

**Zum Einfluss von *Ginkgo biloba*-Extrakt (EGb761) und seiner  
Komponenten auf die Expression von Transthyretin im Maushirn:  
eine immunhistochemische Studie**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Tobias May  
geboren am 14.12.1981 in Koblenz

angefertigt am:

Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung  
Abteilung Molekulare Bildgebung  
Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Betreuer:

Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schliebs  
Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Härtig

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 18.03.2014

## **Bibliographische Beschreibung**

May, Tobias

Zum Einfluss von *Ginkgo biloba*-Extrakt (EGb761) und seiner Komponenten auf die Expression von Transthyretin im Maushirn: eine immunhistochemische Studie

Universität Leipzig, Dissertation

93 Seiten, 186 Literaturangaben, 17 Abbildungen, 4 Tabellen

### Referat:

Mit über 35 Millionen Betroffenen weltweit ist die Alzheimersche Erkrankung (AD) die häufigste Demenzerkrankung in westlichen Industrieländern. Durch stetig steigende Prävalenz, gekoppelt mit der zunehmenden Lebenserwartung, erfährt die AD eine immer schwerwiegendere ökonomische und soziale Bedeutung, zumal es bis heute keine wirksame Therapie gibt. Entsprechend ist für mögliche Therapieansätze dieser Erkrankung ein genaues Verständnis der neuropathologischen Mechanismen unerlässlich. So werden neben Therapien, die die cholinerge Hypofunktion und damit auch die zwei weiteren Hauptmerkmale (Amyloid-Plaques und neurofibrilläre Tangles) der AD positiv beeinflussen, auch viele weitere Therapieansätze geprüft. So weiß man, dass einige Substanzen die Expression verschiedener Proteine im Gehirn beeinflussen können, die eine mögliche Rolle bei der Pathogenese der AD spielen. Vor allem untersucht die vorliegende Arbeit, ob eine chronische Behandlung mit dem *Ginkgo biloba*-Extrakt EGb761 eine veränderte Expression der Proteine Transthyretin (TTR), Prolaktin, Gesamt-Tau und Wachstumshormon (GH) in Hirnen von Mäusen bewirkt. Diese Marker zeigten sich in Mikroarray-Vorversuchen in Hirnmaterial von mit *Ginkgo biloba* behandelten Mäusen auf Ebene der Genexpression verändert. Veränderungen werden in verschiedenen Fütterungsgruppen dargestellt und diskutiert. Hierzu wird das Methodenspektrum der Immunhistochemie sowie der computergestützten Bildanalyse mittels Densitometrie genutzt. EGb761 sowie im Besonderen dessen Flavonoid-Fraktion bewirkten – im Vergleich zur Kontrollgruppe – eine signifikant erhöhte Immunreaktivität des Proteins Transthyretin in der hippokampalen Formation, während die Terpenoid-Fraktion keine Wirkung auslöste. Die übrigen Marker erschienen unbeeinflusst. Die Ergebnisse werden sowohl im Zusammenhang mit der aktuellen Literatur zu AD als auch mit verschiedenen, vermeintlich neuroprotektiven Proteinen diskutiert.

*meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Die Alzheimer'sche Erkrankung</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Klinik und Diagnostik.....	1
1.1.2 Ätiologie und Pathologie der AD .....	3
1.1.2.1 $\beta$ -Amyloidplaques und A $\beta$ .....	4
1.1.2.2 Tau-Protein und neurofibrilläre Tangles.....	6
1.1.2.3 Weitere pathophysiologische Aspekte der AD.....	8
1.1.3 Therapeutische Ansätze zur Behandlung von AD.....	10
<b>1.2 <i>Ginkgo biloba</i> – ein potentielles Phytotherapeutikum zur symptomatischen Behandlung der AD?</b> .....	<b>12</b>
1.2.1 Der <i>Ginkgo biloba</i> -Extrakt EGb761 .....	12
<b>1.3 EGb761 und die Genexpression verschiedener Proteine.....</b>	<b>14</b>
<b>2 Problemstellung</b> .....	<b>18</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 Chemikalien</b> .....	<b>19</b>
3.1.1 <i>Ginkgo biloba</i> -Extrakte .....	19
3.1.2 Verwendete Antikörper .....	20
<b>3.2 Geräte und EDV-Programme</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3 Verwendetes Hirnmaterial</b> .....	<b>21</b>
<b>3.4 Anfertigung der Hirnschnitte</b> .....	<b>23</b>
<b>3.5 Immunhistochemie</b> .....	<b>23</b>
3.5.1 Auswahl der Hirnschnitte .....	23
3.5.2 Durchführung der Immunhistochemie.....	24
3.5.2.1 Immunperoxidase-Nachweis von Transthyretin.....	25
3.5.2.2 Immunfluoreszenz .....	27
3.5.2.3 Immunhistochemische Kontrollen.....	28
<b>3.6 Visuelle Auswertung der immunhistochemischen Präparate</b> .....	<b>29</b>
<b>3.7 Semiquantitative Auswertung ausgewählter immunhistochemischer Präparate</b> .....	<b>29</b>
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1 Immunhistochemie zum Nachweis von Wachstumshormon (GH).....</b>	<b>33</b>
<b>4.2 Immunhistochemie zum Nachweis von Prolaktin.....</b>	<b>34</b>
4.2.1 Normalverteilung im Maushirn .....	34
4.2.2 Prolaktin-Expression nach <i>Ginkgo biloba</i> -Behandlung .....	35
<b>4.3 Immunhistochemie zum Nachweis von Gesamt-Tau.....</b>	<b>36</b>

4.3.1 Normalverteilung von Gesamt-Tau im Maushirn.....	36
4.3.2 Gesamt-Tau Expression nach <i>Ginkgo biloba</i> -Behandlung.....	37
4.3.3 Vergleich von Gesamt-Tau und Phospho-Tau im <i>post mortem</i> Hirngewebe von Alzheimer-Patienten .....	38
<b>4.4 Immunhistochemie zum Nachweis von Transthyretin .....</b>	<b>39</b>
4.4.1 Normalverteilung im Hippokampus .....	39
4.4.2 TTR-Expression nach <i>Ginkgo biloba</i> -Behandlung .....	43
<b>4.5 Semiquantifizierung der TTR-Immunmarkierung .....</b>	<b>44</b>
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1 Methodische Betrachtungen.....</b>	<b>56</b>
5.1.1 Verwendetes Hirnmaterial .....	56
5.1.2 Immunhistochemische Methoden .....	57
5.1.3 Semiquantitative Auswertung und Densitometrie .....	58
<b>5.2 Detektion von GH- und Prolaktin-Immunreaktivität .....</b>	<b>59</b>
5.2.1 Wachstumshormon (GH).....	59
5.2.2 Prolaktin-Immunreaktivität.....	60
<b>5.3 Immunhistochemische Darstellung des Tau-Gesamtproteins .....</b>	<b>62</b>
<b>5.4 TTR-Immunreaktivität im Hippokampus.....</b>	<b>63</b>
<b>5.5 Schlussfolgerung und Ausblick.....</b>	<b>67</b>
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>69</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>73</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>94</b>
<b>Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....</b>	<b>95</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACh	Azetylcholin
AChE	Azetylcholinesterase
AD	englisch: Alzheimer's Disease (Alzheimersche Erkrankung)
ADRDA	Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
ANOVA	Univariante Varianzanalyse
ApoE	Apolipoprotein E
ApoA-I	Apolipoprotein A bis I
APP	englisch: Amyloid Precursor Protein
APPBP1	englisch: Amyloid Precursor Protein Binding Protein 1
A $\beta$	$\beta$ -Amyloid
BACE-1	englisch: $\beta$ -site of APP Cleaving Enzyme
CA1-3	Subfelder der hippokampalen Formation; Cornu ammonis (Ammonshorn) CA1, CA2 und CA3
CSF	englisch: Cerebrospinal Fluid
Cy2	Carbocyanin 2
Cy3	Indocarbocyanin
DAB	Diaminobenzidin
DG	englisch: Dentate Gyrus (Gyrus dentatus)
DHC	englisch: Dorsal Hippocampal Commissure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM-IV	englisch: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV
D3V	Dritter Ventrikel
FTD	Frontotemporale Demenz
GH	englisch: Growth Hormone (Wachstumshormon)
GH/IGH-1-Achse	englisch: Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor-Achse
GHRH	englisch: Growth Hormone Releasing Hormone
hGH	englisch: human Growth Hormone
HRP	englisch: Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HVL	Hypophysenvorderlappen
IGF-1	englisch: Insulin-like Growth Factor 1

IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
LSM	Laserscanning-Mikroskop
MCI	englisch: Mild Cognitive Impairment
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NDS	englisch: Normal Donkey Serum (Esel-Normalserum)
NEP	Neprilysin
NFT	Neurofibrilläre Tangles
NINCDS	englisch: National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and Stroke
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PC12-Zellen	englisch: Pheochromocytoma derived cells of rats
PET	Positronemissionstomographie
PHF	englisch: Paired Helical Filament
p-Tau	Hyperphosphoryliertes Tau-Protein
p-Tau <sub>181</sub>	an Position Threonin (T) 181 phosphoryliertes Tau-Protein
p-Tau <sub>231</sub>	an Position Threonin (T) 231 phosphoryliertes Tau-Protein
ROD	Relative Optische Dichte
SEM	Standardfehler
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TRH	englisch: Thyreotropin Releasing Hormone
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTR	Transthyretin (Präalbumin)

SI- und SI-konforme Einheiten sind nicht aufgeführt

## 1 Einleitung

### 1.1 Die Alzheimersche Erkrankung

Der deutsche Psychiater und Neuropathologe Dr. Alois Alzheimer (1864-1915) entdeckte im Jahre 1906 bei einer seiner Patientinnen ein bis dahin unbekanntes Krankheitsbild. Es handelte sich um die damals 51jährige Patientin Auguste D., bei der ein rasch fortschreitender Gedächtnisverlust, eine veränderte Persönlichkeit, sowie Paranoia und Größenwahn beschrieben wurde (Alzheimer 1907, Drachmann et al. 1991). Mit 56 Jahren verstarb die Patientin, und bei einer von Alzheimer durchgeführten *post-mortem*-Untersuchung sowohl des Neokortex als auch des Hippokampus, fielen ihm erstmals Ablagerungen extrazellulärer Natur sowie intrazelluläre Neurofibrillenbündel auf. Zusammen mit dem Untergang von Synapsen und Neuronen, gekoppelt mit Neurotransmitter-Defiziten machen seine Funde noch heute die Diagnose dieses Krankheitsbildes aus (McGeer et al. 1984). Schließlich benannte Kraepelin 1910 die Gesamtheit des von Alzheimer beschriebenen klinisch-pathologischen Erscheinungsbildes nach ihm (Bick 1994).

Mit über 35 Millionen Betroffenen weltweit ist die Alzheimersche Erkrankung (AD) die häufigste Demenzerkrankung in westlichen Industrieländern. Menschen im Alter von über 65 Jahren haben ein erhöhtes Risiko, von der Alzheimerschen Demenz betroffen zu sein, wobei sich die Prävalenz im Alter zwischen 65 und 85 alle 5 Jahre verdoppelt, mit 1275 neuen Fällen pro Jahr pro 100.000 Menschen, die älter als 65 Jahre sind (Hirtz et al. 2007).

Zu unterscheiden ist eine sporadische bzw. senile Form der AD, die sich meist erst im Alter von über 60 Jahren manifestiert, von einer durch autosomal dominante, genetische Defekte verursachten familiären Form der Erkrankung, die im 3. oder 4. Lebensjahrzehnt ihren Erkrankungsbeginn zeigt (St. George-Hyslop 2000). Die erwähnten familiären Formen machen nur maximal 5% der Gesamtzahl der Erkrankungsfälle aus, d.h. ein sehr großer Anteil der Patienten leidet unter der sporadischen Form der AD. Durch die große Anzahl von Erkrankten, gekoppelt mit der zunehmenden Lebenserwartung, erfährt die AD eine immer schwerwiegendere ökonomische, gesundheitspolitische und soziale Bedeutung, zumal es bis heute keine wirksame Therapie gibt.

#### 1.1.1 Klinik und Diagnostik

Klinisch ist die AD durch den sukzessiven Verlust höherer kortikaler Funktionen charakterisiert. Es wird bei dieser Krankheit ein schleichender Beginn mit nichtkognitiven



Frühsymptomen wie Sinnestäuschungen, Störung des Antriebs sowie der Psychomotorik und gar Wahn beobachtet (Heidrich et al. 1997). Im Anschluss daran verlieren die Patienten zumeist ihr Kurzzeitgedächtnis, zeigen eine verminderte Lernfähigkeit, herabgesetzte Aufmerksamkeit sowie eine gestörte zeitliche und räumliche Orientierung. Langzeitgedächtnis, Assoziationsvermögen, Sprache sowie weitere höhere Funktionen wie Urteilsvermögen und Entscheidungsfindung zeigen sich im weiteren Verlauf eingeschränkt (Sandbrink und Beyreuther 1997, Review; Drachman et al. 1991; Wells 1995), wobei es zu Plateauphasen ohne fortschreitende Symptomatik kommen kann (Almkvist und Windblad 1999). Auch sich im weiteren Krankheitsverlauf verstärkende Verhaltensstörungen, wie Stimmungslabilität und Apathie, die sich frühzeitig zeigen, oder für die mittlere und späte Phase charakteristische Störungen wie Psychosen und Agitation, sind typisch (Kawas 2003; Mega et al. 1996). Drei bis neun Jahre nach Diagnosestellung führt die Erkrankung zum Tode – nicht zuletzt durch diverse Sekundärerkrankungen wie Lungen- und Harnwegsentzündungen bei endgültiger Bettlägerigkeit (Querfurth und LaFerla 2010, Review).

