von immunonegativen 'Tangle-freien' Neuronen unterschieden werden.

Es lag nahe, eine AT8/Filipin-Doppelfärbung zu etablieren, die eine Bestimmung des Cholesteringehaltes identifizierter Neurone erlaubte, um die Frage zu beantworten, ob sich Tangle-tragende Neurone von vergleichbaren Tangle-freien durch ihren Cholesteringehalt unterscheiden.

Diese Untersuchung sollte für Individuen beider Krankheiten, beiderlei Geschlechts und verschiedener ApoE-Genotypen durchgeführt werden.

3 Material

Hirnmateriale von 5 NPC-Patienten (N1-N5) stammte aus dem Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen (Prof. K. Harzer), das von 9 AD-Patienten (A1-A9) aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut der Universitätsklinik Mainz und dem Institut für Pathologie der Charité.

Das NPC-Materiale war 12-19 Jahre in 10%-igem Formalin gelagert und vor Weiterverarbeitung in 4%-iges Formalin überführt worden. Das AD-Gewebe war 4 Monate bis 7 Jahre in 4%-igem Formalin gelagert worden.

Die makroskopische Lokalisation von Hirnstrukturen wurde durch das Hinzuziehen eines Atlanten (Nieuwenhuys/Voogd/van Huijzen: Das Zentralnervensystem des Menschen, 2. Auflage, Springer, Berlin, 1990, sowie Paxinos, George: The Human Nervous System, San Diego, 1990) erleichtert. Die isokortikale Schichtenzuordnung erfolgte genauso wie die Lokalisation von Strukturen außerhalb des Kortex durch Kresylviolettgefärbte angrenzende Schnitte.

Das vorliegende NPC-Gewebe wurde ganz in die Untersuchung einbezogen. Von den AD-Fällen wurde je ein Quader von ca. 1cm Kantenlänge aus dem Gyrus temporalis superior entnommen.

Lipidchemische Bestimmungen von Milzgewebe, durchgeführt durch Prof. Harzer, bestätigten die Diagnose von N1-N4.

Für N1 lag ein neuropathologischer Befund vor. Demnach fanden sich in Leber und Milz Schaumzellen. Reaktionen für Sulfatide und Ganglioside waren negativ, während die für neutrale Lipide leicht positiv waren. Ballonierte Neurone wurden in Großhirnkortex, Kleinhirn, Hinter- und Vorderhorn des Rückenmarks, Nebennierenmark und vegetativem Nervensystem gefunden. Im Gehirn imponierten moderate Gliose und progressive neuroaxonale Degeneration.

Für N2 lag ein klinischer Befund vor. Demnach fielen ataktische, choreatiforme Bewegungen und eine Dyskinesie der Zunge auf. Der Patient hatte eine Hepatosplenomegalie mit Leukopenie. Neben ausgeprägten Gedächtnisstörungen wurden Poromanie (pathologisches Davonlaufen), psychomotorische Agitation und chronischer Alkoholismus berichtet.

A6 und A7 waren intra vitam als AD diagnostiziert worden, A8 als vaskuläre Demenz, A8 und A5 als Hirnorganisches Psychosyndrom, A9 als Hirninfarkt, A3 als Depression, A2 als M. Parkinson. Bei A7 lagen Lewy-Körperchen vor.

Atherosklerose lag bei A2, A5, A7 und A8 vor, Cholelithiasis bei A2. Serum-Cholesterinspiegel lagen innerhalb der Norm. Lipidsenkende Medikamente waren in keinem Fall angesetzt.

Für Fälle A1, A4 und N3-N5 lagen keine weiteren Angaben vor.

Charakteristische Merkmale des verwendeten Materials sind in **Tab.3** zusammengefasst.

Tab. 3: In die Studie einbezogenes Gewebsmaterial

Fall	Autolyse ¹	Lagerung ²	Lokalisation ³	Geschlecht	Alter ⁴	Braak ⁵	ApoE ⁶
A1	22	4	Gts li	m	85	V	4/3
A2	20	3	Gts li	f	86	IV/V	3/3
A3	35	4	Gts li	f	74	IV	4/2
A4	52	0,25	Gts li	f	87	V	3/3
A5	28	3	Gts li	m	83	IV/V	4/2
A6	30	7	Gts li	f	79	V	4/3
A7	16	7	Gts li	f	87	IV/V	o. A.
A8	42	3	Gts li	f	86	IV/V	3/3
A9	30	4	Gts li	m	71	V	3/3
N1	24	13	div. Hirnteile	m	18	-----	o. A.
N2	o. A.	12	div. Hirnteile	m	31	-----	o. A.
N3	o. A.	19	C	f	14	-----	o. A.
N4	o. A.	17	Rm	f	22	-----	o. A.
N5	o. A.	16	Pons, Hc, C	m	40	-----	o. A.

o. A.=ohne Angabe

¹Autolysezeit in Stunden; ²Lagerungszeit in Jahren

³Gts li=Gyrus temporalis superior links, C=Isokortex unbekannter Lokalisation,

Rm=Rückenmark, Hc=Hippokampus

⁴zum Todeszeitpunkt in Jahren

⁵Stadien der Ausbreitung neurofibrillärer Läsionen nach Braak und Braak [101]; ⁶ApoE-Genotyp

4 Methoden

4.1 Herstellung der Schnitte

Das in 4%-igem Formalin fixierte Material wurde zu Gewebsblöcken (ca. 1x1x0,5cm) zurechtgeschnitten. Mit einem Vibratom wurden 40µm dicke Schnitte hergestellt.

4.2 Filipin-Färbung

Die Schnitte wurden 1h frei flottierend auf dem Schüttler bei Raumtemperatur im Dunkeln in 0,2M Phosphatpuffer pH7,4 (PB) ausgewaschen, 3h mit 50µg/ml des cholesterinspezifischen Fluorochroms Filipin (Filipin-Komplex von Sigma, Taufkirchen) gefärbt und 1h ausgewaschen.

Optimale Konzentration und Färbedauer wurden in Vorversuchen bestimmt. Außerdem wurde die Spezifität der Färbung für freies Cholesterin nachgewiesen und an einem Modellsystem gezeigt, dass Filipin-Fluoreszenz und Cholesterinkonzentration in einem linearen Verhältnis stehen.

4.2.1 Evaluierung

Zeitkinetik: Schnitte wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten aus 50µg/ml Filipin genommen und 1h ausgewaschen. Das mikroskopische Bild wurde analysiert. Die Auftragung der Fluoreszenzwerte gegen die Zeit ergab eine hyperbole Sättigungskurve (**Abb.3**). Diese veranschaulicht, dass die Filipin-Bindungsstellen bereits nach 2h weitgehend abgesättigt sind und nach 3h mit keiner weiteren Steigerung der Färbeintensität zu rechnen ist.

Spezifität: Einige Schnitte wurden mit 0,5u/ml Cholesterin-Oxidase von Nocardia sp. (Merck, Darmstadt), die freies Cholesterin spezifisch umsetzt [91], 1h inkubiert. Dann wurden sie zusammen mit unbehandelten Schnitten für 3h mit 50µg/ml Filipin gefärbt. Die mit Cholesterin-Oxidase vorbehandelten Schnitte blichen innerhalb von ca. 1s aus, wenn sie mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 360nm (Anregungsfrequenz von Filipin) bestrahlt wurden. Zurück blieb das Fluoreszenzbild eines ungefärbten Schnittes. Nicht vorbehandelte Schnitte bewahrten hingegen die Filipin-Fluoreszenz

über Wochen ohne Beeinträchtigung. Dies bedeutet, dass die Filipin-Färbung für freies Cholesterin spezifisch ist, wie bereits andernorts gezeigt wurde [9].

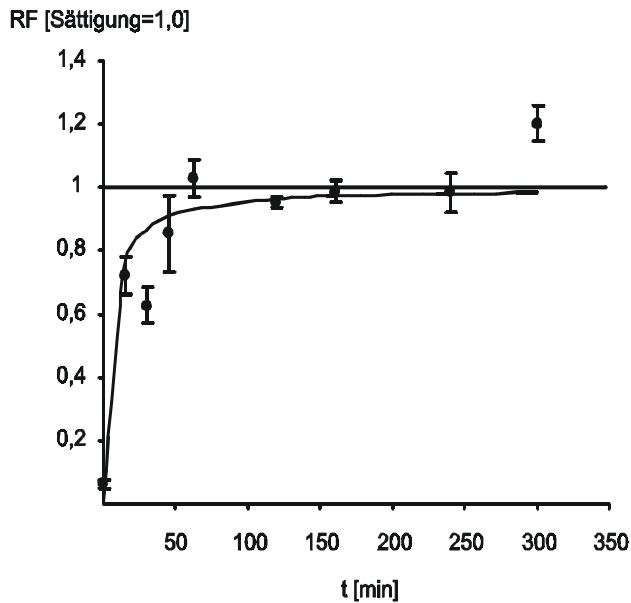


Abb. 2: Zeitkinetik der Filipin-Färbung, Ausgleichskurve: $RF(t)=0.22t/(0.22t+1)$

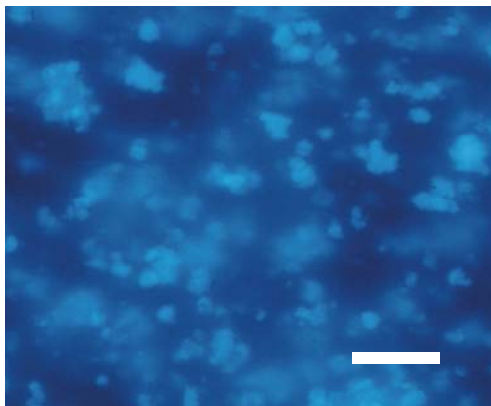


Abb. 3: Filipin-gefärbte, in Gelatine verfestigte Cholesterinmizellen-suspension, Balken entspr. 10µm, x400

Abhängigkeit der Filipin-Fluoreszenz von der Cholesterinkonzentration: Ein geeignetes Modell wurde durch Verfestigung von Cholesterinmizellensuspensionen geschaffen: Hierzu wurde eine alkoholische Lösung aus 1 Gewichtsteil Tristearin, 3 Teilen Phosphatidylcholin und 1 Teil Cholesterin (alle Sigma) in warmen PB eingespritzt. Durch Einspritzen unterschiedlicher Mengen der Lösung konnte die Cholesterinkonzentration der Suspensionen variiert werden. Anschließend wurden die Suspensionen in eine warme Gelatinelösung eingerührt (Endkonzentration 20% Gelatine). Die verfestigte Masse wurde mit einem Vibratom in 40µm-Abständen geschnitten. Diese Modellschnitte wur-

den mit 50µg/ml Filipin gefärbt und anschließend 1h ausgewaschen. Bei einer Stöchiometrie der Filipin-Cholesterin-Bindung von 1:1 [93] war damit Filipin im Überschuss vorhanden. Das mikroskopische Bild wurde analysiert. **Abb.4** zeigt das fluoreszenzmikroskopische Bild: Fluoreszierende runde Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 2µm sind sichtbar. Es ergab sich eine lineare Beziehung zwischen Cholesterinkonzentration und Filipin-Fluoreszenz.

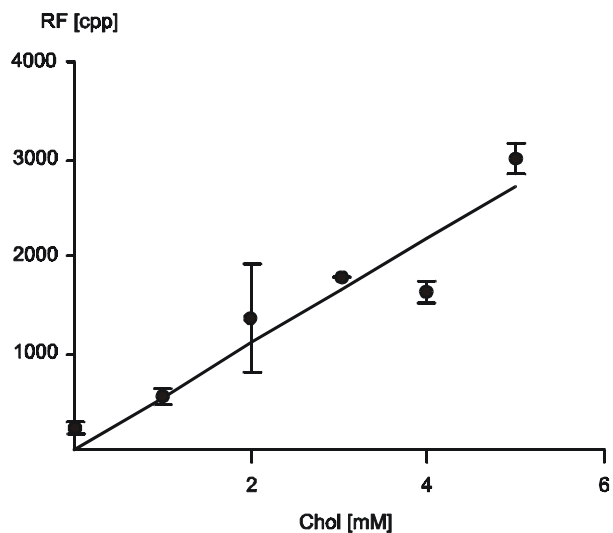


Abb. 4: Abhängigkeit der Filipin-Fluoreszenz von der Cholesterinkonzentration einer verfestigten Mizelensuspension, RF=relative Fluoreszenz, cpp=counts per pixel, Chol=Cholesterin, Ausgleichsgerade: $RF(Chol)=510 \cdot Chol$

Dies bedeutet, dass die Filipin-Fluoreszenz im untersuchten Bereich der Cholesterinkonzentration proportional ist und damit von einem Fluoreszenzwert auf einen Cholesterinkonzentrationswert geschlossen werden kann.

4.3 Immunhistochemie

Nach Filipin-Färbung wurden die Schnitte 1h in 1,5%-igem bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma) blockiert, über Nacht mit 1:1000 (in BSA) monoklonalem Maus-AT8-Antikörper [71] (NBS Biologicals, Huntingdon, Großbritannien) inkubiert, am Folgetag 1h ausgewaschen, 2h mit 1:200 (in BSA) sekundärem Antikörper inkubiert und 1h ausgewaschen. Als sekundäre Antikörper dienten Alexa-594- oder Alexa-488-konjugierte Schaf-Anti-Maus-Antikörper (beide von Molecular Probes, Leiden, Niederlande).

Die Ausprägung des Auftretens der durch die Immunzytochemie detektierten Strukturen NFT, NT bzw. NP (s. 1.3.) wurde subjektiv durch Einteilung in 5 Grade abgeschätzt:

0	keine NFT/NT/NP
+	1-2 NFT/NT/NP pro Schnitt
++	wenige NFT/NT/NP
+++	zahlreiche NFT/NT/NP
++++	massenhaftes Auftreten

Gewebe mit bekanntem massenhaftem Auftreten neurofibrillärer Degeneration zeigte zahlreiche immunopositive Strukturen (Positivkontrolle). Nur mit sekundärem Antikörper behandelte Schnitte zeigten hingegen keine immunopositiven Strukturen (Negativkontrolle).

4.4 Fluoreszenzmikroskopie

Als für die Fluoreszenzmikroskopie geeignetes Eindeckmedium wurde Vectashield (Vector, Burlingame, Kalifornien) verwendet. Als Lichtquelle diente eine Xenon-Kurzbogenlampe (Ushio, Tokio, Japan). Ein zwischengeschalteter, softwaregestützter Monochromator (Till Photonics, Planegg) ermöglichte die Verwendung monochromatischen Lichtes. Das Fluoreszenzbild der Schnitte wurde durch ein invertiertes, für ultraviolette Licht geeignetes Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX 70) betrachtet. Filipin wurde mit 360nm angeregt und durch Filter MBA510 betrachtet, die Wellenlängen und Filter für Alexa-488 bzw. Alexa-594 waren 480nm und Filter BA550 bzw. 560nm und Filter BA590.

Für Fotografien wurde wegen des intensiveren Signals Alexa-488-konjugierter sekundärer Antikörper verwendet. Für Filipin-Fluoreszenzmessungen wurden die Schnitte hingegen mit dem weniger intensiven Alexa-594-konjugierten Antikörper behandelt, da die für Filipin verwendete Anregungsfrequenz von 360nm Alexa-488 geringfügig angeregt [82], was zu falsch-hohen Filipin-Fluoreszenzwerten immunopositiver Strukturen führt.

Einschätzung von Störfaktoren bei der Auswertung der Filipin-Fluoreszenz: Da bekannt ist, dass autofluoreszierende Granula in Tangle-tragenden (hier immunopositiven) Neu-

ronen häufiger vorkommen [99], musste der Beitrag der Autofluoreszenz zur Gesamtfluoreszenz bei Anregung mit 360nm abgeschätzt werden. Ebenso musste der Beitrag des sekundären Antikörpers abgeschätzt werden (s.o.). Hierzu wurde das immunhistochemische Färbeverfahren ohne Filipin-Färbung durchgeführt. Das mikroskopische Bild wurde bei 360nm Anregung/Filter MBA510/50ms Anregungszeit analysiert. Die Schnitte zeigten ein schwarzes Bild ohne immunopositive oder autofluoreszierende Strukturen (**Abb.5, links**). Unter Verwendung der Anregungsfrequenz des sekundären Antikörpers (560nm/BA590/200ms) waren hingegen sowohl immunopositive als auch autofluoreszierende Strukturen zu sehen (**Abb.5, rechts**, selbe Stelle wie links). Dieser Versuch verdeutlicht, dass unter den Bedingungen der Messung der Filipin-Fluoreszenz (Anregungsfrequenz, Filter, Anregungszeit) Autofluoreszenz des Gewebes und Fluoreszenz des sekundären Antikörpers einen zu vernachlässigenden Beitrag zur Gesamtfluoreszenz leisten.

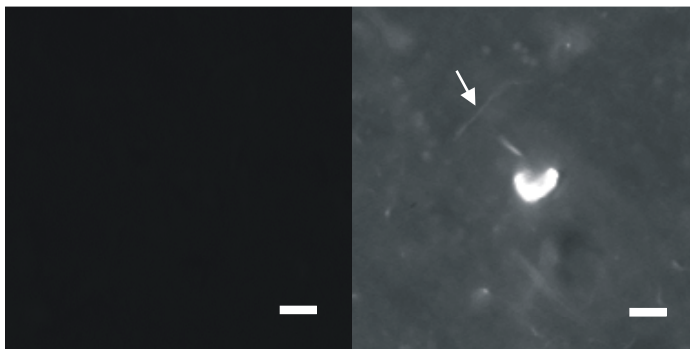


Abb. 5: *links:* Immunhistochemie ohne Filipin-Färbung, Analysebedingungen der Filipin-Fluoreszenzmessung; *rechts:* selbe Stelle unter anderen Bedingungen: es zeigen sich zentral ein Tangle und die Autofluoreszenz von Gefäßen (Pfeil); Balken entspr. 10µm; x400

4.5 Fotografie

Es wurden eine Kamera Om-4 Ti (Olympus) und der Film Elite Color 400 (Kodak) verwendet. Für Fluoreszenzmessungen wurden digitale Aufnahmen mit einer an das Mikroskop angeschlossenen charge-coupled device(CCD)-Kamera angefertigt. Steuerung

dieser Kamera, des Monochromators und Bildanalyse erfolgten durch das Fluorometrie-Programm Fucal 5.12 C (Till Photonics). Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit 40ms Anregungs- (und damit Belichtungs-)zeit für Filipin und bis zu 200ms für die sekundären Antikörper. Die Bilder wiesen Intensitäten im linearen Messbereich der CCD-Kamera auf.

4.6 Bildanalyse

Zur Fluoreszenzmessung einzelner Neurone wurden der Gyrus temporalis superior aller AD-Fälle herangezogen und diejenigen Regionen der NPC-Fälle, die eine für die Analyse ausreichende numerische Dichte an NFT aufwiesen.

Fluorometrische Bestimmung des Cholesteringehalts Tangle-tragender Neurone: Von immunopositiven Neuronen wurden Bilder sowohl mit 480nm (**Abb.6a**) als auch mit 360nm Anregung (**Abb.6b**) aufgenommen. Es wurden Skizzen der Filipin-Bilder angefertigt, auf denen jene Strukturen eingetragen wurden, die als Pyramidenzellen zu identifizieren waren. Als Kriterien für Pyramidenzellen galten: Größe (über 10µm breitester Durchmesser in der Aufnahmeebene), Form (pyramidenförmig), Orientierung (Längsachse senkrecht zur Kortexoberfläche) und Lokalisation (L. III und V). Im Anschluss an die Anfertigung der Skizzen wurden die korrespondierenden Immunfluoreszenzbilder betrachtet und drei Skizzenstrukturen markiert (**Abb.6c**):

1. das immunopositive Neuron 'T+',
2. das nächst liegende immunonegative Neuron 'T1-' und
3. das T1- nächst liegende immunonegative Neuron 'T2-'.

T+ wird im Folgenden auch als 'Tangle-tragendes Neuron', T1- und T2- werden als 'Tangle-freie Neurone' bezeichnet. Das Zentrum der Aufnahme lag jeweils in der Mitte zwischen diesen 3 Zellen, so dass keine Zelle durch eine zentralere Lage im Beleuchtungskegel systematisch eine höhere Intensität haben konnte.

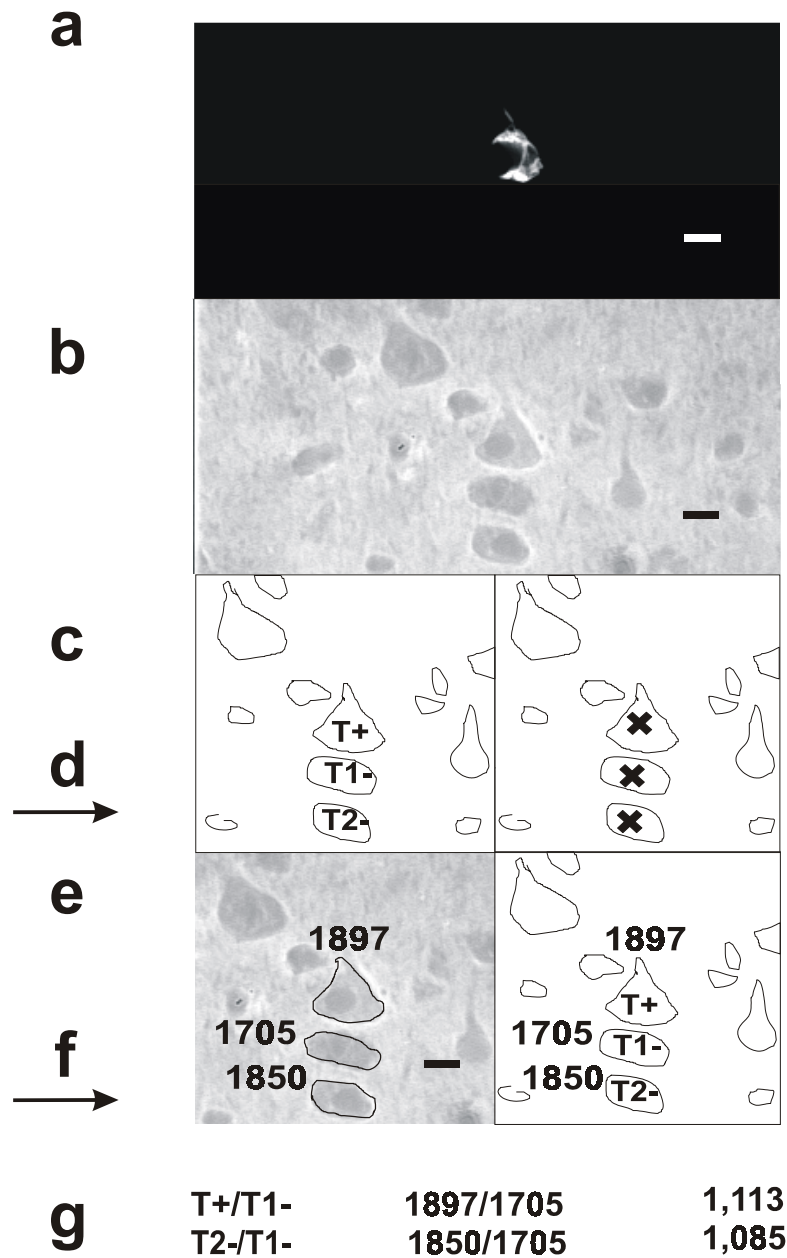


Abb. 6: Fluoreszenzmessung der Cholesterinkonzentration Tangle-tragender Neurone: **a** Immunofluoreszenzbild, **b** Filipin-Bild, **c** Identifizierung der Perikaryen, **d** Blindmarkierung der zu vermessenden Perikaryen, **e** Messung, **f** Rückidentifizierung, **g** Bestimmung der Verhältniszahlen, Balken entspr. 10µm, x400

Es kamen nur Zellen zur Analyse, die in ihrer Querschnittsfläche nicht mehr als +/-50% voneinander abwichen. Da kleinere Neurone wegen Einstrahlens von Fluoreszenz aus dem Neuropil generell höhere Fluoreszenzwerte haben konnten, wurde für eine Zufallsstichprobe von Neuronen die Schnittfläche bestimmt, Tangle-tragende (T+) und Tangle-freie (T-) Neurone wurden miteinander verglichen. T+ und T- einer Stichprobe mit 239 Zellpaaren unterschieden sich nicht signifikant in der Schnittfläche (**Abb.7**). Mediane±Medianabweichungen (s. Statistik 4.7.) sind für T+ 1375 p²(Quadratpixel)±566 und für T- 1371±551.

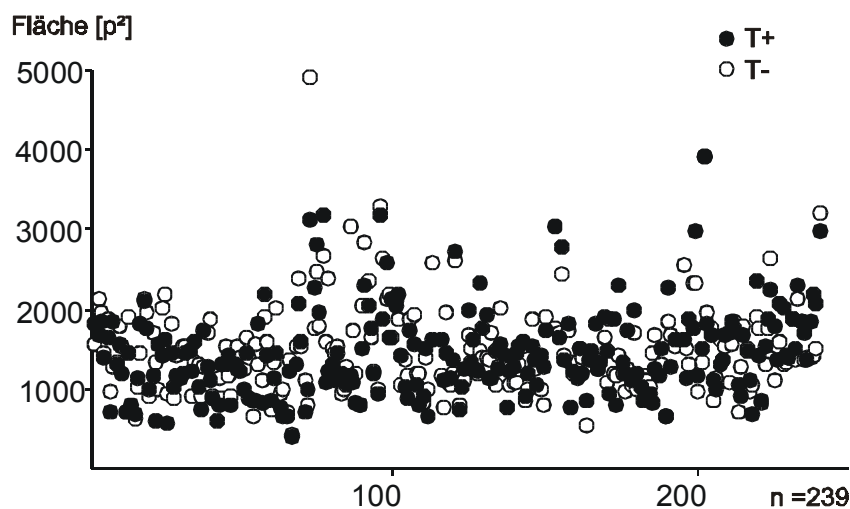


Abb. 7: Größen (Schnittflächen) in Quadratpixel [p²] Tangle-tragender (T+) und Tangle-freier (T-) Neurone in einer Stichprobe (n=239 Zellpaare)

Auf Kopien der Skizzen wurden die 3 Perikarya T+, T1- und T2- mit einem Kreuz markiert (**Abb.6d**). Ein zweiter Untersucher, der nicht wusste, ob eine Zelle immunopositiv war oder nicht, umrahmte im fluorometrischen Programm mit der Maus die markierten Perikarya. Das Programm gab die mittleren Intensitäten der umrahmten Flächen in counts-per-pixel an (**Abb.6e**). In einem letzten Schritt wurden die vermessenen Neurone als T+, T1- bzw. T2- rückidentifiziert (**Abb.6f**). Die Verhältniszahlen 'T+/T1-' wurden als Maß für die Konzentration an freiem Cholesterin des Tangle-tragenden Neurons verwendet. Sie wurden mit den Verhältniszahlen 'T2-/T1-' verglichen.

4.7 Statistik

Während mit T+/T1- zwei benachbarte Neurone verglichen werden, von denen eines

einen NFT trägt, vergleicht T2-/T1- zwei benachbarte, aber Tangle-freie Neurone. Da beide Zahlen den gleichen Nenner aufweisen, handelt es sich statistisch gesehen um verbundene Werte, was die Aussagekraft erhöht. Für einen Fall wurden je über 30 Bilder zur Analyse herangezogen, pro Fall also über 90 Zellen. Da eine parametrische Verteilung der Verhältniszahlen nicht unbedingt vorausgesetzt werden konnte, wurden nichtparametrische statistische Tests verwendet. Entsprechend wurden Mediane bzw. Medianabweichungen als Mittel- bzw. Streuungsmaße der Verteilungen der Verhältniszahlen herangezogen.

Die Verteilungen der beiden Verhältniszahlen wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für verbundene Stichproben verglichen. Korrelationen der Mediane von T+/T1- für die AD-Fälle mit Alter, Autolyse- und Lagerungszeit wurden mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten evaluiert. Unterschiede der Verteilungen für männliche und weibliche AD-Fälle bzw. für ApoE ϵ 4-Träger und -Nichtträger wurden mit dem Zweistichprobentest nach Kolmogorov und Smirnov auf Signifikanz überprüft.

Die Signifikanzschwelle der statistischen Tests war $\alpha=0,05$.

5 Ergebnisse

5.1 Fluoreszenzmikroskopie

5.1.1 M. Niemann-Pick Typ C

Fall N1: Es lag eine rechte horizontale Scheibe mit Insel, Opercula frontale und temporale und darunter liegendem Striatum vor. Auf der medialen Seite lag der Bogen der V. thalamostriata. Thalamus, Brachium colliculi superioris und rostrales Mittelhirn waren mitangeschnitten.

Im Gyrus temporalis medius fanden sich zahlreiche NFT, mehr in L. III³ als in L. V. Das Perikaryon Tangle-tragender Neurone war in der Mehrzahl der Fälle balloniert. Der NFT erstreckte sich häufig bis in einen Meganeuriten oder den Apikaldendriten (**Abb.8c**, Pfeil). Daneben fanden sich zahlreiche NT, bevorzugt in L. III und V.

Im Filipin-Bild fielen zahlreiche, Perikaryen zuzuordnende, offensichtlich intrazelluläre Cholesterinakkumulationen auf, die aus eng aneinander liegenden, kleinen Granula bestanden (**Abb.8a'-d',e-i**). Sie waren häufig in Tangle-tragenden Neuronen zu finden (**Abb.8a,a'-d,d'**), jedoch trug die Mehrzahl der Neurone mit Cholesterinakkumulationen keinen NFT. Neurone mit Akkumulationen waren in der Regel balloniert. Häufig wiesen sie Meganeuriten (**Abb.8c'**, Stern, h) auf, in denen die Granula bevorzugt zu finden waren. Teilweise füllten die Akkumulationen das ganze Perikaryon aus (**Abb.8a',c'** gebogener und gerader Pfeil, f,g), teilweise waren sie in proximalen Zellfortsätzen (**Abb.8c'** Stern, d',e,h) zu finden. Ihre Lokalisation innerhalb des Perikaryon deckte sich in einigen Fällen mit der der NFT (**Abb.8a,a',b,b'** gerader Pfeil), in anderen Fällen nahmen sie den vom NFT freien Raum ein (**Abb.8b,b'** gebogener Pfeil).

³ Schichtung des Isokortex (L.=Lamina): L. I - L. molecularis, L. II - L. granularis externa, L. III - L. pyramidalis externa, L. IV - L. granularis interna, L. V - L. pyramidalis interna, L. VI - L. multiformis

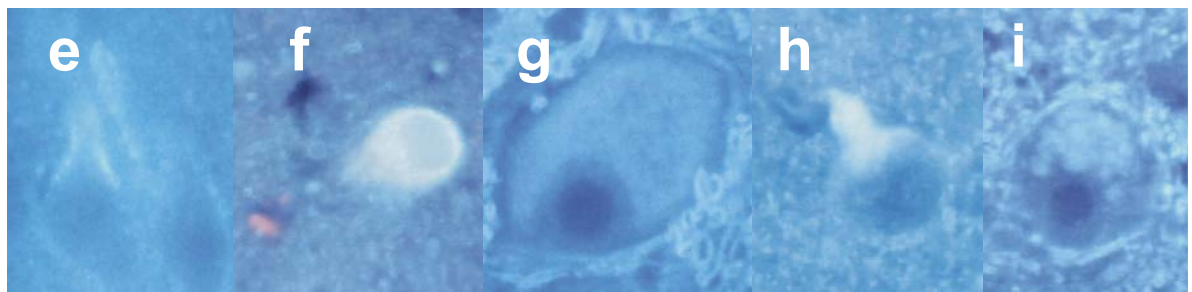
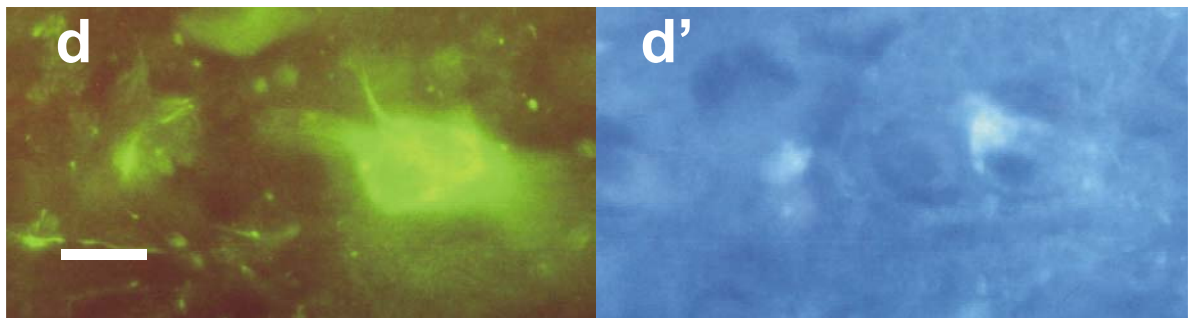
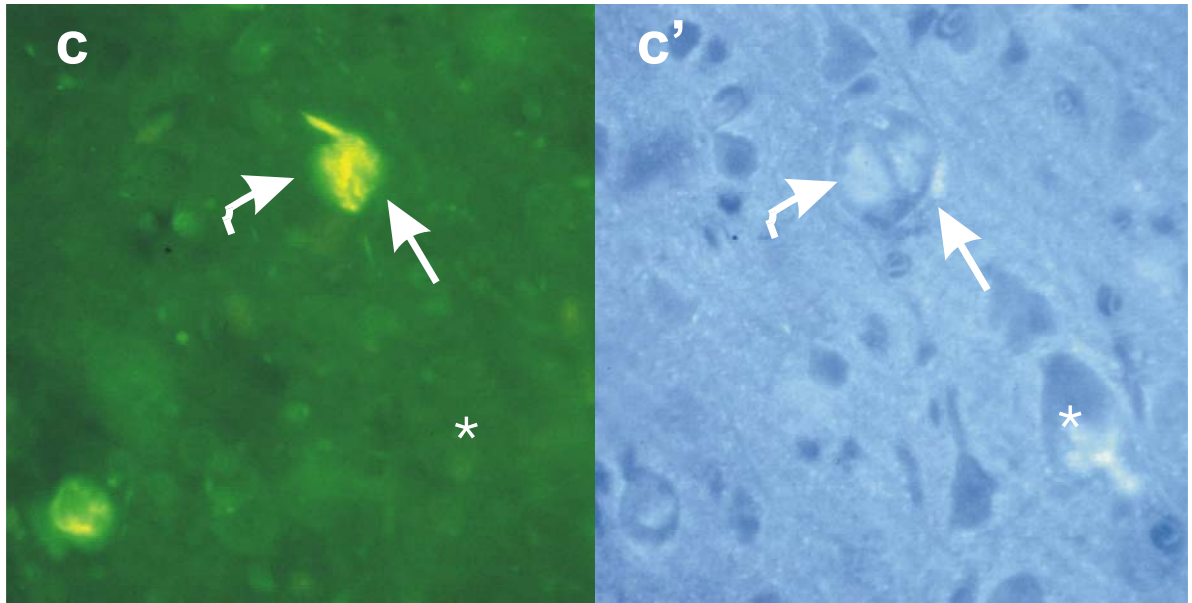
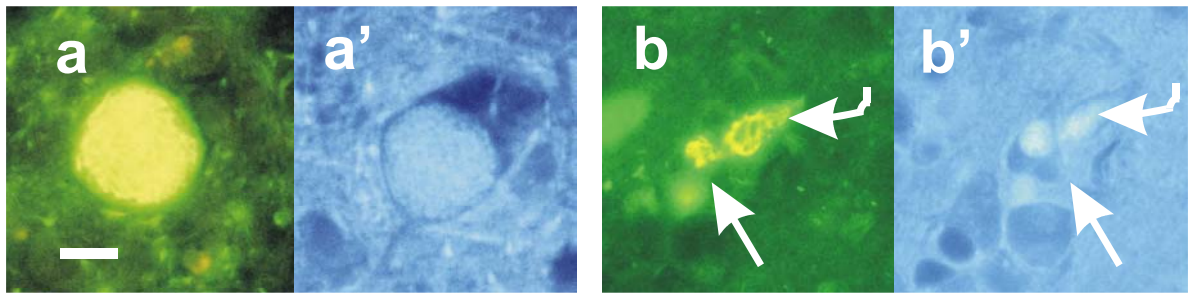