Diagnostisch bleibt die AD schwierig, hauptsächlich aufgrund der möglichen mannigfaltigen Differentialdiagnose. Zu nennen wären vaskuläre Demenz und Lewy-Body-Demenz, die nach der AD als wichtigste Demenzformen gelten, Demenz bei Morbus Parkinson, Depression, Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, progressive Paralyse, Frontallappendegeneration, Morbus Pick, Normaldruck-Hydrozephalus, Suchtleiden, Stoffwechselstörungen, Hypovitaminosen, Infektionskrankheiten, Tumorerkrankungen, und Epilepsien. (Möller et al. 2001; Dubois et al. 2007). Die Kriterien des DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) helfen meist beim Erkennen einer Demenz im Allgemeinen (Kawas 2003). Für die Diagnose der AD sind jedoch die gründliche klinische Untersuchung, sowie eine lückenlose Anamnese mit Familienanamnese gemeinsam mit neurophysiologischen Tests notwendig, da gerade im Frühstadium eine definitive Diagnose nur durch Hirnbiopsie oder *post mortem* durch eine Autopsie möglich wäre (Burns und Iliffe 2009, Review). Die verbindliche Diagnose der AD erfolgt jedoch meist basierend auf den Kriterien der NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association). Diese Kriterien unterscheiden in Bezug auf die Einschätzung der Krankheit zwischen definitiver Diagnose (klinische Diagnose und histologische Bestätigung), wahrscheinlicher Diagnose (klinische Diagnose ohne histologische Bestätigung) und möglicher Diagnose (atypische klinische Symptome, jedoch keine Alternativdiagnose und keine histologische Bestätigung; McKhann et al. 1984).

Eine immer größere Rolle bei der Diagnosefindung spielen bildgebende Verfahren, wie Positronenemissionstomographie (PET) oder Magnetresonanztomographie (MRT; Kawas 2003), da sie strukturelle Veränderungen wie die Hirnatrophie, vor allem der Hippokampi sowie des temporalen und entorhinalen Kortex bei der AD nachweisen können (Schott et al. 2003).

Unter den für die Diagnose der AD relevanten Biomarkern ist das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau hervorzuheben, dessen histochemische Analyse auch Teil der vorliegenden Arbeit ist. Dieses Protein besitzt ca. 30 mögliche Phosphorylierungsstellen. Hyperphosphoryliertes Tau (p-Tau) ist ein Hauptbestandteil der Neurofibrillenbündel. Derartige neurofibrilläre Tangles (NFT) sind ein wichtiges histopathologisches Charakteristikum der AD. Darüber hinaus ist p-Tau in der zerebrospinalen Flüssigkeit (CSF = cerebrospinal fluid) nachweisbar und gilt als für die Alzheimer-Diagnostik geeigneter Marker. Erhöhte Werte sowohl von p-Tau als auch von Gesamt-Tau korrelieren mit verschlechterten Ereignissen der Probanden bei kognitiven Tests (Wallin et al. 2006). Verschiedene Studien zeigten, dass die Detektion von Phospho-Tau<sub>231</sub> (mit phosphorylierter Hydroxylgruppe des Threonyl (T)-Rests T-231 des menschlichen Tau-Proteins) im CSF nützlich zur Abgrenzung der AD von anderen Erkrankungen ist. Phospho-Tau<sub>231</sub> im CSF gilt als guter prognostischer Marker, um die kognitive Verschlechterung von Patienten mit leichter kognitiver Beeinträchtigung zu Alzheimer-Patienten voraussagen zu können. CSF p-Tau<sub>181</sub> (das in der CSF messbare und an T181 phosphorylierte Tau-Protein) kann die Unterscheidung von Lewy-Body-Demenz zu Alzheimer verbessern (Mattsson et al. 2009).

### **1.1.2 Ätiologie und Pathologie der AD**

Die Pathophysiologie der AD ist sehr komplex, und es existieren verschiedene Theorien zu ihrer Ätiologie. Gesicherte histopathologische Befunde sind ein schwerwiegender Neuronen- und Synapsenverlust, verbunden mit Hirnatrophie, neurofibrillären Tangles und senilen Plaques. Hauptbestandteile von senilen Plaques sind neben dystrophen Neuriten und Gliazellen vor allem  $\beta$ -Amyloid-Peptide. Diese sind überwiegend extrazellulär lokalisiert, wogegen neurofibrilläre Tangles zumeist intrazelluläre Ablagerungen in Neuriten und neuronalen Perikarya sind (Mattson 2004, Review).

### 1.1.2.1 $\beta$ -Amyloidplaques und A $\beta$

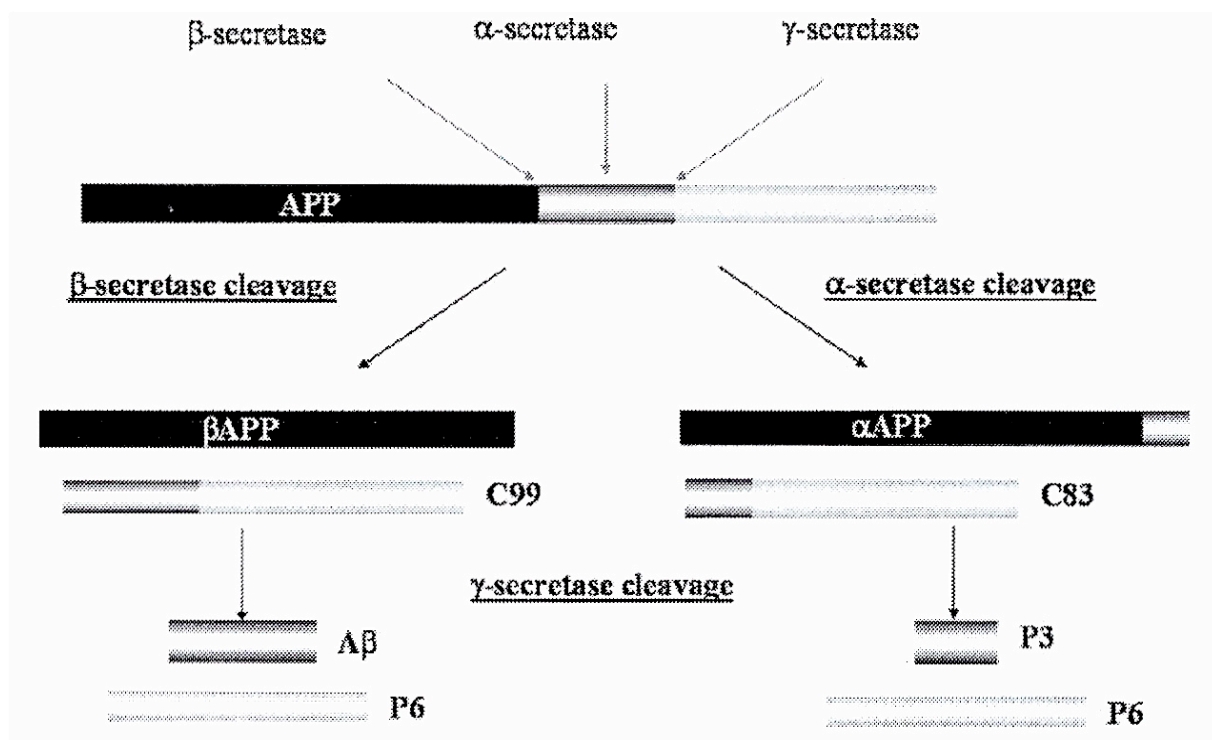
1984 gelang die erstmalige Isolierung von 39 bis 43 Aminosäuren umfassenden Amyloidpeptiden mit Faltblattstruktur, die ein Molekulargewicht von ca. 4 kDa aufwiesen und daher als  $\beta$ A4 (im Weiteren: A $\beta$ ) bezeichnet wurden. (Glennner und Wong 1984). A $\beta$ -Peptide gehören zu den Reaktionsprodukten, die sich aus der proteolytischen Spaltung des A $\beta$ -Vorläufer-Proteins (englisch: Amyloid Precursor Protein, APP) ergeben (Kang und Beyreuther 1986). Hervorzuhebende A $\beta$ -Spezies sind das zumeist vorherrschende A $\beta$ <sub>1-40</sub> sowie das um zwei Aminosäuren längere, hydrophobere und pathologisch bedeutsamere A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Haass et al. 2007). Bei den relativ schwer löslichen A $\beta$ -Peptiden handelt es sich um Metaboliten des Grundstoffwechsels (Seubert et al. 1992). A $\beta$  kann zum einen in zerebralen und meningealen Gefäßen abgelagert werden und aggregiert zudem im Hirnparenchym und wird dort in Form oftmals fibrillärer,  $\beta$ -Amyloid-Plaques abgelagert. Derartige Ablagerungen scheinen ein frühes, aber auch zwingendes Geschehen während der AD-Pathogenese und bei genetisch bedingten Krankheitsformen der Erkrankung ein entscheidender Faktor zu sein (Kowalska 2004, Review). Die klassische Amyloidhypothese postuliert, dass ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Abbau von APP zur Akkumulation des A $\beta$  in senilen Plaques führt (Hardy et al. 2002). Diese Hypothese wird gestützt u.a. durch Studien der genetischen Demenz-Formen der AD und Daten zur Zytotoxizität von A $\beta$  (Tanzi et al. 2005). So führen verschiedene Mutationen des APP auf dem Chromosom 21 wie auch Mutationen zweier anderer Gene (Präseniline 1 und 2) zu einem Anstieg amyloidogener Produkte aus der APP-Spaltung und damit zu erwähntem Ungleichgewicht sowie schließlich zur Alzheimer-Pathologie (Zhang 2004, Review; Querfurth und LaFerla 2010). Bei der Trisomie 21, dem Down-Syndrom, zeigen das 40. Lebensjahrzehnt erreichende Patienten, die das APP-Gen überexprimieren, ebenfalls Alzheimer-Symptomatik und Pathologie (Busciglio et al. 2002). A $\beta$  unterdrückt die exzitatorische synaptische Übertragung benachbarter Neurone unabhängig von deren APP-Expression. Eine derartige Suppression hängt von der Aktivität der NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) -Rezeptoren ab und kann durch Blockade der neuronalen Aktivität rückgängig gemacht werden. Diese synaptische Unterdrückung durch überexprimiertes A $\beta$  könnte zur kognitiven Beeinträchtigung im Frühstadium von AD beitragen (Kamenetz et al. 2003).

APP ist ein ubiquitäres, glykosyliertes Protein mit einer Transmembrandomäne, das mit biologischen Prozessen wie Zellwachstum, Neuritensprossung und Zelladhäsion assoziiert ist

(Multhaup et al. 1995). Das APP-Gen besteht aus 19 Exons, die durch alternatives Spleißen 5 verschiedene Produkte (APP695, APP714, APP751, APP770 und APP563) ergeben, benannt nach der Anzahl in der jeweiligen Isoform vorliegenden Aminosäurereste. APP wird durch verschiedene proteolytische Enzyme ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase) gespalten. Die  $\alpha$ -Sekretase ist ein membranassoziiertes Enzym, das die Entstehung von A $\beta$  verhindert, indem es APP innerhalb der A $\beta$ -Domäne schneidet und dadurch zu nicht-amyloidogenen, nicht-pathologischen Spaltprodukten führt. Die Bildung des potentiell pathologischen A $\beta$  findet als alternative Spaltung in Endosomen und Lysosomen durch die  $\beta$ -Sekretase und schliesslich durch die  $\gamma$ -Sekretase statt (Mattson 2004, Review). Die  $\beta$ -Sekretase-Aktivität wird dabei einem einzigen Protein, der BACE-1 ( $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1), zugeschrieben (Roberds et al. 2001). Es wurde von einem signifikanten Anstieg des Proteinspiegels der BACE-1 berichtet (Holsinger et al. 2002). Eine erniedrigte  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität im temporalen Kortex von Patienten mit der sporadischen Form der AD wurde ebenfalls beobachtet. Diese herabgesetzte Enzymaktivität könnte zu einer Zunahme des A $\beta$ -Spiegels und somit zur AD führen, da die  $\alpha$ -Sekretase mit der  $\beta$ -Sekretase um das Substrat APP konkurriert (Tyler et al. 2002). Die  $\gamma$ -Sekretase ist im Gegensatz zur  $\beta$ -Sekretase abhängig von vier Komponenten: den Präsenilinen 1 und 2, Nicastrin, APH-1 (anterior pharynx defective-1) und PEN-2 (presenilin enhancer-2; Vassar et al. 1999; Edbauer et al. 2003). APP ist nur eines von vielen Proteinen, die von  $\gamma$ -Sekretase gespalten werden. Ein anderes, gut untersuchtes Enzymsubstrat ist der Zelloberflächenrezeptor Notch-1, der bei der embryologischen Entwicklung verschiedener Organsysteme eine Rolle spielt (Hardy 1997).

Das bei der Spaltung von APP entstehende A $\beta$  wirkt sowohl in Zellkulturen als auch *in vivo* neurotoxisch (Knowles et al. 1999). Es wurde gezeigt, dass lösliche Oligomere, speziell Dimere und Trimere des A $\beta$  besonders toxisch für Synapsen sind (Walsh et al. 2007; Klyubin et al. 2008). Auf die zahlreichen  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen im cholinergen Projektionssystem werden vor allem die cholinergen Defizite sowie der fortschreitende Nervenzelluntergang im basalen Vorderhirn bei Alzheimer-Patienten zurückgeführt, wobei diese Veränderungen schon vor dem Einsetzen klinischer Symptome zu sehen sind (Musfon et al. 1999; Beach et al. 2000). In histopathologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die A $\beta$ -Belastung im Gehirn nicht mit den neuronalen und synaptischen Verlusten korreliert und  $\beta$ -Amyloid-Plaques offenbar nicht auf direktem Wege zur Neuronenschädigung führen; allerdings scheinen die kognitiven Einschränkungen mit der A $\beta$ -Oligomer-Konzentration im Gehirn zu korrelieren (Lue et al. 1999; Carter et al. 2001). Es bleibt ungeklärt, ob A $\beta$  über seine

Aggregation zu unlöslichen Amyloid-Fibrillen, oder aber die löslichen Oligomere des A $\beta$  die entscheidende neurotoxische Wirkung entfalten (Hardy und Selkoe 2002, Review), zumal der toxische Effekt von A $\beta$  unabhängig von dessen Aggregation zu Fibrillen sein kann (Zhu et al. 2000). Der Amyloidhypothese gemäß führen toxische Amyloidformen in höherer Konzentration zur Tau-Hyperphosphorylierung und zu neurofibrillären Tangles, zu pathologischen Reaktionen von Mikro- und Astroglia sowie zu oxidativem Stress. Diese Veränderungen bewirken schließlich Neurodegeneration, neuronalen Zellverlust und möglicherweise die Entstehung einer Demenz (Mattson 2004, Review).