Abb. 8: Morphologie intrazellulärer Cholesterinakkumulationen und ihre Beziehung zu neurofibrillären Tangles. **a,a'-d,d'** Fall N1, Gyrus temporalis medius, **a-d** Immunhistochemische Bilder, **a'-d'** entsprechende Filipin-Bilder, **a,a'** eine mit einem Tangle (**a**) kolokalisierte intrazelluläre Cholesterinakkumulation (**a'**), **b,b'**, wiederum Kolokolisation von Tangle und Akkumulation (gerader Pfeil), in der benachbarten Zelle spart der Tangle eher das Zentrum aus, die Akkumulation liegt eher zentral (gebogener Pfeil), **c,c'** eine Zelle, deren Tangle in den Apikaldendriten hineinragt (**c**, gerader Pfeil), ist mit einer Akkumulation angefüllt (**c'**, gerader Pfeil), ebenso wie die benachbarte Zelle, die aber keinen Tangle trägt (gebogener Pfeil), in der linken unteren Ecke eine weitere Zelle sowohl mit Tangle als auch Akkumulation, unten rechts eine Zelle mit einer in einen Meganeuriten hineinragenden Akkumulation, aber ohne Tangle (Stern), **d,d'**, bei dieser Tangle-tragenden Zelle befindet sich die Akkumulation an der Basis eines Zellfortsatzes, **e-i** intrazelluläre Cholesterinakkumulationen, Fall N1, aus dem Gyrus temporalis medius (**e,h**) und dem Ncl. n. oculomotorii (**f,g,i**), **e** periphere, an der Basis des Apikaldendriten gelegene Granula. **f** das ganze Perikaryon ist unter Aussparung des Nucleus mit Granula angefüllt, **g** bei dieser großen Zelle zeigt sich ein Hof zwischen ungefärbtem Nucleus und den Granula, **h** Akkumulation in einem Meganeuriten, **i** grobe Granula, die das Perikaryon nicht vollständig ausfüllen. **a,a'-c,c'** x400, **d,d',e-i** x600, Balken entspr. 10µm, Balken in **a** bezieht sich auf **a,a'-c,c'**, Balken in **d** bezieht sich auf **d,d',e-i**

Dieser Befund erforderte neue methodische Definitionen: von intrazellulären Cholesterinakkumulationen wurde gesprochen, wenn die perikaryale Fluoreszenz höher als die des umgebenden Neuropils war. Dieses Kriterium konnte auch auf subkortikale Bereiche angewendet werden. Zusätzlich zu NFT und NT (und NP in AD) wurde nun auch die Verteilung und Dichte der intrazellulären Cholesterinakkumulationen erfasst (s. 4.3.).

Das Bild im Gyrus temporalis superior ähnelte dem vorbeschriebenen sehr, die Dichte der NFT war aber geringer. Die geringere Dichte ermöglichte die Beobachtung, dass die NFT beider Schichten häufig in Bezug auf die Kortexoberfläche untereinander angeordnet waren, eine Anordnung, die als 'in register' bezeichnet worden ist [84].

Im Gyrus frontalis inferior - homotypischer Isokortex mit ausgeprägter L. IV - fanden sich nur vereinzelt NFT, doch einige Akkumulationen.

Die Zellfärbung des Inselpräparates zeigte granulären Kortex und ein schmales Claustrum. Nach medial folgten weiße Substanz, Faserzüge mit einzelnen Zellnestern (Striatum), weiße Substanz und Kerne mit großen Zellen (Thalamus). Im Claustrum gab es einige NFT, weniger in der Inselrinde, Akkumulationen waren in beiden Strukturen zahlreich vorhanden. Im Striatum lagen nur einzelne NFT. Akkumulationen waren hier nicht vorhanden.

Der angeschnittene Teil des Thalamus wies zahlreiche NFT und sehr viele NT, aber nur mäßig viele Akkumulationen auf.

Das Mittelhirn war in Höhe des oberen Randes des Colliculus superior senkrecht zum Verlauf des Aquaeductus mesencephali abgeschnitten, unten am Unterrand des Colliculus superior schräg zu seinem Verlauf. Ein Vergleich mit dem Atlas ergab, dass

die Schnittführung von dorsal rostral nach basal kaudal gewesen sein musste. Makroskopisch waren Substantia nigra, Ncl. ruber, Griseum centrale und die grauen Schichten des Colliculus superior an ihren Eigenfärbungen zu erkennen. Das Kresylviolettbild zeigte im Colliculus superior große Zellen, lateral des Aquaeductus diffuse Zellansammlungen, aus denen keine Kerne abgegrenzt werden konnten. In diesem Bereich liegen der Ncl. mesencephali n. trigemini und der Ncl. interstitialis. Er wird hier als "Tegmentum mesencephali dorsalis" bezeichnet. Großzellige Kerne beidseits der Mittellinie vor dem Aquaeductus stellten die Ncll. n. oculomotorii dar, ein großer Kern weiter basolateral den Ncl. ruber. Basolateral davon befand sich die Pars compacta substantiae nigrae. Basal der Ncll. n. oculomotorii lag in der Mittellinie der Ncl. interpeduncularis.

In allen Kernen fanden sich stark ballonierete Zellen mit Akkumulationen, die besonders im Ncl. n. oculomotorii auffielen (Abb.8f,g,i). NFT und NT waren jedoch im Ncl. ruber selten und im Ncl. n. oculomotorii abwesend. Zahlreiche NFT und NT traten in der Substantia nigra, besonders aber im Tegmentum dorsalis und im Ncl. interpeduncularis auf.

Fall N2: Vom Endhirn lagen folgende Teile vor: Der Frontalpol; eine koronare Scheibe vor der Commissura anterior mit Ncl. accumbens, Caput ncl. caudati, Putamen, Tractus olfactorius und Temporalpol; eine rechte koronare Scheibe mit Ncl. accumbens, Caput ncl. caudati und Putamen; eine komplette koronare Scheibe auf Höhe der Corpora mamillaria mit Cauda ncl. caudati, Putamen, Pallidum, Inselrinde, Uncus hippocampi, Amygdala, Thalamus und Hypothalamus; eine koronare Scheibe auf Höhe des Splenium corporis callosi mit Hippokampus; der Okzipitalpol; ein Stück Inselrinde und verschiedene nicht weiter zu lokalisierende kleine Stücke. Nach Entfernung des Tractus opticus und der A. cerebri media wurde hinter der Amygdala die Substantia perforata anterior dargestellt.

Proben aus den Gyri frontales superior rostralis (Frontalpol) und inferior zeigten homotypischen Isokortex. Im ersteren fanden sich keinerlei NFT, NT oder Akkumulationen, der letztere zeigte sehr viele NFT und NT in L. III und V/VI und viele Akkumulationen. Proben aus den Gyri frontales superior caudalis und medius zeigten im Zellbild agranulären Kortex und fast keine Veränderungen. Vom übrigen Isokortex lagen in den Gyri angularis, temporalis medius (homotypische Isokortizes), cinguli anterior (heterotypischer, agranulär Isokortex mit großen Pyramidenzellen in L. V) und Gyrus occipitalis medialis (Isokortex vom Calcarina-Typ) keinerlei Veränderungen, in den Gyri cinguli

posterior und temporalis superior (homotypische Isokortizes) einige wenige NFT und sehr wenige Akkumulationen vor.

Die Insel zeigte granulären Kortex mit breitem Claustrum. Im Claustrum waren nur wenige, in der Inselrinde einige NFT erkennbar.

Der Hippokampus wurde auf Höhe des Uncus und des Splenium, der Entorhinale Kortex auf Höhe des Uncus und der Amygdala begutachtet. Im Entorhinalen Kortex, dem Subikulum und Feld 1 des Cornu ammonis (CA) waren massenhaft NFT und NT vorhanden, weniger in Feld CA2. In Feld CA3 waren nur vereinzelt NFT zu finden, im Gyrus dentatus keine. Die NFT des Entorhinalen Kortex waren in den inselartigen Strukturen der L. principalis externa α besonders dicht gelagert (**Abb.9a**), die L. dissecans war frei von NFT. Akkumulationen in ballonierten Neuronen waren im Entorhinalen Kortex sehr zahlreich (**Abb.9a'**) und im Hippokampus abwesend.

Die schräg zur Oberfläche angeschnittene Substantia perforata anterior zeigte eine oberflächliche Schicht mit zahlreichen sehr kleinen Zellen (L. pyramidalis) und eine breite zellarme Schicht mit großen, verschiedene Orientierungen aufweisenden länglichen Zellen (L. multiformis). Darunter lagen Ansammlungen großer, dunkler Zellen - die sog. Callejaschen Inseln. NT waren in der L. multiformis zu finden, NFT nur in den Callejaschen Inseln. Auf einem Anschnitt der rostralen Amygdala war Cortex piriformis vorhanden. Er wies viele NFT, NT und Akkumulationen auf. Die Amygdala selbst wies ebenso einige Akkumulationen und viele NFT auf. Die Verteilung der NFT war heterogen.

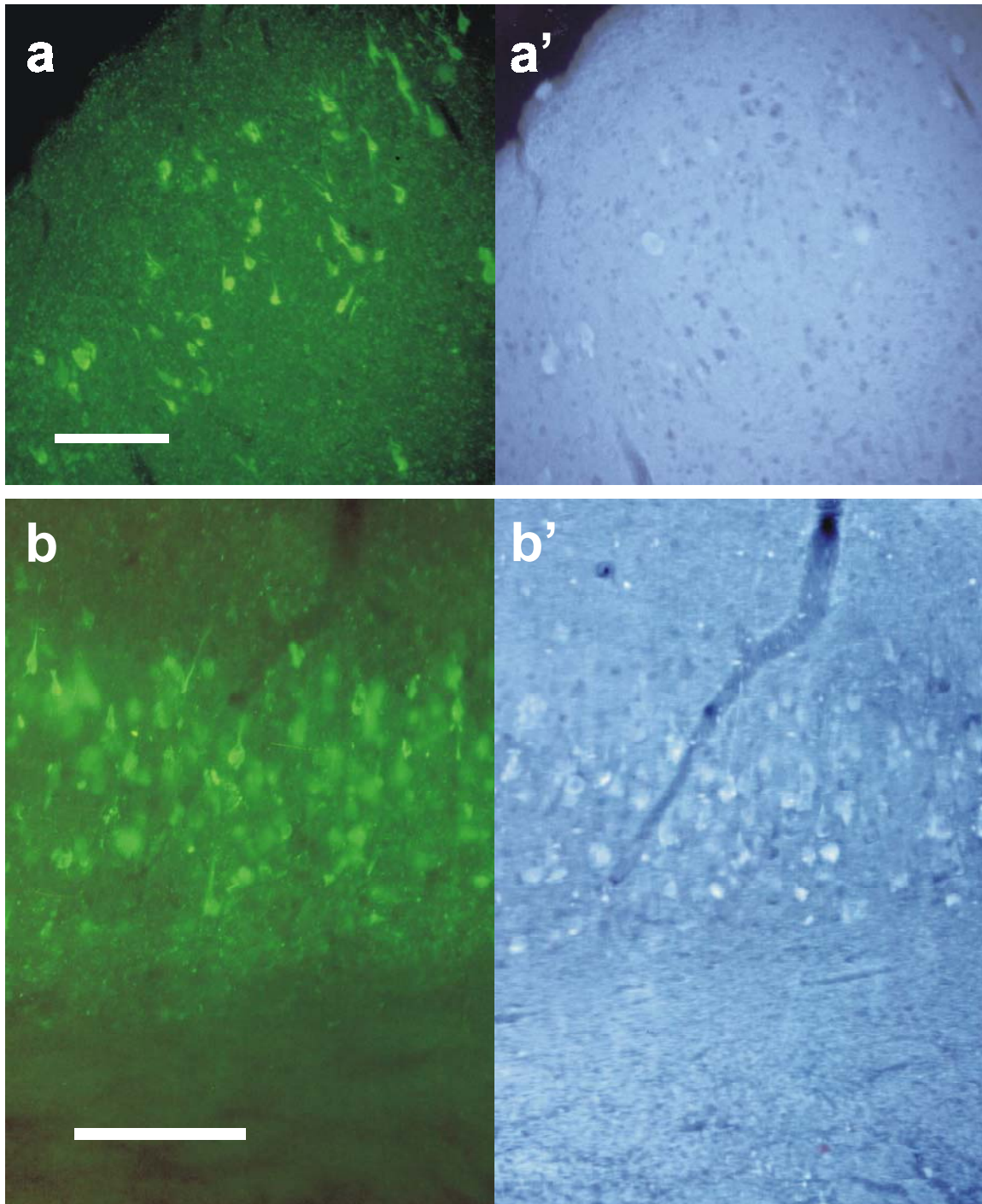


Abb. 9: Zwei Regionen mit massenhaftem Auftreten von Tangles, Neuropilfäden und intrazellulären Cholesterinakkumulationen: **a,a'** Fall N1, Entorhinaler Kortex, Lamina principalis externa, x200, **b,b'** Fall N5, CA2, x300; Balken entspr. jeweils 50 μ m

In den Basalganglien waren NFT und Akkumulationen am zahlreichsten im Ncl. accumbens, weniger im rostralen Putamen und im Caput ncl. caudati. NFT fanden sich außerdem in großen Neuronen der Cauda ncl. caudati und im Pallidum, im Ncl. caudatus mit

zahlreichen Akkumulationen. Das Putamen auf Höhe der Corpora mamillaria war frei von Veränderungen. Im rostralen Basalganglienanschnitt (Ncl. accumbens, Caput ncl. caudati, Putamen) und im Pallidum in Höhe der Corpora mamillaria nahm die Dichte der NFT von dorsal nach basal zu.

In Ncll. anterior und ventroanterior thalami fanden sich reichlich NFT und NT, weniger in einem ca. 10mm kaudaleren Anschnitt des Thalamus und dem Pulvinar.

Im ganzen Thalamus waren zahlreiche Akkumulationen zu finden. Im Bereich des Ncl. reticularis fanden sich zahlreiche NT. Unterhalb des Globus pallidus im Hypothalamus und in den Corpora mamillaria fanden sich zahlreiche NFT und NT, aber nur wenige Akkumulationen. Das Corpus pineale war frei von Veränderungen.

Insgesamt war die Mittelhirnpathologie schwächer als bei N1 ausgeprägt. In den gut abgrenzbaren Ncll. n. oculomotorii fanden sich ballonierete Neurone mit Akkumulationen, aber keine neurofibrilläre Veränderungen. Diese waren zusammen mit einigen Akkumulationen reichlich in der Substantia nigra vorhanden, in geringerem Ausmaß im Ncl. ruber. Der Ncl. interpeduncularis war nicht angeschnitten. Wieder konnte das dorsale Tegmentum mesencephali schlecht in Ncll. mesencephali trigemini, interstitialis und andere Kerne differenziert werden. In diesem Bereich waren nur wenige NFT zu finden. Sie traten häufiger zusammen mit NT in einem Anschnitt des unteren Mittelhirns basal des Aquaeductus in der Mittellinie auf (Ncl. raphes dorsalis).