**Abb. 1.1: Schema der APP-Prozessierung:**

Gezeigt werden links der amyloidogene und rechts der nicht-amyloidogene Abbauweg. Die  $\alpha$ -Sekretase kommt in der A $\beta$ -Sequenz vor und setzt ein  $\alpha$ APP- und ein C83-Fragment frei. Die  $\beta$ -Sekretase generiert ein  $\beta$ APP- und ein C99-Fragment, das den N-Terminus von A $\beta$  enthält. Weiterer Abbau von C83 und C99 über die  $\gamma$ -Sekretase führt dann zu nicht toxischen P3- und P6-Fragmenten, jedoch ebenso zu A $\beta$  und einem P6-Fragment (modifiziert nach Augustin et al. 2009).

### 1.1.2.2 Tau-Protein und neurofibrilläre Tangles

Tau ist ein lösliches, in hoher Konzentration axonal vorkommendes Protein, das auf Chromosom 17 kodiert ist. Als Hauptfunktionen dieses Proteins gilt seine Beteiligung am Aufbau und an der Stabilisierung von Mikrotubuli und damit des Zytoskeletts. Seine weiteren Aufgaben bestehen in der Signaltransduktion, dem Transport intrazellulärer Vesikel und der

Verankerung von Phosphatasen und Kinasen (Götz et al. 2004). Das erwachsene menschliche Gehirn produziert 6 verschiedenen Isoformen des Tau-Proteins, die durch alternatives mRNA-Spleißen alle aus einem Gen hervorgehen (Abb. 1.2). Eine Vielzahl von Tau-Formen resultiert aus zahlreichen posttranslationalen Modifikationen, wie Phosphorylierungen, Glykosylierungen und Oxidationen (Hernandez et al. 2007).



**Abb. 1.2: Die 6 verschiedenen Isoformen des Tau-Proteins:**

Die 6 Tau-Isoformen gehen durch alternatives Spleißen aus einem Gen hervor. Die blauen, grünen und gelben Abschnitte entsprechen den Exons 2,3 und 10. Die längste Isoform enthält 441 Aminosäuren. In vielen kommerziell erhältlichen Detektionssystemen wird AT120 als primärer Antikörper verwendet, während HT7 oder BT2 als sekundäre Antikörper dienen um Tau-Protein im Liquor nachzuweisen (modifiziert nach Hampel et al. 2010).

Die Tau-Expression ist besonders hoch in nicht-myelinisierten, kortikalen Axonen, vor allem im Hippokampus und anderen für die Gedächtnisbildung bedeutsamen Regionen des limbischen Systems (Trojanowski et al. 1989).

Während die Phosphorylierung des Tau-Protein axonale und synaptische Plastizität im sich entwickelnden Gehirn fördert (Lovestone et al. 1997; Arendt 2005, 2009, Reviews), ist sie im erwachsenen Gehirn pathologisch und gehört zu einer Gruppe von Krankheiten, die als Tauopathien bezeichnet werden. Zu diesen zählen neben der AD einige Formen der FTD (Frontotemporale Demenz), wie die primär-progressive Aphasie oder die semantische Demenz, kortikobasale Degeneration, progressive supranukleäre Blickparese, und der ALS/Parkinson-Demenzkomplex (Ballatore et al. 2007). Hyperphosphoryliertes Tau kommt hauptsächlich in Neuronen vor, wurde aber auch in Astro- und Oligodendrozyten nachgewiesen (Tashiro et al. 1997). Als schwerlösliche Substanz hat hyperphosphoryliertes Tau aufgrund seiner – durch abnormale Phosphorylierung bedingten – Konformationsänderung keine Assoziation zu Mikrotubuli mehr und aggregiert schließlich zu

Filamenten (Iqbal et al. 2005). Diese pathologischen, gepaarten helikalen Filamente (paired helical filaments, PHF), stellen die Hauptkomponente der neurofibrillären Tangles (NFT) dar. NFT sind intrazelluläre Ablagerungen, die in Zellkörpern, Dendriten und in mit Plaques assoziierten, dystrophen Neuriten vorkommen (Crowther und Wischik 1985). Derartige NFT zeigen sich zunächst in besonders vulnerablen Regionen und breiten sich in regelhafter Art und Weise aus. Entorhinaler Kortex, Hippokampus, basales Vorderhirn und Amygdala sind dabei zuerst und besonders stark betroffen (Braak und Braak 1991, 1995). Die Anzahl der NFT korreliert mit der Schwere der Demenz (Crystal et al. 1988; Nagy et al. 1996), nicht hingegen mit der Verringerung des axonalen Transports und Neuronenverlust (Andorfer et al. 2003). In ähnlicher Weise wie A $\beta$ -Oligomere, sind Zwischenprodukte der Aggregation von hyperphosphoryliertem Tau zytotoxisch und beeinflussen die Kognition (Khistunova et al. 2006, Santacruz et al. 2005, Oddo et al. 2006). PHF als Bestandteil der NFT können diese toxischen Zwischenprodukte sequestrieren, was möglicherweise ein protektiver Prozess ist (Lee et al. 2005). Derzeit ist unklar, ob die Tau-Hyperphosphorylierung eine entscheidende Rolle bei der Proteinaggregation spielt und ob sie den Verursacher oder eine Konsequenz der AD darstellt (Ballatore et al. 2007). NFT, die als Kennzeichen der Tau-Pathologie gelten, sind jedoch ähnlich wie  $\beta$ -Amyloid-Plaques auch in Gehirnen älterer, nicht dementer Personen zu finden. Obwohl viele Studien berichten, dass die Tau-Pathologie der Amyloid-Kaskade bei Alzheimer nachgelagert sei, ist sie z.B. bei sporadischen Tauopathien für Neurodegeneration verantwortlich. Auch ohne das Vorhandensein von  $\beta$ -Amyloid-Plaques findet man NFT bei neurodegenerativen Erkrankungen nach toxischen und traumatischen Einwirkungen auf das Gehirn (Hampel 2010, Review).

### **1.1.2.3 Weitere pathophysiologische Aspekte der AD**

#### *Pathologische Veränderungen des cholinergen Systems*

Gedächtnisverlust sowie kognitive Defizite als Zeichen der funktionellen Störung des cholinergen Systems werden sowohl im normalen Altersgang als auch bei der AD beobachtet (Bartus et al. 1982; Coyle et al. 1983). Die cholinergen Defizite bei AD sind dabei vor allem auf die massiven Zellverluste im basalen Vorderhirn (Davies und Maloney 1976; Whitehouse et al. 1982; Arendt et al. 1986) und damit verbundenen Einschränkungen der cholinergen Innervation von Neokortex, Amygdala und Hippokampus zurückzuführen (Hohmann et al. 1988). Cholinerge Zellverluste und damit verbundene Dysfunktionen in anderen Hirnregionen, korrelieren besser mit dem klinischen Erscheinungsbild der AD als Plaque-

Beladung oder NFT-Belastung (Whitehouse et al. 1981; Bartus et al. 1982; Coyle et al. 1983; McGeer et al. 1984).