Das Zellbild der Ponsschnitte erlaubte die Identifizierung von Locus coeruleus, Ncll. pontis, mesencephalicus und motorius n. trigemini, raphes magnus, nn. facialis und abducentis, gigantocellularis, vestibulares medialis und lateralis, Olive sowie Ncll. arcuati. Andere Strukturen waren nicht eindeutig abgrenzbar. Viele Neurone in den Ncll. pontis, Ncll. n. trigemini, Locus coeruleus und Ncl. raphes magnus wiesen Akkumulationen auf. Im Locus coeruleus, Ncl. raphes magnus und Ncl. ambiguus fanden sich mäßig viele NFT und NT. Vereinzelt NFT fanden sich im Ncl. mesencephalicus n. trigemini, NT fanden sich im Griseum centrale unter dem Ependym der Rautengrube und in der Mittellinie.

Weder in drei Proben des Zerebellarkortex noch im Ncl. dentatus fanden sich Auffälligkeiten. Ein Anschnitt des Myelencephalon in Höhe des Austritts des N. hypoglossus zeigte außer einem einzelnen NFT im Bereich des dorsalen Tegmentum keine Veränderungen.

Fall N3: Alle sechs Schichten des homotypischen Isokortex waren klar abgrenzbar. Es waren weder NFT noch NT nachweisbar, aber zahlreiche Akkumulationen in L. III und V.

Fall N4: Mächtig entwickeltes Vorderhorn und schmales Hinterhorn ließen auf einen zervikalen Rückenmarksschnitt schließen. Es fanden sich keine NFT, NT oder Akkumulationen.

Fall N5: Das Kresylviolettbild eines einzelnen zerebralen Gyrus ohne Lokalisationsangabe zeigte Betz'sche Riesenzellen, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass es sich um den Gyrus praecentralis handelte. Veränderungen fanden sich nur in sehr begrenztem Umfang. Das Auftreten von NFT war in den hippokampalen Arealen Subikulum, CA3 und CA1 massenhaft, NT waren nicht ganz so dicht vorzufinden. In CA2 lagen zahlreiche ballonierete Neurone mit Akkumulationen vor (**Abb.9b,b'**), in den anderen Arealen lagen weniger intrazelluläre Akkumulationen vor, aber Anreicherungen im Neuropil.

Im Locus coeruleus und entlang der Mittellinie fanden sich einige NFT und NT, in den Ncll. pontis nur vereinzelt.

Zusammenfassung N1-N5: NFT waren im Isokortex bevorzugt in L. III, daneben L. V, granulärer Rindenbereiche lokalisiert, während sie in agranulären Rindenbereichen nur spärlich auftraten. Temporale und frontale Regionen zeigten einen ausgeprägteren Befund als parietale und okzipitale. Viele Regionen, die zum Limbischen System gezählt werden, waren von der Pathologie stark betroffen: Hippokampus, Subikulum, Entorhinaler Kortex, Gyrus cinguli, Amygdala, Ncl. accumbens, Corpus mamillare, Ncl. anterior thalami, Ncl. interpeduncularis, Substantia nigra, Locus coeruleus und orale Raphekerne. Daneben waren Regionen betroffen, die mit dem Limbischen System in unmittelbarer Verbindung stehen: Insel, Paläokortex, Pallidostriatum, ventrale Thalamuskern und Hypothalamus.

Die Verteilung der Akkumulationen stimmte im Großen und Ganzen mit der Verteilung der NFT überein, mit folgenden Ausnahmen: Akkumulationen waren im Entorhinalen Kortex häufiger als im Hippokampus und sie waren sehr ausgeprägt im Ncl. n. oculomotorii, obwohl hier keine NFT vorhanden waren.

Die Befunde sind in **Tab.4** zusammengefasst. **Tab.5** gibt eine Gegenüberstellung dieser Befunde mit Literaturangaben.

Tab. 4: Beobachtung neurofibrillärer Veränderungen und intrazellulärer Cholesterinakkumulationen in Niemann-Pick Typ C-Hirnen (Fälle N1-N5) - fett hervorgehoben: Regionen, in denen Fluoreszenzmes-
sungen durchgeführt wurden; Chol=intrazelluläre Cholesterinakkumulationen

Fall	Region	NFT	NT	Chol
N1	Gyrus frontalis inferior	+	0	++
	Gyrus temporalis superior	++	+	+++
	Gyrus temporalis medius	++++	++	+++
	Insula	++	+	++
	Striatum	+	0	0
	Thalamus	++	+++	+
	Substantia nigra	++	++	++
	Ncl. ruber	+	0	++
	Ncl. n. oculomotorii	0	0	++++
	Tegmentum mesencephali dorsalis	++++	+++	+++
	Ncl. interpeduncularis	+++	+++	++
N2	Gyrus frontalis superior rostralis	0	0	0
	Gyrus frontalis superior caudalis	0	0	+
	Gyrus frontalis medius	+	0	+
	Gyrus frontalis inferior	++++	++	++
	Gyrus angularis	0	0	0
	Gyrus temporalis superior	+	0	+
	Gyrus temporalis medialis	0	0	0
	Gyrus occipitalis medialis	0	0	0
	Gyrus cinguli anterior	0	0	0
	Gyrus cinguli posterior	++	+	0
	Insula	++	0	0
	Entorhinaler Kortex	++++	++	+++
	Hippokampus	++++	++	0
	Substantia perforata anterior	++	++	++
	Cortex piriformis	+++	++	++
	Amygdala	++++	++	++
	Ncl. accumbens	++	+	+
	Ncl. caudatus	++	+	++
	Putamen	+	0	+
	Globus pallidus	++	+	+
	Thalamus	++	+	+++
	Corpus mammillare	+++	++	+
	Hypothalamus	+++	0	+
	Corpus pineale	0	0	0
	Substantia nigra	++	+	+
	Ncl. ruber	+	0	+
	Ncl. n. oculomotorii	0	0	+
	Ncll. raphes	++	+	0
	Tegmentum mesencephali dorsalis	+	0	0
	Locus coeruleus	++	+	+
	Griseum pontis centrale	0	++	0
	Ncl. n. trigeminis	++	+	++
	Ncll. raphes	++	+	++
Ncll. pontis	+	0	+++	
Ncl. n. abducentis	0	0	0	
Ncl. n. facialis	0	0	0	
Ncl. ambiguus	++	++	0	
Zerebellarkortex	0	0	0	
Ncl. dentatus	0	0	0	
Myelenzephalon	+	0	0	
N3	Großhirnkortex unbekannter Lokalisation	0	0	++
N4	Rückenmark	0	0	0
N5	Gyrus praecentralis	+	+	+
	Hippokampus	++++	+++	+++
	Locus coeruleus	++	++	+
	Ncll. raphes	++	+	0
	Ncll. pontis	+	+	+

Tab. 5: Gehirne bei M. Niemann-Pick Typ C: Gegenüberstellung der verschiedenen Regionen gefundenen Cholesterinakkumulationen (Chol) und des in der Literatur beschriebenen Vorkommens von Speicherzellen in diesen Regionen. Daneben Vergleich der in dieser Studie gefundenen Tangle-Ausprägungen mit in der Literatur beschriebenen Tangle-Befunden in diesen Regionen

Entität	Chol	Speicherneurone				NFT	NFT		
	eigene Fälle	[100]	[61]	[25]	[48]	eigene Fälle	[100]	[61]	[48]
Fallzahl	5	7	5	2	1	5	7	5	1
Region									
frontaler Isokortex	-----	+++	+++	++	+++	-----	+++	++	+++
gr ¹	++	o.A. ³	o.A.	o.A.	o.A.	++	o.A.	o.A.	o.A.
agr ²	+	o.A.	o.A.	o.A.	o.A.	0	o.A.	o.A.	o.A.
Parietalkortex, gr	0	++	++	+++	++	0	+	+	++
temporaler Isokortex, gr	++	++	++	++	+++	++	+	++	+++
Okzipitalkortex	-----	++	+	+	+	-----	+	+	+
Sulcus calcarinus, agr	0	+	o.A.	o.A.	o.A.	0	0	o.A.	o.A.
Insel, gr	+	++	o.A.	o.A.	+++	++	o.A.	o.A.	+++
Gyrus cinguli	-----	-----	o.A.	o.A.	o.A.	-----	+++	o.A.	o.A.
anterior, agr	0	o.A.	o.A.	o.A.	o.A.	0	+	o.A.	o.A.
posterior, gr	0	o.A.	o.A.	o.A.	o.A.	++	o.A.	o.A.	o.A.
Entorhinaler Kortex	+++	+++	++	o.A.	o.A.	+++	+++	++	o.A.
Hippokampus CA1-4	++	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
Paläokortex	++	o.A.	o.A.	o.A.	o.A.	++	o.A.	o.A.	o.A.
Basalganglien	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Striatum	+	+	+	++	++	+	+	+	++
Pallidum	++	++	++	++	+	+	+	+	+
Amygdala	++	o.A.	+	o.A.	o.A.	+++	o.A.	++	+++
basales Vorderhirn	o.A.	+++	+++	o.A.	o.A.	o.A.	+++	+	o.A.
Thalamus	++	++	+++	+++	o.A.	++	++	+	o.A.
Hypothalamus	+	+++	+++	++	o.A.	++	+++	++	o.A.
Substantia nigra	++	++	+++	+++	o.A.	++	+	++	o.A.
motor. Hirnnervenkerne	-----	-----	-----	+++	++	-----	-----	++	o.A.
Okulomotoriuskern	+++	+++	o.A.	o.A.	o.A.	0	+	o.A.	o.A.
Ncl. ambiguus	0	o.A.	o.A.	o.A.	o.A.	++	o.A.	o.A.	o.A.
andere	0	++	+++	o.A.	o.A.	0	+	o.A.	o.A.
Ncl. ruber	++	++	++	o.A.	o.A.	+	o.A.	+	o.A.
Raphekerne	0	o.A.	o.A.	o.A.	o.A.	++	o.A.	o.A.	++
Locus coeruleus	+	o.A.	++	o.A.	o.A.	++	+	++	+++
Kleinhirn	0	+	+	+	+	0	0	+	o.A.
Rückenmark	0	++	+	+++	++	0	+	0	o.A.

¹gr=granuläre Rinde;
²agr=agranuläre Rinde
³o.A.=ohne Angabe

5.1.2 M. Alzheimer

NFT waren im Gyrus temporalis superior aller AD-Fälle vorhanden, besonders reichlich in den Fällen A2, A6 und A7. Sie befanden sich in den Schichten L. III und V, besonders in L. V. Auch hier lagen Tangle-tragende Neurone häufig 'in register' [84] untereinander.

Die Dichte der NT zeigte große Variabilität innerhalb der Fälle. NT waren besonders zahlreich in L. II, III und V, kamen aber auch in den anderen Schichten vor. Gelegentlich sah man NT in der weißen Substanz.

Einzelne intrazelluläre Cholesterinakkumulationen traten in Fall A2 auf. Hier lagen sie gelegentlich in Assoziation mit NFT (**Abb.10a,a'-c,c'**) vor. Es waren das Perikaryon weitgehend ausfüllende (Abb.10a',b') von perinukleären Akkumulationen (Abb.10c') zu unterscheiden. Ihre Lokalisation stimmte in einigen Fällen mit der der NFT überein (Abb.10a,a',b,b'), in anderen Fällen befanden sie sich in dem vom Tangle-freien Teil des Perikaryons (Abb.10c,c').

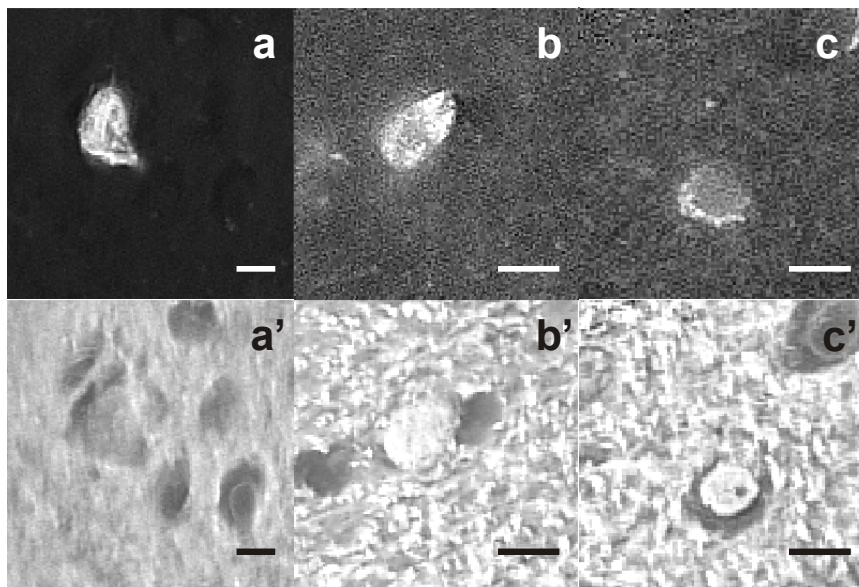


Abb. 10: Fall A2, Gyrus temporalis superior, **a-c** immunhistochemische Bilder, **a'-c'** Filipin-Bilder, **a,a',b,b'** Lokalisation von Tangle und Akkumulation stimmen überein, die Akkumulationen füllen das Perikaryon weitgehend aus, **c,c'** der NFT liegt am Rande des Perikaryon (**c**), die Akkumulation zentral (**c'**), Balken entspr. 10 μ m, x400

NP traten in allen Fällen auf, bevorzugt in L. II. In A4 waren sie außerordentlich zahlreich. In den Fällen A2, A4 und A5 waren viele NP auch mit Filipin angefärbt (**Abb.11a,a',b,b'**).

Die Befunde sind in **Tab.6** zusammengefasst.

Tab. 6: Beobachtung neurofibrillärer Veränderungen und intrazellulärer Cholesterinakkumulationen (=Chol) in Alzheimer-Hirnen (Fälle A1-A9)

Fall	NFT	NT	NP	Chol
A1	++	++	+	0
A2	+++	+++	+++	+
A3	++	0	+	0
A4	++	+	++++	0
A5	++	+	++	0
A6	+++	+	++	0
A7	+++	+	++	0
A8	++	+	+++	0
A9	++	+++	++	0

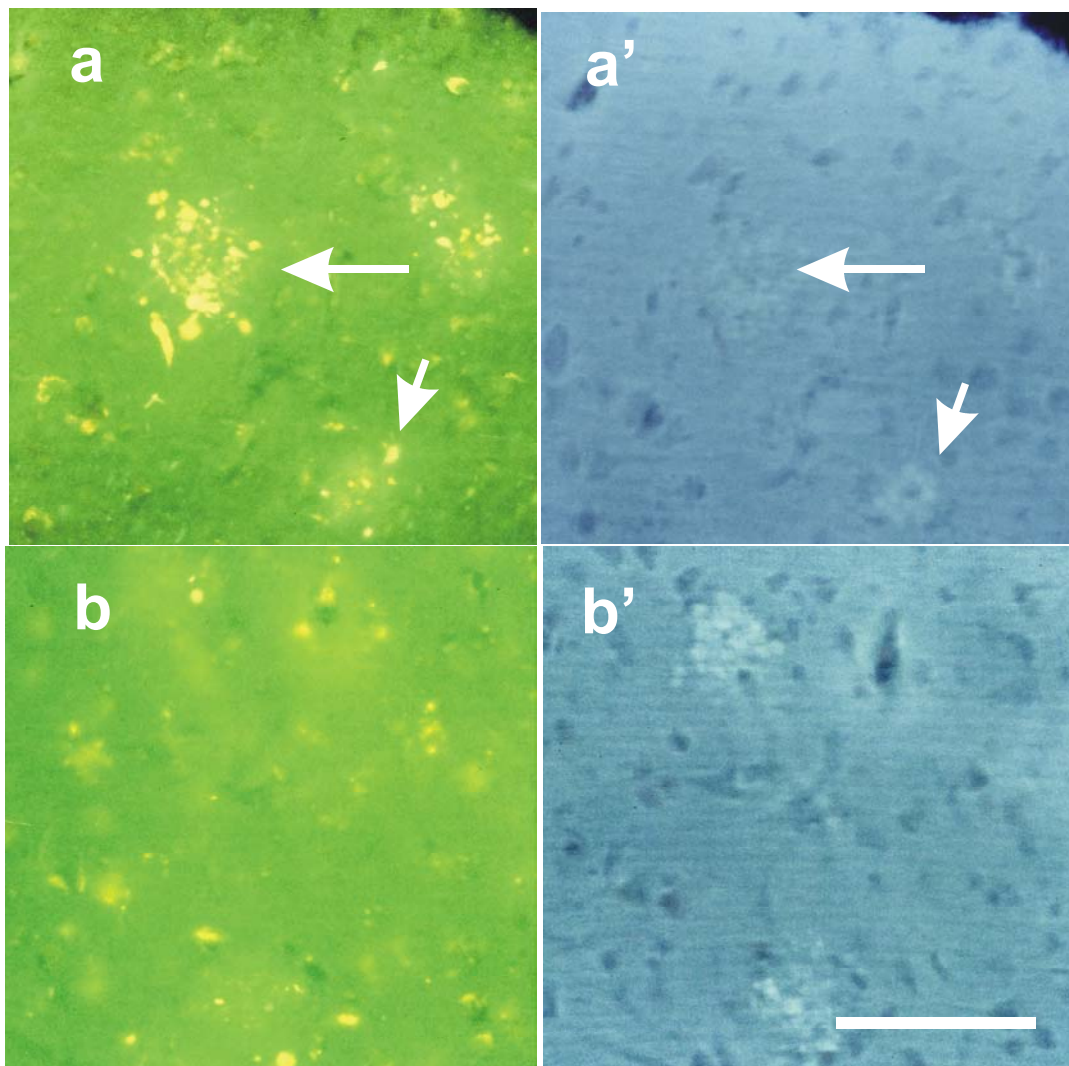


Abb. 11: Fall A2, Gyrus temporalis superficialis, Assoziation neuritischer Plaques (**a,b**) mit Cholesterinakkumulationen (**a',b'**), **a** 3 neuritische Plaques mit zwei entsprechenden Akkumulationen (Pfeile, **a'**), am ausgeprägtesten am unteren Plaque, **b** unten im Bild ein neuritischer Plaque, **b'** zwei Akkumulationen, von denen die untere dem neuritischen Plaque entspricht, Balken entspr. 50µm, x200

5.2 Fluorometrie (Fluorometrische Bestimmung des Cholesteringehalts Tangle-tragender Neurone)

Die Beobachtung, dass Cholesterinakkumulationen in Tangle-tragenden Neuronen häufiger als in Tangle-freien Neuronen auftreten, bedeutet nicht unbedingt, dass die mittlere Cholesterinkonzentration Tangle-tragender Neurone höher ist als die Tangle-freier Neurone. Um dies nachzuweisen, muss eine große, repräsentative Anzahl Tangle-freier Neurone fluorometrisch vermessen und mit vergleichbaren Tangle-freien Neuronen verglichen werden.

Um ein Maß für die Cholesterinkonzentration in Tangle-tragenden Neuronen zu erhalten, wurde die Fluoreszenz durch AT8-Immunhistochemie identifizierter Tangle-tragender Neurone $T+$ mit der benachbarter, aber Tangle-freier Neurone $T1-$ verglichen. Die benachbarte Lage war erforderlich, um die Varianz der Fluoreszenz durch lokale Faktoren wie unterschiedliche Schnittdicke und Schnittartefakte, die Fluoreszenzwerte verfälschen könnten, gering zu halten. Der Vergleich von Strukturen ein und derselben Aufnahme schloss außerdem einen Einfluss der Varianzen von Belichtungszeit, Anregungsfrequenz und -dauer auf den Fluoreszenzwert aus. Als Kontrolle diente der Vergleich der Fluoreszenzwerte eines zweiten, Tangle-freien Neurons $T2-$ mit dem des ersten Tangle-freien Neurons. Daraus ergaben sich als Maß- bzw. Kontrollwerte die Verhältniszahlen $T+/T1-$ und $T2-/T1-$.

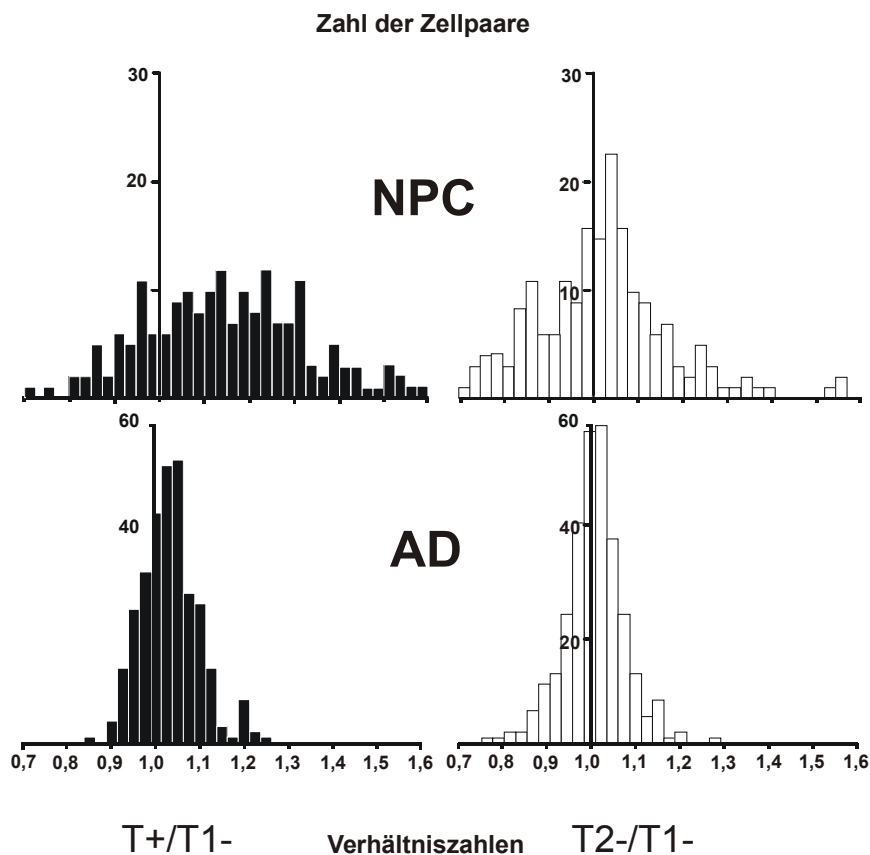


Abb. 12: Verteilung der Verhältniszahlen $T+/T1-$ und $T2-/T1-$ in Niemann-Pick Typ C (oben)- und Alzheimer (unten)- Hirnen. $T+/T1-$ =Fluoreszenz von Tangle-tragendem zu benachbartem Tangle-freiem Neuron, $T2-/T1-$ =Fluoreszenz von Tangle-freiem Neuron zu benachbartem Tangle-freiem Neuron

Verteilung der Verhältniszahlen: Insgesamt wurden in allen Regionen, deren numerische NFT-Dichte subjektiv mit '++++' bewertet worden ist (s. 4.3. und Tab.4) 1533 Neurone analysiert, davon 576 in NPC-Hirnen und 957 in AD-Hirnen. Die Histogramme der Verteilungen der Verhältniszahlen sind für beide Erkrankungen in **Abb.11** dargestellt. Die Verteilung in NPC-Hirnen ist breiter, $T+/T1-$ tendiert zu höheren Werten. Die Verteilung in AD-Hirnen ist spitzer, $T+/T1-$ sind nur gering nach rechts verschoben. Die Verteilungen sind relativ symmetrisch, es fällt jedoch auf, dass die $T+/T1-$ der AD-Hirne ein kleines Maximum um 1,2 aufweisen. Verfolgt man diese Zellpaare zurück, zeigt sich, dass es sich um die $T+$ handelt, bei denen eine Akkumulation mikroskopisch sichtbar ist. Mediane \pm Medianabweichungen der vier Verteilungen sind: $1,172\pm 0,132$ ($T+/T1-$) und $1,000\pm 0,084$ ($T2-/T1-$) für die NPC-Hirne und $1,019\pm 0,040$ bzw. $1,000\pm 0,038$ für die AD-Hirne. Der Unterschied beider Verteilungen ist in beiden Erkrankungen signifikant.

In den 9 AD-Fällen wurde jeweils nur eine (und zwar immer die gleiche) Region untersucht (Gyrus temporalis superior). In den 5 NPC-Fällen wurden 6 Regionen von 3 Fällen untersucht. Die für die einzelnen Regionen aufgeschlüsselten Ergebnisse sind in **Tab.7** und **Abb.12** dargestellt. Die Angaben stellen wieder $\text{Median} \pm \text{Medianabweichungen}$ dar. Eine signifikante Erhöhung von $T+/T1-$ gegenüber $T2-/T1-$ wird in allen analysierten Regionen der NPC-Hirne und in 3 der 9 AD-Fälle erreicht. Dem Nennwert nach liegen alle $T+/T1-$ über 1,000, während $T2-/T1-$ um 1,000 schwanken.

Tab. 7: Ergebnisse der Fluorometrie für die einzelnen Regionen

Fall/Region	T+/T1-		T2-/T1-		Sign. ²
	Median	Ma. ¹	Median	Ma. ¹	
N1/temporaler Isokortex	1.171	0,171	1.018	0,061	*
N1/dorsales Tegmentum	1,164	0,062	0,995	0,033	*
N2/Entorhinaler Kortex	1,286	0,286	1,010	0,186	*
N2/CA1-4	1,072	0,127	0,999	0,067	*
N2/Amygdala	1,084	0,084	1,007	0,070	*
N5/CA1-4	1,066	0,177	0,988	0,161	*
A1/temporaler Isokortex	1,003	0,031	0,993	0,029	n.s.
A2/"	1,040	0,039	1,003	0,016	*
A3/"	1,021	0,028	0,999	0,034	*
A4/"	1,030	0,026	1,012	0,035	*
A5/"	1,030	0,054	1,006	0,055	n.s.
A6/"	1,023	0,069	1,002	0,044	n.s.
A7/"	1,004	0,057	1,001	0,042	n.s.
A8/"	1,014	0,053	0,981	0,054	n.s.
A9/"	1,019	0,045	0,994	0,037	n.s.

¹Medianabweichung

²Signifikanz * $p < 0,05$, n.s. nicht signifikant

Obwohl die Mehrzahl der AD-Fälle keine signifikante Erhöhung von $T+/T1-$ aufweist, ergibt sich für die Gesamtpopulation der Verhältniszahlen Signifikanz. Ebenso signifikant ist die Erhöhung, wenn man die Einzelergebnisse der AD-Fälle als parametrische Einzelwerte auffasst und den t-Test verwendet. Die Werte der AD-Fälle liegen generell um Einiges niedriger als die der NPC-Fälle und zeigen eine deutliche Heterogenität von $T+/T1-$ praktisch gleich 1,000 (A1,A7) bis signifikantem $T+/T1-$ (A2-A4). Im Fall mit der größten Ausprägung von $T+/T1-$ (A2) werden intrazelluläre Cholesterin-Akkumulationen

gefunden, Cholesterin-Akkumulationen in Assoziation mit NP treten in Fällen mit hohem T+/T1- (A2,A4,A5) auf.

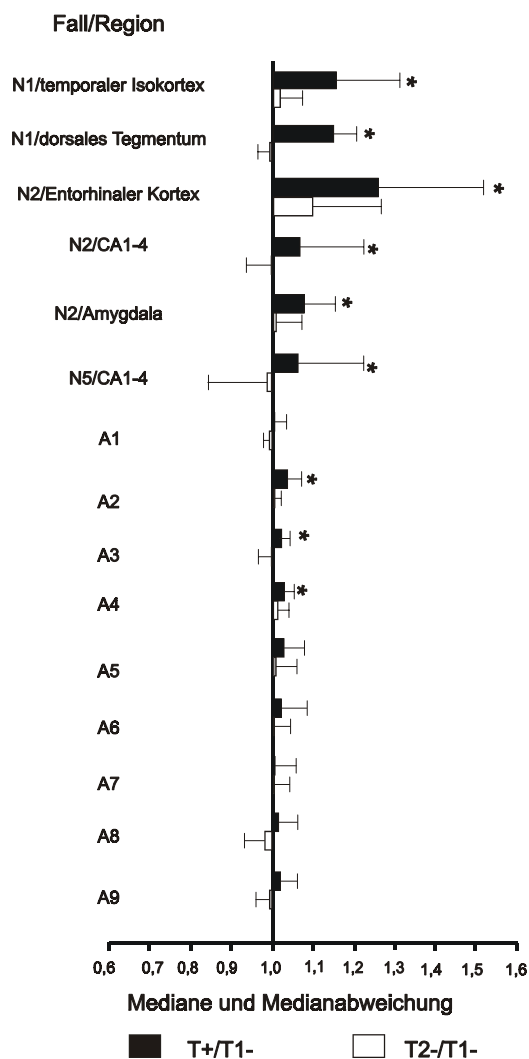


Abb. 13: Ergebnisse der Fluorometrie für die einzelnen Regionen. Die Balken zeigen nach links, wenn Median <1,000, nach rechts, wenn Median >1,000. Grafische Darstellung der Tab.7. *signifikanter Unterschied zwischen T+/T1- und T2-/T1-

Korrelationen mit Fallcharakteristika: Signifikante Korrelationen von T+/T1- zu Alter (Spearman-Rangkorrelationskoeffizient $\rho=0,01$; $p>0,999$), Autolysezeit ($\rho=0,25$; $p>0,50$) und Lagerungszeit ($\rho=-0,40$; $p>0,25$) der AD-Fälle ergeben sich nicht. Vorhandensein des ApoE $\epsilon 4$ -Allels und Geschlecht sind nicht in der Lage, T+/T1- signifikant zu beeinflussen, wobei mit $0.05 < p < 0.10$ bei Frauen nicht auszuschließen ist, dass eine Tendenz zu höherem T+/T1- besteht. Dies bedeutet, dass Alter, Autolysezeit, Lagerungszeit und ApoE-Genotyp keinen signifikanten Einfluss darauf haben, ob Tangle-tragende Neurone

im Vergleich zu benachbarten Tangle-freien Neuronen mehr oder weniger freies Cholesterin im Perikaryon aufweisen.

Nach ApoE-Genotyp und Geschlecht aufgegliederte Ergebnisse sind in **Tab.8** aufgeführt.

Tab. 8: *Ergebnisse der Fluorometrie nach Apolipoprotein E-Genotyp und Geschlecht.*

Fallgruppe	T+/T1-	
	Median	Ma. ¹
ApoE ε4-Träger	1,013	0,041
Nicht-ApoE ε4-Träger	1,021	0,037
Männer	1,009	0,039
Frauen	1,022	0,044

¹Medianabweichung

6 Diskussion

6.1 Nachweis der Cholesterinspeicherung im Niemann-Pick Typ C-Hirn

Der Nachweis erhöhten Cholesterins im NPC-Hirn stand bis zuletzt aus. In Hirnhomogenatsbestimmungen konnte entweder keine Cholesterinanreicherung [102,103] oder nur eine leichte [79] nachgewiesen werden (Tab.2). Im Gegensatz dazu war in Homogenaten aus Leber und Milz eine starke Anreicherung zu finden [33,105]. Auch in histochemischen Ansätzen mit der Schultz-Methode konnte im Gehirn keine [25] oder nur eine geringe [33] Cholesterinspeicherung gefunden werden. Der hier dargestellte histochemische Befund einer Cholesterinspeicherung im NPC-Hirn wurde unabhängig und zeitgleich, ebenfalls mittels Filipinfärbung, von einer New Yorker Arbeitsgruppe an zwei 3,5 bzw. 10,5 Jahre alten Kindern erhoben [114]. Perinukleäre, filipin-positive Granula in Neuronen wurden kürzlich in einem NPC-Mausmodell beschrieben [92,111,114]. Eine Untersuchung an denselben Zellen mit Filipin-Fluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie ergab, dass Filipin-positive Granula den 'polymorphous cytoplasmic bodies' [24,42] entsprechen [92].

Zur Erklärung der disparaten Befunde liegt nahe anzunehmen, dass Cholesterinbestimmungen in Hirnhomogenaten ungeeignet sind, Veränderungen, die nur in der grauen Substanz oder gar in nur einer Subpopulation von Hirnzellen vorliegen, aufzudecken. Bei NPC tritt eine Demyelinisierung [102] auf, so dass, weil sich der größte Teil des Cholesterins im Hirn in Myelinscheiden befindet [51], ein Cholesterinverlust der weißen Substanz eine Cholesterinanreicherung der grauen Substanz maskieren kann. Bezüglich der histochemischen Befunde muss davon ausgegangen werden, dass Filipin-Fluoreszenzmikroskopie der herkömmlichen Schultz-Methode zur Darstellung von Cholesterin an Sensitivität überlegen ist.

Die in dieser Studie vorgefundene Verteilung intrazellulärer Cholesterinakkumulationen stimmt mit der vorbeschriebenen [25,48,61,100] von Speicherneuronen weitgehend überein (Tab.5): Die von der Speicherung am stärksten betroffenen Regionen scheinen Entorhinaler Kortex, Thalamus und Hypothalamus zu sein, die Speicherung in der Hippokampalen Formation scheint großen interindividuellen Schwankungen zu unterliegen. Der hier beobachtete Fall (N5) einer stärkeren Speicherung in CA2 und Subikulum als in CA1 findet sich in der Literatur [100] wieder. Demgegenüber ist ein konstanter Befund,

dass die Speicherung im Entorhinalen Kortex ausgeprägter als in den Feldern CA1-CA4 ist. Basalganglien, Basales Vorderhirn, Substantia nigra, Hirnnervenkerne und Ncl. ruber sind regelmäßig von der Speicherung betroffen. Im Kleinhirn finden sich in dieser Studie keine Cholesterinakkumulationen, obwohl hier regelmäßig Speicherneurone beschrieben wurden [25,48,61,100] und im Mausmodell zahlreiche Filipin-positive Granula nachweisbar waren [92,111,114]. Allerdings wurde der Kleinhirnbefund bereits als sehr variabel beschrieben [61].

Neurone, in denen Cholesterinakkumulationen auftreten, sind groß und stoffwechselaktiv und dürften zur Aufrechterhaltung ihres ausgeprägten Dendritenbaums und langen, myelinisierten Axons einen relativ hohen Cholesterinbedarf haben. Es ist daher plausibel, dass diese Neurone in besonderem Maße Cholesterin endozytieren, es auf Grund des NPC-Stoffwechseleffektes aber anreichern. Diese Anreicherungen würden dann im Filipin-Bild als die beobachteten Akkumulationen in großen Neuronen erscheinen.