Die Hauptprojektionen des cholinergen Systems zum zerebralen Kortex und zum Hippokampus entspringen dem cholinergen Komplex des basalen Vorderhirns, zu dem das mediale Septum, das horizontale und vertikale diagonale Band von Broca sowie der Nucleus Basalis Meynert gezählt werden. Es wurde angenommen, dass die hier beteiligten cholinergen Neurone moderate Veränderung während des Alterns im Sinne einer cholinergen Hypofunktion zeigen. Jedoch gilt es einen physiologischen Alterungsprozess von einem pathologischen zu unterscheiden, wie er bei der AD vorkommt. In AD zeigte sich hauptsächlich ein neuronaler Zellverlust, während das normale Altern eher durch einen allmählichen Verlust der cholinergen Funktion bedingt durch dendritische, synaptische und axonale Degeneration, begleitet wird. In der präsenilen (early onset) Form sowie der fortgeschrittenen Spätform (late onset) der AD wurde ein massiver Verlust der kortikalen, cholinergen Innervation dokumentiert, wobei es im Gegensatz hierzu bei Patienten mit MCI (mild cognitive impairment) und einer frühen Form der AD scheinbar nicht zu einer cholinergen Degeneration kommt, sondern zu einem Verlust der cholinergen Funktion (Schliebs und Arendt 2011, Review). Hier werden eine Imbalance in der Expression von Nervenwachstumsfaktor (NGF = nerve growth factor), dessen Vorläufer proNGF, regulierbare NGF-Rezeptoren, die veränderte Freisetzung von Azetylcholin (ACh), die Cholinaufnahme und letztlich die veränderte Expression von muskarinischen und nikotinischen ACh-Rezeptoren als Ursache der cholinergen Dysfunktion genannt. Somit besitzt das cholinerge System eine Schlüsselrolle in den zu AD führenden funktionellen Prozessen (Schliebs und Arendt 2011, Review). Nun ist im Gegensatz zu anderen dementiellen Syndromen bei der AD die cholinerge Dysfunktion – wie bereits beschrieben – von zwei histopathologischen Hauptmerkmalen begleitet, den  $\beta$ -Amyloidplaques und den NFT. Hier stellt sich die Frage, ob diese Merkmale die cholinerge Dysfunktion möglicherweise auslösen oder fördern. Es gibt Hinweise dafür, dass A $\beta$  eine cholinerge Dysfunktion durch Interaktion mit nikotinischen ACh-Rezeptoren auslöst und NGF-Signalwege beeinflusst (Schliebs et Arendt 2011, Review).

### *Oxidativer Stress und Neuroinflammation*

Oxidativer Stress ist die unkontrollierte Produktion von hochreaktiven Sauerstoffradikalen (Mattson 2004, Review) und neben einem gestörten Energieumsatz charakteristisch für viele altersabhängige Erkrankungen wie auch die AD.



Von einigen Autoren wird ein chronischer Entzündungsprozess als Entstehungsmechanismus der AD postuliert (Griffin et al. 1996). Hierfür sprechen das erhöhte Risiko, nach Kopftrauma an Morbus Alzheimer zu erkranken und die inverse Korrelation zwischen der Erkrankung und der Einnahme von entzündungshemmenden Medikamenten (McGeer et al. 1987, 1989) sowie die Beobachtung, dass Amyloid-Ablagerungen mit verschiedenen Entzündungsmarkern wie Komplementfaktoren und Akute-Phase-Proteinen kolokalisiert sind (Chen et al. 1996; Meda et al. 2001). Vor allem cholinerge Zellen des basalen Vorderhirns sind besonders empfindlich gegenüber Entzündungsprozessen (Willard et al. 1999). Neben dem Effekt auf cholinerge Neurone konnte für einige proinflammatorische Zytokine auch eine Beeinflussung des APP-Metabolismus mit Aktivierung der BACE und Stimulierung der Amyloidproduktion gezeigt werden (Mhatre et al. 2004, Review). Um zu zeigen, dass es sich bei Entzündungsprozessen durchaus um eine Ursache und nicht lediglich die Konsequenz der Alzheimer-Pathologie handelt, wurde Mäusen bakterielles Lipopolysaccharid injiziert. Daraufhin kam es zur Neuroinflammation, aus der wiederum erhöhte APP-Expression und vermehrte A $\beta$ -Bildung resultierten (Sheng et al. 2003).

Ein weiterer Fokus bei der Untersuchung der AD-Pathogenese richtet sich auf den Cholesterollowerstand. Zu beobachten sind erhöhte Cholesterol- und Ceramidkonzentrationen nach oxidativem Stress, der durch A $\beta$  verursacht wurde (Cutler et al. 2004). Einige Studien weisen darauf hin, dass bei der  $\beta$ -Amyloid-Aggregation ApoE  $\epsilon$ 4, ein Allel des Apolipoprotein E, eine Rolle spielt. Auch gestörter Insulin- und Kalzium-Haushalt werden verstärkt als Ursachen der Alzheimer-Pathologie diskutiert (Mhatre et al. 2004, Review)

### **1.1.3 Therapeutische Ansätze zur Behandlung von AD**

Durchschlagende Therapieerfolge bei der Bekämpfung der AD fehlen leider noch immer. Die meisten derzeit eingesetzten Arzneimittel gegen AD sollen cholinerge Defizite ausgleichen und sind AChE-Hemmer, so z.B. Tacrin, Donepezil, Rivastigmin, Galantamin und Metrifonat (Giacobini 2004, Review). Tacrin wird allerdings aufgrund seiner hepatotoxischen Nebenwirkungen nicht mehr empfohlen (Watkins 1994).

Zur Verbesserung der cholinergen Neurotransmission werden Vorläufer des Azetylcholins (Cholin und Lecithin) eingesetzt, während Linopirdin die Transmitterfreisetzung stimuliert. An muskarinischen M1-Rezeptoren wirksame Agonisten sowie der Nervenwachstumsfaktor (NGF) wurden anfangs zum Schutz der cholinergen Zellen vor Neurodegeneration eingesetzt

(Winkler et al. 1997, Amenta et al. 2001). Eine selektive Aktivierung von muskarinischen M1-Rezeptoren kann den Verlauf oder sogar das Fortschreiten der Demenz verändern, indem es die cholinerge Hypofunktion positiv beeinflusst, was mit der Beeinflussung von A $\beta$ -Pathologie und NFT eng verknüpft ist. Daher wird versucht eine Modulation der APP-Prozessierung sowie der A $\beta$ -Belastung im Hirn der Patienten durch eine cholinerge Therapie zu beeinflussen. Eine Gegenüberstellung dieser Therapie mit an muskarinischen M1-Rezeptoren wirksamen Agonisten zeigte ihre Überlegenheit gegenüber anderen eingesetzten Substanzen wie M2-Rezeptor Antagonisten, Cholinesterase-Inhibitoren sowie Agonisten von nikotinischen Rezeptoren: M1-Rezeptor-Agonisten beeinflussen im Gegensatz zu anderen Wirkstoffen die meisten Hauptmerkmale der Erkrankung, d.h. die  $\beta$ -Amyloidose, Tauopathie, cholinerge Hypofunktion und Kognitionseinschränkungen (Fischer 2011, Review).