6.2 Assoziation der Cholesterinspeicherung mit neurofibrillärer Degeneration im Niemann-Pick Typ C-Hirn

In 21 NPC-Patienten zwischen 10 und 62 Jahren [3,48,62,100,diese Studie] wurden NFT nachgewiesen. Ihr Vorkommen wurde als 'abundant' [3,48] oder 'many', 'numerous' [62,100] beschrieben. Dies dürfte einer numerischen Dichte an Tangles entsprechen, wie sie sonst erst im 7. Lebensjahrzehnt bei AD erreicht wird. In diesen 4 Studien [3,48,62,100], wobei in einer [100] 3 weitere Einzelfälle zitiert sind, wurden bei allen NPC-Patienten NFT gefunden. In den von mir untersuchten 5 Fällen wiesen 2 keine NFT auf, aber hierbei handelte es sich jeweils um sehr kleine Gewebeteile - Rückenmark und motorische Rinde - in denen auch bei AD selten NFT gefunden werden [107, S.176-178]. Es spricht also vieles dafür, dass NFT, zumindest bei älteren Patienten, ein regelmäßiger Befund bei NPC sind. Diese Assoziation begründet kein Kausalverhältnis. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen funktionsuntüchtigem NPC1-Protein und Entstehung von NFT wird jedoch durch die Beobachtung von NFT in zwei 52- bzw. 54-jährigen Patienten mit Deletionen im Genbereich 18q11-21 (18q-Syndrom) nahe gelegt [39]. Der Genlocus von NPC1 liegt bei 18q11 [14]. Ob bei 18q-Syndrom auch intrazelluläre Cholesterinspeicherung auftritt, ist nicht bekannt.

Die vorgefundene Verteilung der NFT deckt sich weit gehend mit Literaturangaben (Tab.5). Auftreten von NFT in Basalganglien, Thalamus und Mittelhirn scheint für NPC sehr charakteristisch, für AD eher ungewöhnlich zu sein [11;107, S.176-178]. Der bevorzugte Befall limbischer Strukturen ist ein Charakteristikum, das beide Erkrankungen teilen. NFT im Bereich der Substantia perforata anterior bei NPC weisen darauf hin, dass ihnen möglicherweise auch der Befall olfaktorischer Rindenbereiche gemeinsam sein könnte (Tab.4): bei AD ist der Bulbus olfactorius eines der von der neurofibrillären Pathologie zuerst betroffenen Gebiete [81]. Ein bevorzugtes Auftreten von NFT in granulären gegenüber agranulären Isokortexbereichen spricht für einen bevorzugten Befall von Assoziationsfeldern, wie er auch für AD charakteristisch ist [11,84].

Das Muster der Cholesterinspeicherung und der NFT kann auch die klinischen Symptome erklären. Es ist denkbar, dass abgesehen von der Assoziation hippokampal-entorhinaler Läsionen in Fällen N2 und N5 und amygdalärer Läsionen in Fall N2 mit Gedächtnisstörungen [57, S.436-438] Schluckstörungen in Fall N2 auf einen Befall des rostralen Ncl. ambiguus [57, S. 34-37] und supranukleäre vertikale Blicklähmungen in den Fällen N1 und N2 auf Schädigungen im Bereich des Tegmentum mesencephali dorsalis [45] zurückzuführen sind. Läsionen im Bereich der Basalganglien, Substantia nigra, Ncl. ruber und der ventralen Thalamuskern in den Fällen N1 und N2 könnten mit Störungen der Extrapyramidalmotorik im Sinne einer Dystonie assoziiert sein [57, S.50-51].

Die Assoziation der NFT mit Speicherneuronen im NPC-Hirn wurde bereits sowohl auf regionaler als auch auf zellulärer Ebene beschrieben [48,61,100]. In der vorliegenden Studie weisen Regionen mit Cholesterinspeicherung in der Regel NFT auf, solche ohne nennenswerte Akkumulationen, wie die agranulären Isokortexbereiche, sind ohne neurofibrilläre Veränderungen.

Eine Ausnahme stellt offensichtlich der Ncl. n. oculomotorii dar, dessen Neurone sehr ausgeprägte Akkumulationen zeigen, obwohl NFT so gut wie nie auftreten [100, diese Studie]. Möglicherweise spielt hier eine zellspezifische Tau-Isoformexpression eine Rolle: Untersuchungen an Ratten zeigten, dass Neurone, die aus dem Zentralen Nervensystem herausprojizieren, wie etwa die des Ncl. n. oculomotorii oder auch der agranulären, primär-motorischen Rinde, das Exon 4a exprimieren [30] - Neurone dieser Regionen weisen praktisch nie NFT auf [11,61].

Die Beobachtung intraneuronaler Cholesterinakkumulationen im AD-Hirn beschränkt sich auf einen Fall (A2), so dass es sich um einen Einzelbefund handeln könnte. Die granuläre Morphologie dieser Akkumulationen ist mit der in NPC-Hirnen vergleichbar (Abb.8 und 10). Unabhängig vom Fehlen solcher massiver granulärer Cholesterinakkumulationen haben bei AD die Tangle-tragenden Neurone höhere Cholesterinspiegel als benachbarte Tangle-freie Neurone. Interessant ist hierbei, dass bei NPC eine etwa dreimal stärkere Cholesterinanreicherung vorkommt als bei AD, und zwar in einem Lebensalter, in dem bereits so viele NFT vorhanden sind wie bei etwa dreimal älteren AD-Fällen.

Der Bestimmung der zeitlichen Sequenz des Auftretens beider Phänomene (Cholesterinakkumulation und NFT) hat zu berücksichtigen, dass Tangle-tragende Neurone eine Untergruppe der Neurone mit Akkumulationen darstellen. Unter der plausiblen Annahme, dass beide Veränderungen irreversibel sind, kann daraus geschlossen werden, dass eine bestimmte Neuronenpopulation zuerst Akkumulationen und dann NFT entwickelt, da man sonst auch Tangle-tragende Neurone ohne Akkumulationen beobachten müsste. Gestützt wird die Annahme, dass die Cholesterinspeicherung vor der Tangle-Bildung auftritt, durch die Beobachtung von Cholesterinanreicherungen zu einem Zeitpunkt (3,5 bzw. 10,5 Jahre [114]), zu dem bisher keine NFT beobachtet wurden. Diese zeitliche Sequenz könnte einer pathogenetischen entsprechen - die Anreicherung von Cholesterin und anderen Lipiden (freie Fettsäuren, Ganglioside etc.) trägt zur Tangle-Bildung bei - oder sie könnte bedeuten, dass bei einem beiden Phänomenen zu Grunde liegenden Defekt, nämlich dem Funktionsverlust des NPC1-Proteins, die Tangle-Bildung längere Zeit benötigt als die Ausbildung der Speicherung.

Zwei hypothetische Zusammenhänge zwischen einem NPC-Defekt und der Ausbildung von NFT sollen angeführt werden, sowie eine Hypothese, wie Cholesterinanreicherung selbst zur Tangle-Bildung beitragen könnte (**Abb.13b**):

(1) Defektes NPC1-Protein führt zur Anreicherung freier Fettsäuren im Zytosol, so dass die räumliche Voraussetzung für eine direkte Interaktion von Tau und freien Fettsäuren gegeben sind: NPC1-Protein kann als Permease fungieren: Expression des Proteins in *Escherichia coli* führte zur Anreicherung von Ölsäure im Zytosol, die Sequenz des Proteins zeigt Homologie zu prokaryotischen resistance-nodulation-division (RND)-Permeasen [19]. Die physiologische Bedeutung der Fettsäuretransportfunktion des Pro-

teins in der Säugerzelle ist nicht bekannt. Interessant ist dieser Befund hinsichtlich der Fähigkeit von freien Fettsäuren (FFS), zumindest in vitro die Aggregation von Tau zu Filamenten zu beschleunigen - die so in vitro geschaffenen Filamente weisen allerdings nicht die für PHF typische Helizität auf [108].

(2) Der NPC-Defekt führt zu Auflösung von Rafts, dadurch wird die Signaltransduktion in einer Weise beeinflusst, dass Tau phosphoryliert wird: Eine humane Zellkulturstudie zeigte, dass endozytiertes Cholesterin in NPC-Zellen stärker mit Rafts assoziiert ist als in Kontrollzellen, dass dieses Raft-assoziierte Cholesterin aber nicht in dem Maße wieder an der Zelloberfläche erscheint, wie das in Kontrollzellen der Fall ist [63]. Diese Ergebnisse können so interpretiert werden, dass Raft-Aufbau und -Transport bei NPC-Zellen gestört sind. Rafts sind mit Cholesterin und Sphingolipiden angereicherte Membrandomänen, die wichtige Funktionen in der Signaltransduktion übernehmen [96]. Auch Befunde an Striatumneuronen des Mausmodells weisen darauf hin, dass die Raft-vermittelte Signaltransduktion bei NPC gestört sein könnte: die Aktivierung des Raft-ständigen Rezeptors TrkB durch dessen Liganden brain-derived neurotrophic factor (BDNF) blieb im NPC-Hirn aus, während er in Kontrollzellen auf normale Weise erfolgte [44]. Löst man in T-Lymphozyten experimentell Rafts durch Cholesterinentzug mit einem externen Cholesterinakzeptor (Methyl- β -Zyklodextrin) auf, so wird der MAPK (Mitogen-aktivierte Kinasen)-Weg, messbar durch die Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener MAPK-abhängiger Proteine und die Bindung von ras an Raf, aktiviert [52]. Tatsächlich wurden in Hirnhomogenaten des NPC-Mausmodells erhöhte Spiegel der phosphorylierten (aktivierten) Formen der Tau-gerichteten MAPK gemessen [92]. Ein Weg, wie defektes NPC1-Protein über Störung der Raft-Funktion zur Tau-Phosphorylierung und möglicherweise zur Tangle-Bildung führen könnte, ist also denkbar, allerdings beeinflusst die Tau-Phosphorylierung durch MAPK nicht die Tau-Mikrotubuli-Bindung [66]. Die Loslösung von Tau von den Mikrotubuli wird aber als ein früher Schritt in der Tangle-Entstehung angesehen [28].

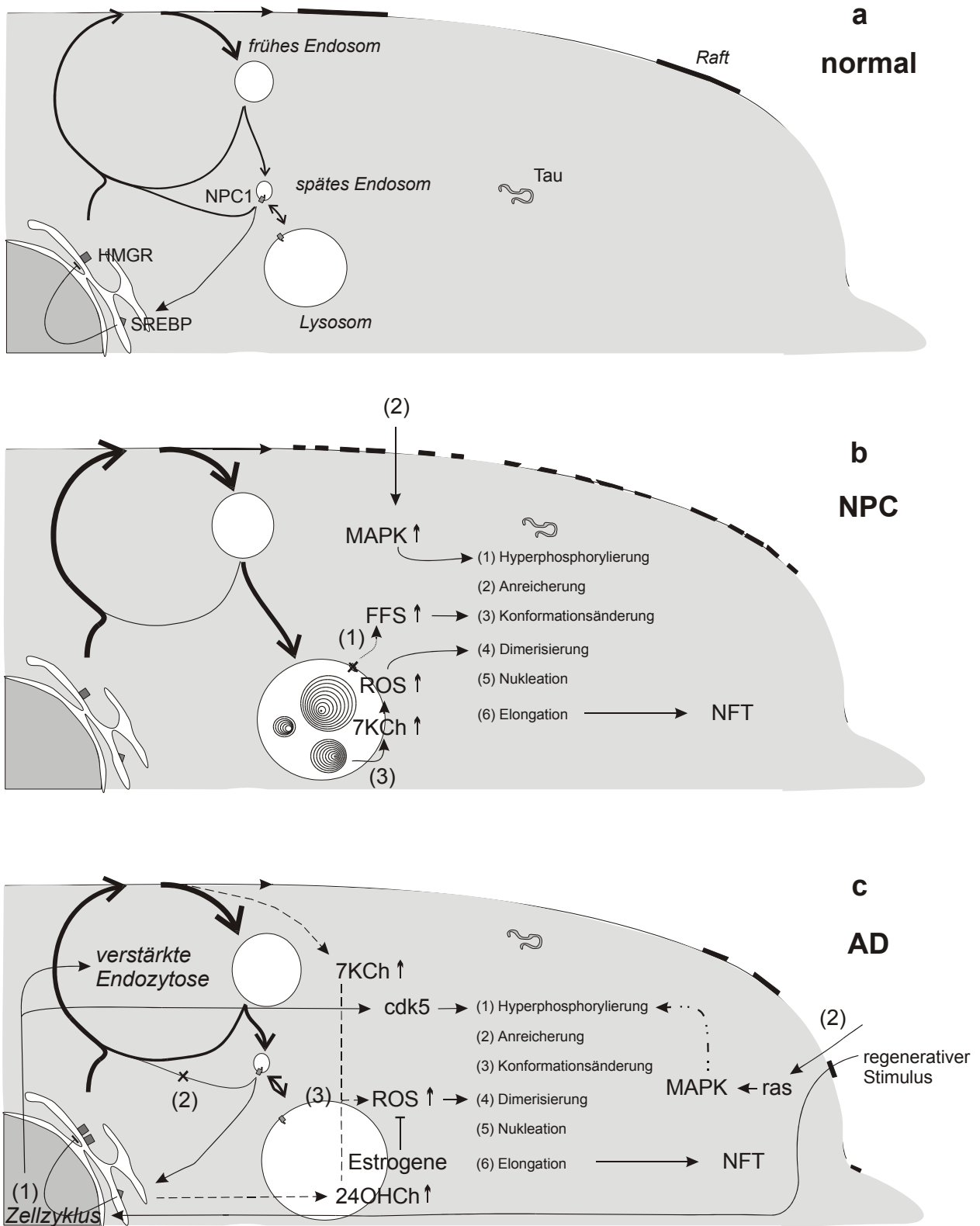


Abb. 14: Hypothetische Mechanismen, die in Niemann-Pick Typ C- (b) und Alzheimer-Neuronen (c) bei der Entstehung der neurofibrillären Degeneration und der Cholesterinanreicherung wirksam sein könnten. a: zum Vergleich die Verhältnisse in einer normalen Zelle. b: (1) defektes NPC1-Protein führt zur Anreicherung von freien Fettsäuren im Zytosol, diese führen zur Tau-Aggregation; (2) defektes NPC1-Protein führt zu Auflösung von Rafts, dadurch wird die Signaltransduktion in einer Weise beeinflusst, dass Tau phosphoryliert wird; (3) Cholesterinanreicherung an sich führt zu oxidativem Stress, der die Dimerisierung von Tau erleichtert; c: (1) regenerative Vorgänge führen zu einer Aktivierung des Zellzyk-

lus, zur Hyperphosphorylierung von Tau und zu erhöhter Aufnahme von Cholesterin; (2) Störung der Raft-Funktion führt zu geänderter Signaltransduktion, dadurch wird diese in einer Weise beeinflusst, dass Tau phosphoryliert wird; (3) erhöhtes Cholesterin unterhält ein nachteiliges oxidatives Milieu

(3) Cholesterinanreicherung an sich führt zu oxidativem Stress, der die Dimerisierung von Tau befördert: Autoxidation von Cholesterinliposomen erzeugt Oxycholesterine, v.a. 7-Ketocholesterin (7KCh), durch Gamma-Bestrahlung beschleunigte „Autoxidation“ führt darüberhinaus zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [94]. 7KCh ist als zytotoxisches Agens bekannt, es induziert Apoptose in einer mesenchymalen Zelllinie unter Entstehung von ROS [60]. ROS oxidieren vielfach ungesättigte Fettsäuren zum hochtoxischen 4-Hydroxy-2-Nonenal [67], welches die Aggregation von hyperphosphoryliertem Tau zu Filamenten unterstützt ([85], s. auch oben, Punkt (1)). Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass eine Apoptose vermutlich zu schnell von statten geht, als dass ein Tangle entstehen könnte. Als Schutzfaktor gegen Apoptose durch oxidativen Stress kommt in diesem Zusammenhang in erster Linie Glutathion in Frage, welches die 7KCh-induzierte Apoptose abzuwenden vermag [60] und 4-Hydroxy-2-Nonenal detoxifiziert [67]. Der Ansatzpunkt oxidativer Mechanismen bei der Tangle-Entstehung liegt wahrscheinlich bei der Disulfidbrückenbildung zwischen zwei Tau-Molekülen, der Dimerisierung [28].

Bei diesen Überlegungen darf die intrazelluläre Topologie nicht außer Acht gelassen werden. Sollten oxidative Prozesse bei der Tangle-Entstehung tatsächlich eine Rolle spielen, so müsste gesichert sein, dass die oxidativ wirksamen Moleküle wie 7KCh, 4-Hydroxy-2-Nonenal und ROS tatsächlich an ihren zytoplasmatischen Wirkungsort, das Tau-Molekül, gelangen und nicht etwa im Lysosom kompartimentalisiert bleiben. Hierzu liegen für NPC noch keine Daten vor.

6.3 Cholesterinanreicherung und neurofibrilläre Tangles in Alzheimer-Neuronen - drei spekulative Mechanismen

Da sich bei AD die Beobachtung von massiven, granulären Cholesterinakkumulationen auf einen Ausnahmefall (A2) beschränkte und Tangle-tragende Neurone nicht als Untergruppe der Neurone mit Akkumulationen angesprochen werden können, kann nicht wie bei NPC der Schluss gezogen werden, dass die Cholesterinanreicherung der Tangle-Bildung vorausgeht. Da bei AD zumindest ein vollständiger Funktionsausfall des

NPC1-Proteins außerdem offensichtlich fehlt, müssen bei AD andere Faktoren zur Pathogenese der NFT beitragen. Einbeziehung hier relevanter Befunde zur Pathogenese der neurofibrillären Degeneration, die an AD-Hirnen [2,15,16,29,31,74,85,90,111], Liquor von AD-Patienten [83], organotypischen Ratten-Sliceulturen [87], Maushirnen [1], Maus- [44] und Ratten-Neuronenkulturen [76,70,10], anderen Zellen [50,52,54,55,60] und in in vitro-Versuchen [7,94] erhoben wurden, führt zu einem komplexen Bild (**Abb.13c**).

Im Folgenden wird zunächst ein Mechanismus vorgestellt, der sowohl zu Tangle-Bildung als auch zu Cholesterinanreicherung führen könnte, dann wird in Anlehnung an das zu NPC Gesagte (s. 6.2., Punkte (2) und (3)) aufgezeigt, wie Cholesterinanreicherung die Tangle-Bildung auch bei AD unterstützen könnte.

(1) Regenerative Vorgänge führen zu einer Aktivierung des Zellzyklus, zur Hyperphosphorylierung von Tau und zu erhöhter Aufnahme von Cholesterin: Neurone, die von NFT befallen werden, sind auch die, die sich durch besondere Regenerationsfähigkeit im adulten Gehirn auszeichnen [2]. Tangle-tragende Neurone des Hippokampus weisen - zumindest in frühen Stadien der Erkrankung - einen ausgeprägteren Dendritenbaum auf als Tangle-freie Neurone [31]. Regenerative Vorgänge, so eine Hypothese von Nagy, Esiri und Smith [76], sollen auch in der Vorphase der Tangle-Entstehung über eine Stimulation durch Wachstumsfaktoren zu einer Aktivierung des Zellzyklus führen, wodurch das Neuron wieder in den Zyklus eintritt und sogar bis in Phase G₂ fortschreitet [76]. Tatsächlich zeigen AT8-immunopositive, aber noch keinen Tangle tragende Pyramidenzellen des Hippokampus von AD-Patienten Immunreaktivität gegen Zyklin B [74], ein Molekül des aktivierten Zellzyklus, das in postmitotischen Neuronen eigentlich nicht nachweisbar sein sollte. Eine Übersicht über den Nachweis weiterer Zellzyklus-assoziiierter Moleküle in Tangle-tragenden Neuronen findet sich bei den genannten Autoren [76]. Neurone, die die S-Phase passiert haben, sollten einen doppelten Chromosomensatz aufweisen. Tatsächlich konnte durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung eine Verdoppelung der Chromosomenmenge in 4% hippokampaler Pyramidenzellen von AD-Patienten nachgewiesen werden, während der gleiche Test für Kontrollhippokampi negativ ausfiel [111].

In der Zellzyklusphase G₂, in der sich eine Zelle auf die Zellteilung vorbereitet, die im postmitotischen Neuron gleichwohl offensichtlich nicht zur Durchführung kommen kann [111], könnte Tau im Rahmen der Mikrotubuli-Depolymerisierung hyperphosphoryliert werden: Menschliche Neuroblastomzellen, die durch Nocodazol in der Mitose festgehal-

ten werden, zeigen Tau-Phosphorylierungsmuster, die denen in AD-Gewebe entsprechen [50]. Durch Überexpression des Aktivators p25 der Zyklin-abhängigen Kinase cdk5 in Mäusehirnen ist es darüberhinaus gelungen, Hyperphosphorylierung von Tau zu induzieren, die durch AT8-Immunhistochemie detektiert werden kann [1]. Allerdings ist die Funktion von cdk5 innerhalb des Zellzyklus noch nicht geklärt [37].

Regenerative Vorgänge im zentralen Nervensystem sind nach einer Hypothese von Poirier [87] andererseits für vermehrte zelluläre Cholesterinaufnahme verantwortlich. Als Modell für diese Vorgänge werden organotypischen Slice-Kulturen von Ratten verwendet, bei denen der Hippokampus durch entorhinale Läsion deafferentiert ist [87]. Poirier [86] fasst den hypothetischen Ablauf der Reinnervierung des Hippokampus einschließlich der reaktiven Synaptogenese folgendermaßen zusammen: Astrozyten nehmen Membranen degenerierender Nervenfortsätze auf und synthetisieren und sezernieren Lipoproteine, die Cholesterin und ApoE enthalten; regenerierende Neurone nehmen diese Partikel auf und verwenden das endozytierte Cholesterin zum Membranaufbau und zur Synaptogenese. In ähnlicher Weise sollen vorgeschädigte Neurone im AD-Hirn in einem regenerativen Prozess vermehrt Cholesterin in lipoproteinähnlichen, mit ApoE versehenen Partikeln aufnehmen. Dieses Konzept erfuhr unlängst durch den Nachweis der Cholesterin- und ApoE-induzierten Synaptogenese in Ratten-Zellkulturen eine wesentliche Bestätigung [70]. Im Einklang mit vermehrter Cholesterinaufnahme vulnerabler Neurone stehen Befunde, die eine Größenzunahme von Endosomen und Lysosomen in Neuronen in frühen Stadien der Erkrankung zeigen [15]; in Pyramidenzellen von Regionen, die später bevorzugt NFT aufweisen, tritt diese Größenzunahme am frühesten auf [16].

(2) Störung der Raft-Funktion führt zu geänderter Signaltransduktion, dadurch wird diese in einer Weise beeinflusst, dass Tau phosphoryliert wird: Vor dem Hintergrund des NPC und AD gemeinsamen Befundes NFT regten Hinweise auf Raft-Dysfunktion bei NPC [44,63,92] bereits Sawamura und Mitarbeiter [92] und Lynch und Mobley [65] dazu an, die Raft-assoziierte Signaltransduktion auch bei AD mit der Tangle-Entstehung in Zusammenhang zu bringen. Befunde an Rattenneuronen, die zeigen, dass Cholesterin-ApoE3-Partikel das Aussprossen von Neuriten fördern, Cholesterin-ApoE4-Partikel dieses aber hemmen [77], ließen Lynch und Mobley hypothetisieren, dass ApoE4 weniger effektiv als ApoE3 Cholesterin in die intrazellulären Transportwege des Neurons ein-

schleust und in der Folge der Aufbau funktionsfähiger Rafts in Individuen mit ApoE ϵ 4-Allel gestört ist [65].

In unserem Zusammenhang ist wiederum von Bedeutung, dass experimentelle Raft-Auflösung den MAPK-Weg zu aktivieren vermag ([52], s.6.2., Punkt (2)). Vereinbar mit dem hier erhobenen Befund erhöhten Cholesterins in Tangle-tragenden Neuronen wäre ein Mechanismus, der darin besteht, dass bei AD, ähnlich wie bei NPC und wie auch von Lynch und Mobley vermutet [65], der Rücktransport endozytierten Cholesterins zur Plasmamembran gestört ist, dadurch der Aufbau funktionsfähiger Rafts unterbleibt und über eine Aktivierung des MAPK-Weges Tau phosphoryliert wird. Für eine Aktivierung dieses Weges in AD spricht die frühe Expressionssteigerung von ras [29].

(3) Erhöhtes Cholesterin unterhält ein nachteiliges oxidatives Milieu: 4-Hydroxy-2-Nonenal und andere Marker für oxidativen Stress sind in Tangle-tragenden Neuronen erhöht [67]. ROS könnten einerseits, wie oben (s. 6.2., Punkt (3)) ausgeführt, über Cholesterinautoxidation und Bildung von 7KCh entstehen [94] - 7KCh wirkt selbst proapoptisch [60] - andererseits auch über das durch CYP46 im Endoplasmatischen Retikulum gebildete 24OHCh [62]. 24OHCh-Inkubation von humanen Neuroblastomzellen führt zur Bildung von ROS und zur Apoptose [54,55]. Es ist im Liquor in frühen Demenzstadien erhöht, und zwar in Abhängigkeit von der Zahl der ApoE ϵ 4-Allele [83].

Wenn Tangle-tragende Neurone verstärkt cholesterininduziertem oxidativen Stress ausgesetzt sind, warum sterben sie dann nicht in der Apoptose? Tatsächlich zeigen Tangle-tragende Neurone Immunoreaktivität gegen in frühen Stadien der Apoptose aktivierte Caspasen [90], allerdings findet sich keine Immunoreaktivität gegen Caspasen der späten Apoptose [90] und Protein Bax, einem weiteren Marker der fortgeschrittenen Apoptose [76]. Dies gab zur Vermutung Anlass, dass Tangle-tragende Neurone die Fähigkeit haben, die begonnene Apoptose abzuwenden [76,90], was Raina und Mitarbeiter als 'abortosis' bezeichneten [90].

Zur Abwehr der drohenden, oxidativ induzierten Apoptose könnten auch Estrogene (Estron und 17 β -Estradiol) beitragen, die antioxidativ und zytoprotektiv wirken: sie reduzieren die Lipidperoxidation in primären Ratten-Neuronenkulturen und humanen Hirnhomogenaten [10], Gabe von 17 β -Estradiol verhindert 24OHCh-induzierte Apoptose von Neuroblastomzellen [54]. In Einklang mit einer Rolle oxidativer Mechanismen in der Tangle-Entstehung sind die hier vorliegenden Daten zu einer stärkeren Assoziation neuronaler Cholesterinanreicherung mit der Anwesenheit eines NFT bei Frauen gegen-

über Männern (s. 5.2., Tab.8), insofern ein Mangel an Estrogenen im Hirn von postmenopausalen Frauen eine Verstärkung oxidativer Mechanismen in der Tangle-Bildung nach sich ziehen könnte.

6.4 Assoziation von Cholesterinakkumulationen mit neuritischen Plaques im Alzheimer-Hirn

Der Befund einer Assoziation zwischen Senilen Plaques und Filipin-positiven Cholesterinakkumulationen (Abb.8) wurde von einer anderen Arbeitsgruppe unabhängig und zeitgleich erhoben [72]. Die Autoren stützten ihn mit einer auf Cholesterin-Oxidase basierenden Fluoreszenzhistochemie. Sie nehmen an, dass A β -Amyloid auf Grund seiner Bindungsfähigkeit für Cholesterin für die Ablagerungen verantwortlich zu machen ist. So zeigt eine von ihnen durchgeführte quantitative Analyse, dass die Akkumulationen nur mit reifen SP, nicht mit unreifen oder diffusen, assoziiert sind. Alle Arten von Plaques enthalten A β -Peptide, aber nur reife enthalten A β -Amyloid [69]. Reife Plaques enthalten im Gegensatz zu diffusen auch dystrophische Neuriten, die Tau-Aggregate enthalten und u.a. aus angeschwollenen Dendriten und präsynaptischen Endigungen bestehen [89]. Insofern sind die hier vorliegenden Befunde auch mit der Vorstellung vereinbar, dass die Cholesterinablagerung mit der Bildung dystrophischer Neurite in SP in Zusammenhang stehe.

7 Zusammenfassung

M. Niemann-Pick Typ C (NPC) ist eine juvenile Demenz mit intrazellulärer Anreicherung von freiem Cholesterin. M. Alzheimer (AD) ist eine senile Demenz, die mit einem Polymorphismus im Gen des Cholesterintransportproteins Apolipoprotein E (ApoE) assoziiert ist. Bei beiden Erkrankungen treten im Gehirn zahlreiche neurofibrilläre Tangles (NFT), bestehend aus Protein Tau, auf. Cholesterin, unverzichtbarer Bestandteil von Säugerzellmembranen, kann durch das Fluorochrom Filipin dargestellt werden. Es sollte mit einer Filipin-Färbung herausgefunden werden, ob sich bei beiden Erkrankungen der Cholesteringehalt Tangle-tragender Neurone von dem Tangle-freier unterscheidet. Zur Verfügung standen diverse Teile aus dem Zentralen Nervensystem von 5 NPC- und Gyri temporales superficiales von 9 AD-Fällen. Es wurde eine Methode entwickelt, durch die mittels Vergleich von Filipin-Intensitäten zweier Neurone ein objektives Maß für den Cholesteringehalt Tangle-tragender Neurone ermittelt werden konnte. In Material von 3 NPC-Fällen und 1 AD-Fall fanden sich intraneuronale, mit Tangles assoziierte Cholesterinakkumulationen. In 3 AD-Fällen fanden sich außerdem Cholesterinakkumulationen in Assoziation mit Senilen Plaques. Der Cholesteringehalt Tangle-tragender Neurone war in 6 Regionen der NPC-Fälle und in 3 AD-Fällen erhöht. Für alle Neuronenpaare der AD-Fälle insgesamt ergab sich ein erhöhter Cholesteringehalt des Tangle-tragenden Neurons. Zu Beginn der Untersuchung waren weder Cholesterinspeicherung im NPC-Hirn noch Assoziation von Cholesterin mit Senilen Plaques in AD bekannt. Methodische Gründe für das vormalige Übersehen der Cholesterinspeicherung im NPC-Hirn werden diskutiert. Cholesterinspeicherung im NPC-Hirn könnte über oxidativen Stress oder eine Veränderung der cholesterinabhängigen Signaltransduktion zur Tangle-Bildung führen. Vulnerable Subpopulationen von Neuronen könnten im Rahmen regenerativer Prozesse verstärkt Cholesterin endozytieren. Argumente für die Unterstützung der Tangle-Bildung durch Cholesterin über oxidativen Stress und veränderte Signaltransduktion in AD werden angeführt. Diese Untersuchung erlaubt, neue Hypothesen zu gemeinsamen Mechanismen der Tangle-Entstehung in AD und NPC zu formulieren.

8 Literatur

- 1 Ahljianian MK, Barraqueta NX et al.: Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000, *97*, 2910-2915,
- 2 Arendt T, Brückner MK et al.: Cortical distribution of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease matches the pattern of neurons that retain their capacity of plastic remodeling in the adult brain. *Neurosci*. 1998, *43*, 991-1002,
- 3 Auer IA, Schmidt ML et al.: Paired helical filament tau (PHFtau) in Niemann-Pick type C disease is similar to PHFtau in Alzheimer's disease. *Acta neuropathol*. 1995, *90*, 547-551,
- 4 Bachman DL, Wolf PA et al.: Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in a general population: The Framingham Study. *Neurology*. 1993, *43*, 515-519,
- 5 Bancher C, Brunner C et al.: Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1989, *477*, 90-99,
- 6 Bancher C, Jellinger K et al.: Correlations between mental state and quantitative neuropathology in the Vienna Longitudinal Study on Dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1996, *246*, 137-146,
- 7 Billingsley ML, Kincaid RL: Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J*. 1997, *323*, 577-591,
- 8 Blass JP: Pathophysiology of Alzheimer's syndrome. *Neurology*. 1993, *43(Suppl 4)*, S25-S38,
- 9 Börnig H, Geyer G: Staining of cholesterol with the fluorescent antibiotic "filipin". *Acta histochem*. 1974, *50*, 110-115,
- 10 Braak E, Braak H, Mandelkow EM: A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta neuropathol*. 1994, *87*, 554-567,
- 11 Braak H, Braak E: Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathol*. 1991, *82*, 239-259,
- 12 Brown MS, Goldstein JL: Multivalent feedback regulation of HMGCoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J Lipid Res*. 1980, *21*, 505-517,
- 13 Brown MS, Goldstein JL: A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999, *96*, 11041-11048,
- 14 Carstea ED, Morris JA et al.: Niemann-Pick C1 gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Sci*. 1997, *277*, 228-231,
- 15 Cataldo AM, Barnett JL et al.: Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. *J Neurosci*. 1997, *17*, 6142-6151,
- 16 Cataldo AM, Peterhoff CM et al.: Endocytic pathway abnormalities precede beta-amyloid deposition in sporadic Alzheimer's disease: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am J Pathol*. 2000, *157*, 277-286,
- 17 Corder EH, Saunders AM et al.: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Sci*. 1993, *261*, 921-923,
- 18 Cruz JC, Sugii S et al.: Role of Niemann-Pick type C1 protein in intracellular trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol. *J Biol Chem*. 2000, *275*, 4013-4021,
- 19 Davies RA, Chen FW, Ioannou YA: Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein. *Sci*. 2000, *290*, 2295-2298,