Es gibt jedoch zahlreiche weitere Therapieansätze. Nachdem Tierversuche gezeigt hatten, dass die Immunisierung mit A $\beta$  zur Reduktionen von Plaques führt (Schenk et al. 2005, 1999), wurde in einem klinischen Versuch ein entsprechendes Impfprogramm durchgeführt, musste aber wegen Enzephalitis in 6% der Patienten abgebrochen werden (Orgogozo 2003). Bei Patienten, die Antikörper gegen A $\beta$  entwickelten, konnte eine Verzögerung des Krankheitsverlaufes beobachtet werden (Hock et al. 2003). Sowohl Hemmstoffe, die A $\beta$ -bildende Enzyme hemmen, als auch Wirkstoffe, die Polymerisation von A $\beta$  verhindern (Francotte et al. 2004, Review), befinden sich in der Entwicklungsphase und sind noch nicht als Medikament verfügbar. Ebenfalls im Anfangsstadium befindet sich die Entwicklung von Präparaten zur Bekämpfung der Tau-Pathologie. Hier denkbar und bereits in Tierstudien eingesetzt sind Mikrotubuli-Stabilisatoren, Hemmstoffe der Tau-Phosphorylierung (z.B. Glykogen-Synthetase-Kinase 3 $\beta$ -Inhibitoren), hyperphosphoryliertes Tau abbauende Phosphatasen sowie Hemmstoffe der Tau-Oxidation und Aggregation (Francotte et al. 2004; McLaurin et al. 2006). Als Wirkstoffe gegen Neuroinflammation und erhöhten oxidativen Stress bei AD gelten entzündungshemmende Mittel wie Ibuprofen (Stewart et al. 1997) sowie Chelatoren von Eisen-, Kupfer- und Zinkionen (Mattson 2004, Review). Ferner kommen cholesterolsenkende Statine zum Einsatz, und darüber hinaus wird eine cholesterolare Ernährung als krankheitsvorbeugend empfohlen (Luchsinger und Mayeux 2004, Review).

## 1.2 *Ginkgo biloba* – ein potentielles Phytotherapeutikum zur symptomatischen Behandlung der AD?

*Ginkgo biloba* (Mantissa Plantarum Altera, 1771, Ginkgoaceae) gehört zur botanischen Familie der Ginkgoaceae. Ginkgobäume existierten bereits vor 150 Millionen Jahren, womit *Ginkgo biloba* stammesgeschichtlich zu den ältesten lebenden Spezies auf unserem Planeten gehört. Der Name Ginkgo stammt von den chinesischen Wörtern sankyo oder yin-kuo, was als Aprikosenberg oder Silberfrucht übersetzbar ist; die Namensgebung erfolgte wohl wegen der gelben, Aprikosen-förmigen, reifen Früchte des Ginkgobaums (McKenna et al. 2001).

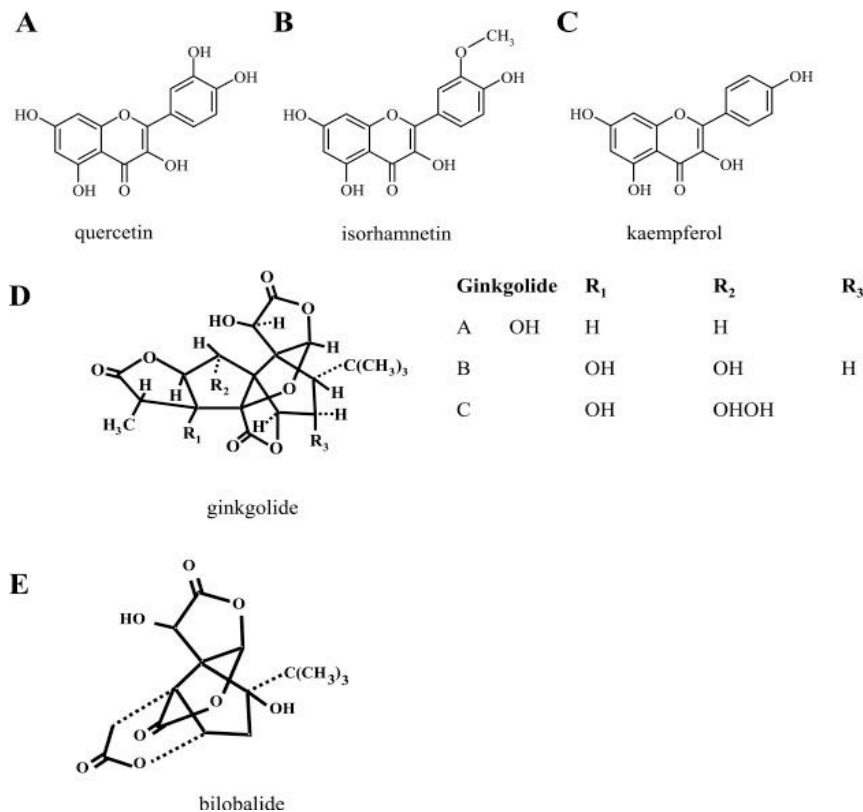
Der deutsche Chirurg Englibert Kaempfer benutzte erstmalig 1712 den Ausdruck *Ginkgo* jedoch war es Linnaeus, der letztlich 1771 verantwortlich für den Namen *Ginkgo biloba* war (Gertz und Kiefer 2004).

Sowohl die Blätter als auch die Nüsse des Ginkgo-Baumes fanden über Jahrhunderte Verwendung in der traditionellen chinesischen Medizin. Während die Nüsse seit über 5000 Jahren gegen pulmonale Erkrankungen wie Asthma bronchiale oder Reizhusten und Blaseninfektionen eingesetzt wurden, fanden die Blätter zur Linderung von Hautentzündungen sowie zur Behandlung von Lungen- und Herzstörungen (Mahadevan und Park 2008, Review) Verwendung. Erst vor etwa 25 Jahren wurde ein standardisierter Extrakt aus Ginkgoblättern (EGb761) erstmals für die Behandlung von kognitiven Störungen eingesetzt (Diamond 2013) und trägt seitdem zur immer stärkeren Bedeutung von Phytotherapeutika bei, wobei Effekte in der Alzheimer-Therapie hervorzuheben sind (Bastianetto et al. 2000; Zimmermann et al. 2002; Smith und Luo 2004; Yao et al. 2004).

### 1.2.1 Der *Ginkgo biloba*-Extrakt EGb761

EGb761 ist ein standardisierter, aus den getrockneten grünen Blättern des Ginkgobaumes gewonnener Extrakt. Die Hauptbestandteile des EGb761 sind Flavonoide (22-27%) und Terpenoide (5-7%), die dem Extrakt seine polyvalenten Eigenschaften im Hinblick auf ein breites pharmakologisches Spektrum verleihen (Cermak und Wolfram 2005). Die Terpenoide sind vertreten durch die Ginkgolide A, B, C, J und M sowie Bilobalide. Ginkgolide sind Gegenspieler von Plättchenaktivierungsfaktoren, können demzufolge die Plättchenaktivierung und -aggregation vermindern und damit den Blutfluss optimieren (Braquet 1986). Bilobalide hingegen können ein durch Triethylen verursachtes Hirnödem reduzieren, sowie durch Hirnischämie verursachte Schäden vermindern (De Feudis 2002; Chandrasekaran et al. 2003). Die Flavonoid-Fraktion besteht vor allem aus drei Flavonoiden: Quercetin, Kaempferol und

Isorhamnetin, die mit verschiedenen Zuckerresten verbunden sind. Es handelt sich um Antioxidantien, welche reaktive Sauerstoff-Spezies abfangen und oxidativ aktive Metallionen binden können (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Struktur verschiedener Flavonoide und Terpeneide:**

Gezeigt werden die Flavonoide Quercetin (A), Isorhamnetin (B) und Kaempferol (C) sowie die Terpeneide vertreten durch Ginkgolide (D) und Bilobalide (E), wie sie im benutzten Extrakt EGb761 vorhanden sind (modifiziert nach Cermak et al. 2005).