- 20 Demel RA, de Kruff B: The function of sterols in membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1976, *457*, 109-132,
- 21 Dietschy JM: Overview of cholesterol and lipoprotein metabolism in the brain, liver and extrahepatic organs. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 1997, *7*, 162-168,
- 22 Doll R: Review: Alzheimer's disease and environmental survival bias. *Age Ageing*. 1993, *22*, 138-153,
- 23 Edlund C, Söderberg M, Kristensson K: Isoprenoids in aging and neurodegeneration. *Neurochem Int*. 1994, *25*, 35-38,
- 24 Elleder M, Jirasek A, Smid F: Niemann-Pick disease (Crocker's type C) - a histochemical study of the distribution and of qualitative differences of the storage process. *Acta neuropathol*. 1975, *33*, 191-200,
- 25 Elleder M, Jirasek A, Smid F et al.: Niemann-Pick disease type C - study on the nature of the cerebral storage process. *Acta neuropathol*. 1985, *66*, 325-336,
- 26 Esler WP, Wolfe MS: A portrait of Alzheimer secretases - new features and familiar faces. *Sci*. 2001, *293*, 1449-1454,
- 27 Fielding CJ, Fielding PE: Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res*. 1997, *38*, 1503-1521,
- 28 Friedhoff P, von Bergen M et al.: Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochim Biophys Acta*. 2000, *1502*, 122-132,
- 29 Gärtner U, Holzer M, Arendt T: Elevated expression of p21ras is an early event in Alzheimer's disease and precedes neurofibrillary degeneration. *Neurosci*. 1999, *91*, 1-5,
- 30 Georgieff IS, Liem RKH et al.: Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems. *J Cell Sci*. 1993, *105*, 729-737,
- 31 Gertz HJ, Krüger H et al.: Tangle-bearing neurons show more extensive dendritic trees than tangle-free neurons in area CA1 of the hippocampus in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1991, *548*, 260-266,
- 32 Ghetti B, Tagliavini F et al.: Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. II. Neurofibrillary tangles and plaques with PrP-amyloid coexist in an affected family. *Neurology*. 1989, *39*, 1453-1461,
- 33 Gilbert EF, Callahan J et al.: Niemann-Pick disease type C - pathological, histochemical, ultrastructural and biochemical studies. *Eur J Pediatr*. 1981, *136*, 263-271,
- 34 Goate AM: Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Geriatrics*. 1997, *52*, S9-S12,
- 35 Goedert M: Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1996, *777*, 121-131,
- 36 Goedert M, Jakes R et al.: Assembly of microtubule-related protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature*. 1996, *383*, 550-553,
- 37 Grana X, Reddy PE: Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*. 1995, *11*, 211-219,
- 38 Grundke-Iqbal I, Iqbal K et al.: Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986, *83*, 4913-4917,
- 39 Halliday WC, Chudley AE: 18q-syndrome: neurofibrillary tangles without neuritic plaques. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1989, *48*, 308,
- 40 Harik SI, Kalaria RN: Blood-brain border abnormalities in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1991, *640*, 47-52,
- 41 Haroutunian V, Purohit DP et al.: Neurofibrillary tangles in nondemented elderly subjects and mild Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 1999, *56*, 713-718,

- 42 Harzer K, Schlote W et al.: Neurovisceral lipidosis compatible with Niemann-Pick disease type C: morphological and biochemical studies of a late infantile case and enzyme and lipid assays in a prenatal case of the same family. *Acta neuropathol.* 1978, *43*, 97-104,
- 43 Hassall DG, Graham A: Changes in free cholesterol content, measured by filipin fluorescence and flow cytometry, correlate with changes in cholesterol biosynthesis in THP-1 macrophages. *Cytometry.* 1995, *21*, 352-362,
- 44 Henderson LP, Lin L et al.: Embryonic striatal neurons from Niemann-Pick type C mice exhibit defects in cholesterol metabolism and neurotrophin responsiveness. *J Biol Chem.* 2000, *275*, 20179-29187,
- 45 Higgins JJ, Patterson MC et al.: A clinical staging classification for type C Niemann-Pick disease. *Neurology.* 1992, *42*, 2286-2290,
- 46 Hirano A, Malamud N et al.: Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Guam. *Arch Neurol.* 1966, *15*, 35-51,
- 47 Hof PR, Bouras C et al.: Differential distribution of neurofibrillary tangles in the cerebral cortex of dementia pugilistica and Alzheimer's disease cases. *Acta neuropathol.* 1992, *85*, 23-30,
- 48 Horoupian DS, Yang SS: Paired helical filaments in neurovisceral lipidosis (juvenile dystonic lipidosis). *Ann Neurol.* 1978, *4*, 404-411,
- 49 Hoyer S: Oxidative metabolism deficiencies in brains of patients with Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1996, *165*, 18-24,
- 50 Illenberger S, Zheng-Fischhöfer Q et al.: The endogenous and cell-cycle dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease. *Mol Biol Cell.* 1998, *9*, 1495-1512,
- 51 Kabara JJ: A critical review of brain cholesterol metabolism. *Prog Brain Res.* 1973, *40*, 363-382,
- 52 Kabouridis PS, Janzen J et al.: Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 2000, *30*, 954-963,
- 53 Ko DC, Gordon MD et al.: Dynamic movements of organelles containing Niemann-Pick C1 protein: NPC1 involvement in late endocytic events. *Mol Biol Cell.* 2001, *12*, 601-614,
- 54 Kölsch H, Ludwig M et al.: Neurotoxicity of 24-hydroxycholesterol, an important cholesterol elimination product of the brain, may be prevented by vitamin E and estradiol-17beta. *J Neural Transm.* 2001, *108*, 475-488,
- 55 Kölsch H, Lütjohann D et al.: The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res.* 1999, *818*, 171-175,
- 56 Kruth HS, Vaughan M: Quantification of low density lipoprotein binding and cholesterol accumulation by single human fibroblasts using fluorescence microscopy. *J Lipid Res.* 1980, *21*, 123-130,
- 57 Kunze K: *Lehrbuch der Neurologie.* Stuttgart, 1992
- 58 Lange Y, Ye J et al.: Dynamics of lysosomal cholesterol in Niemann-Pick type C and normal human fibroblasts. *J Lipid Res.* 2002, *43*, 198-204,
- 59 Lee VMY, Balin BJ et al.: A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Sci.* 1991, *251*, 675-678,
- 60 Lizard G, Gueldry S et al.: Glutathione is implied in the control of 7-ketocholesterol-induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production. *FASEB J.* 1998, *12*, 1651-1663,
- 61 Love S, Bridges LR, Case CP: Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. *Brain.* 1995, *118*, 119-129,

- 62 Lund EG, Gulleyardo JM, Russell DW: cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999, *96*, 7238-7243,
- 63 Lusa S, Blom TS et al.: Depletion of rafts in late endocytic membranes is controlled by NPC1-dependent recycling of cholesterol to the plasma membrane. *J Cell Sci*. 2001, *114*, 1893-1900,
- 64 Lütjohann D, Breuer O et al.: Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain to the circulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996, *93*, 9799-9804,
- 65 Lynch C, Mobley W: Comprehensive theory of Alzheimer's disease: the effects of cholesterol on membrane receptor trafficking. *Ann N Y Acad Sci*. 2000, *924*, 104-111,
- 66 Mandelkow EM, Schweers O et al.: Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein. *Ann N Y Acad Sci*. 1996, *777*, 96-106,
- 67 Markesbery WR: Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Rad Biol Med*. 1997, *23*, 134-147,
- 68 Masliah E, Terry RD, Alford M et al.: Cortical and subcortical patterns of synaptophysinlike immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 1991, *138*, 235-246,
- 69 Masliah E, Terry RD, Mallory M et al.: Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 1990, *137*, 1293-1297,
- 70 Mauch DH, Nägler K et al.: CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Sci*. 2001, *294*, 1354-1357,
- 71 Mercken M, Vandermeeren M et al.: Monoclonal antibodies with selective specificity for Alzheimer tau are directed against phosphatase-sensitive epitopes. *Acta neuropathol*. 1992, *84*, 265-272,
- 72 Mori T, Paris D et al.: Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APPSW mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001, *60*, 778-785,
- 73 Mortimer JA, French LR et al.: Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease. *Neurology*. 1985, *35*, 264-267,
- 74 Nagy Z, Esiri MM, Cato AM et al.: Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Acta neuropathol*. 1997, *94*, 6-15,
- 75 Nagy Z, Esiri MM, Jobst KA et al.: Influence of the apolipoprotein E genotype on amyloid deposition and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease. *Neurosci*. 1995, *69*, 757-761,
- 76 Nagy Z, Esiri MM, Smith AD: The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neurosci*. 1998, *87*, 731-739,
- 77 Nathan BP, Bellosta S et al.: Differential aspects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Sci*. 1994, *264*, 850-852,
- 78 Naureckiene S, Sleat DE et al.: Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Sci*. 2000, *290*, 2298-2301,
- 79 Norman RM, Forrester RM, Tingey AH: The juvenile form of Niemann-Pick disease. *Arch Dis Childh*. 1967, *42*, 91-96,
- 80 Notkola IL, Sulkava R et al.: Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology*. 1998, *17*, 14-20,
- 81 Ohm TG, Braak H: Olfactory bulb changes in Alzheimer's disease. *Acta neuropathol*. 1987, *73*, 365-369,
- 82 Panchuk-Voloshina N, Haugland RP et al.: Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J Histochem Cytochem*. 1999, *47*, 1179-1188,

- 83 Papassotiropoulos A, Lütjohann D et al.: 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *J Psychiatr Res.* 2002, *36*, 27-32,
- 84 Pearson RCA, Esiri MM et al.: Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985, *82*, 4531-4534,
- 85 Perez M, Cuadros R et al.: Phosphorylated, but not native, tau protein assembles following reaction with the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal. *FEBS Lett.* 2000, *486*, 270-274,
- 86 Poirier J: Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *TINS.* 1994, *17*, 525-530,
- 87 Poirier J, Baccichet A et al.: Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neurosci.* 1993, *55*, 81-90,
- 88 Poirier J, Davignon J et al.: Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet.* 1993, *342*, 697-699,
- 89 Probst A, Langui D, Ulrich J: Alzheimer's disease: a description of the structural lesions. *Brain Pathol.* 1991, *1*, 229-239,
- 90 Raina AK, Hochman A et al.: Abortive apoptosis in Alzheimer's disease. *Acta neuropathol.* 2001, *101*, 305-310,
- 91 Richmond W: Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin Chem.* 1973, *19*, 1350-1356,
- 92 Sawamura N, Gong JS et al.: Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice. *J Biol Chem.* 2001, *276*, 10314-10319,
- 93 Schroeder F, Holland JF, Bieber LL: Fluorometric investigations of the interaction of polyene antibiotics with sterols. *Biochemistry.* 1972, *11*, 3105-3111,
- 94 Sevanian A, McLeod LL: Cholesterol autoxidation in phospholipid membrane bilayers. *Lipids.* 1987, *22*, 627-636,
- 95 Severs NJ, Robenek H: Detection of microdomains in biomembranes. *Biochim Biophys Acta.* 1983, *737*, 373-408,
- 96 Simons K, Ikonen E: How cells handle cholesterol. *Sci.* 2000, *290*, 1721-1726,
- 97 Sparks DL: Coronary heart disease, hypertension, apoE, and cholesterol: a link to Alzheimer's disease?. *Ann N Y Acad Sci.* 1997, *826*, 128-146,
- 98 Spillantini MG, Goedert M: Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *TINS.* 1998, *21*, 428-433,
- 99 Sumpter PQ, Mann DMA et al.: An ultrastructural analysis of the effects of accumulation of neurofibrillary tangles in pyramidal neurons of the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1986, *12*, 305-319,
- 100 Suzuki K, Parker CC et al.: Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. *Acta neuropathol.* 1995, *89*, 227-238,
- 101 Svennerholm L, Gottfries CG: Membrane lipids, selectively diminished in Alzheimer brains, suggest synapse loss as a primary event in early-onset form (type 1) and demyelination in late-onset form (type 2). *J Neurochem.* 1994, *62*, 1039-1047,
- 102 Vanier MT: Lipid changes in Niemann-Pick disease type C brain: personal experience and review of the literature. *Neurochem Res.* 1999, *24*, 481-489,
- 103 Vanier MT, Rodriguez-Lafrasse C et al.: Type C Niemann-Pick disease: biochemical aspects and phenotypic heterogeneity. *Dev Neurosci.* 1991, *13*, 307-314,
- 104 Vanier MT, Suzuki K: Recent advances in elucidating Niemann-Pick C disease. *Brain Pathol.* 1998, *8*, 163-174,
- 105 Vedder H, Anthes N et al.: Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of the central nervous system. *J Neurochem.* 1999, *72*, 2531-2538,

- 106 Weaver CL, Espinoza M et al.: Conformational change as one of the earliest alterations of tau in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000, *21*, 719-727,
- 107 Weis S, Weber G: *Handbuch Morbus Alzheimer*. Weinheim, 1997
- 108 Wilson DM, Binder LI: Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides - in vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 1997, *150*, 2181-2195,
- 109 Wisniewski K, Jervis GA et al.: Alzheimer neurofibrillary tangles in diseases other than senile and presenile dementia. *Ann Neurol*. 1979, *5*, 288-294,
- 110 Wolozin B, Kellman W et al.: Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol*. 2000, *57*, 1439-1443,
- 111 Yamada A, Saji M et al.: Progressive neuronal loss in the ventral posterior lateral and medial nuclei of thalamus in Niemann-Pick disease type C mouse brain. *Brain Dev*. 2001, *23*, 288-297,
- 112 Yang Y, Geldmacher DS, Herrup K: DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2001, *21*, 2661-2668,
- 113 Yoshitake T, Kiyohara Y et al.: Incidence and risk factors of vascular dementia and Alzheimer's disease in a defined elderly Japanese population: The Hisayama Study. *Neurology*. 1995, *45*, 1161-1168,
- 114 Zervas M, Dobrenis K, Walkley SU: Neurons in Niemann-Pick disease type C accumulate ganglioside as well as unesterified cholesterol and undergo dendritic and axonal alterations. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001, *60*, 49-64.

Danksagung

Die Durchführung der Untersuchungen in der dargestellten Form wurde mir durch ein Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 423-1 „Klinische und Kognitive Neurowissenschaft“ der Humboldt- und der Freien Universität zu Berlin ermöglicht.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Th. G. Ohm für die Vergabe des Themas, die Zurverfügungstellung von Räumlichkeiten und Gerätschaften und für richtungsweisende Anregungen.

Ich danke besonders Herrn Dr. V. Meske für kenntnisreiche Anleitung und Betreuung in zellbiologischen Methoden und für anregende Diskussionen. Ich danke Frau R. Zarski für Betreuung in histologischen und Herrn Dr. C. Jacobi für Betreuung in molekularbiologischen Methoden, Herrn F. Albert für Betreuung in Zellkulturtechniken. Ich danke den Herren M. Bien, J. Schwarze und D. Richter für technische Assistenz.

Ich danke Herrn Prof. Dr. K. Harzer für die Zurverfügungstellung von M. Niemann-Pick Typ C-Hirnmaterial.

Ich danke den Herren Dr. T. Hartmann, M. Michikawa, PhD, L. I. Binder, PhD, M. A. Pappolla, PhD und R. N. Martins, PhD, für bereichernde Diskussionen am Posterboard.

Lebenslauf

- 1972** 05. 12.: geboren in Kandel in der Pfalz
- 1979-1983** Besuch der Grundschule in Jockgrim in der Pfalz
- 1983-1991** Besuch des Europa-Gymnasiums in Wörth am Rhein
- 1991** 27. 06.: Erlangung der Hochschulreife
- 1991/1992** Ableistung des Zivildienstes im Kreis-krankenhaus in Kandel und in der Individuellen Schwerstbehindertenbetreuung in Jockgrim
- 1992-2000** 15. 09. 1992 - 31. 03. 2000: Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
- 1995, 1997, 1999** Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung, des Ersten bzw. des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung in Gießen
- 1999/2000** 01. 07. 1999 - 31. 03. 2000: Studium der Philosophie und Komparatistik an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
- 2000-2002** Studium der Humanmedizin an der Charité, 25. 06. 2002: Bestehen der Ärztlichen Prüfung in Berlin
- 2002** seit 01.08.: Arzt im Praktikum am Evangelischen Krankenhaus Königin Elisabeth Herzberge, Akademisches Lehrkrankenhaus der Charité, Abteilung für Psychiatrie und Psychotherapie

Publikationsliste

Distl, R.; Meske, V.; Ohm, T. G. (2001): Tangle-bearing neurons contain more free cholesterol than adjacent tangle-free neurons, *Acta Neuropathol. (Berl)* 101: 547-554

Distl, R.; Treiber-Held, S. et al. (2003): Cholesterol storage and tau pathology in the brain in Niemann-Pick type C disease, *J. Pathol.* 200: 104-111

Treiber-Held, S.; Distl, R. et al. (2003): Spatial and temporal distribution of intracellular free cholesterol in brains of Niemann-Pick type C mouse model showing hyperphosphorylated tau. Implications for Alzheimer's disease, *J. Pathol.* 200: 95-103

Ohm, T. G.; Treiber-Held, S.; Distl, R. et al. (2003): Cholesterol and tau-protein - Findings in Alzheimer's and Niemann Pick C's disease, *im Druck in Psychopharmacology*

Ohm, T. G.; Glöckner, F. ; Distl, R. et al. (2003): Plasticity and the spread of Alzheimer's disease-like changes, *zur Veröffentlichung eingereicht*

ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

Die vorliegende Dissertation habe ich selbst ohne Hilfe Dritter verfasst. Kein Teil dieser Dissertation ist von anderen Arbeiten kopiert.

Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Alle Quellen und Hilfsmittel sind vollständig angegeben.

Ich habe bisher weder an der Humboldt-Universität noch an einer anderen Universität ein Promotionsverfahren beantragt.