EGb761 dient der Eindämmung Symptomen solcher Krankheiten, die mit kognitiven Defiziten einhergehen, so auch der AD (Andrieu et al. 2003; Diamond et al. 2000; Le Bars et al. 2002; Oken et al. 1998; Maurer et al. 1997; Mix & Crews 2000; Ramassamy et al. 1999). Die Gabe von EGb761 erfolgt auf der Grundlage von sowohl experimentellen als auch klinischen Studien, die Beweise für die Verbesserung der Kognition, Stress-Abbau, als auch Beeinflussung von Gen- und Gefäßregulationen durch das Präparat erbracht hatten (Diamond et al. 2013, Review). Außerdem wurde in einer Studie an neuronalen PC12-Zellen gezeigt, dass EGb761-Komponenten zytotoxische Effekte der A $\beta$ -Fragmente verringern (Chandrasekaran et al. 2003; de Feudis 2008). Klinische Studien haben einen Nutzen bezüglich Prävention und Therapie bei milden Formen der AD gezeigt (Le Bars et al. 2002; Kanowski et al. 1996). Es wurde teilweise eine signifikante Verbesserung der Konzentration,

der Kognition sowie auch der sozialen Interaktion gezeigt (Kanowski und Hoerr 2003; Dongen et al. 2003; de Feudis 2002, Ahlemeyer et al. 2003; Bastianetto et al. 2000; Zimmermann et al. 2002; Smith and Luo 2004; Yao et al. 2004). EGb761 verändert die neuronale Erregbarkeit sowie die synaptische Effektivität und Plastizität im Bereich des Hippokampus in gealterten Mäusen, was eine mögliche Erklärung der kognitiven Wirkungen erlaubt (Williams et al. 2004). Außerdem weist EGb761 ein breites pharmakologisches Spektrum auf: Gezeigt wurden ein Schutz von Neuronen im Hippokampus gegen  $\beta$ -Amyloid und Stickoxid-vermittelten Zelluntergang (Bastianetto et al. 2000; Dore et al. 1999) sowie bei oxidativem Stress (Wei et al. 2000). Weiterhin wiesen die Extrakte Eigenschaften freier Radikalfänger (Pierre et al. 1999), wirkten anxiolytisch (Satyan et al. 1998) und zeigten Effekte auf den 5-HT<sub>1A</sub>-Serotonin Rezeptor (Winter und Timineri 1999) sowie auf Kognition, Altern und längeres Überleben in Tierexperimenten (Cohen-Salmon et al. 1997; Winter 1998). Es fanden sich auch positive Einflüsse von EGb761 auf den geschädigten Energiehaushalt von Neuronen in Ratten (Hoyer et al. 1999; Löffler et al. 2001). In neueren Studien werden die Effekte von EGb761 in Verbindung mit weiteren Substanzen erforscht: so schien EGb761 in Verbindung mit hyperbarem Sauerstoff in Rattenhirnen mit A $\beta$ <sub>25-35</sub>-Belastung dessen Toxizität zu mindern (Tian et al. 2012). Während ein symptomatischer Benefit von EGb761 - sowohl Demenz als auch MCI betreffend - gezeigt werden konnte, ist der Nachweis eines andauernden prophylaktischen Benefits bei AD bisher nicht gelungen (Lautenschlager et al. 2012).

### 1.3 EGb761 und die Genexpression verschiedener Proteine

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* steigert EGb761 in transgenen Fadenwürmern (*Caenorhabditis elegans*) die Aktivität der  $\alpha$ -Sekretase (Colciaghi et al. 2004) und verhindert, die Bildung und Aggregation von A $\beta$  (Luo et al. 2002; Yao et al. 2001; Lu 2006; Wu et al. 2006). Weiterhin schützte die chronische Behandlung von Tg2576-Mäusen, die altersabhängig  $\beta$ -Amyloidose zeigen, mit EGb761 diese Tiere gegen altersbedingte, das räumliche Gedächtnis betreffende Defizite, führte jedoch nicht zur Reduktion der A $\beta$ -Belastung in deren Hirnen (Stackman et al. 2003). Durch EGb761 beeinflusst werden außerdem die kodierenden Gene für Gesamt-Tau und Phosphatase 1-mRNA im Sinne einer Hochregulation auf mRNA-Ebene (Watanabe et al. 2001). Viele obengenannte Daten wurden durch *in vitro* Studien gewonnen, was die Situation *in vivo* natürlich nur teilweise reflektiert. Die Nutzung des transgenen Mausmodells Tg2576 (Hsiao 1996), in dem menschliche  $\beta$ -

Amyloid-Peptide von Geburt an produziert werden und das altersabhängig sowohl parenchymale als auch vaskuläre A $\beta$ -Ablagerungen zeigt, repräsentiert einen experimentellen Weg für die Analyse der Effekte von EGb761 *in vivo*. So zeigten Watanabe und Mitarbeiter, dass EGb761 Effekte auf die Expression verschiedener Gene hat, welche Proteine kodieren, von denen einige bei der Pathogenese von Alzheimer eine Rolle spielen und andere neuroprotektive Fähigkeiten aufweisen (Watanabe et al. 2001; Wolfram et al. 2003). Zu diesen Proteinen zählt unter anderem Transthyretin (TTR), auch Präalbumin genannt. Es ist ein homotetrameres 55 kDa-Protein, das hauptsächlich in der Leber und im Plexus choroideus gebildet und schließlich in das Plasma bzw. die zerebrospinale Flüssigkeit abgegeben wird (Soprano et al. 1985). TTR ist involviert in den Transport des Schilddrüsenhormons, Thyroxin und des Retinol-bindenden Proteins im Plasma und im Serum (Woeber et al. 1968). Liz et al. zeigten, dass TTR eine kryptische Protease ist, die Apolipoprotein A-I (Apo A-I) am C-terminalen Ende spaltet (Liz et al. 2007, 2004). TTR verhindert die Amyloidogenese durch das Sequestrieren von A $\beta$  und scheint das Hauptbindungsprotein von A $\beta$  in der zerebrospinalen Flüssigkeit zu sein (Schwarzman et al. 1994). Costa et al. zeigten, dass TTR Aggregation und Toxizität von A $\beta$  vermindert, wobei A $\beta$  proteolytisch durch TTR abgebaut wird (Costa et al. 2008). Kürzlich zeigten Ribeiro et al. für die Bindung von A $\beta$  durch TTR und die resultierende Hemmung der A $\beta$ -Aggregation eine Abhängigkeit von der Stabilität des TTR-Proteins bzw. seiner Mutationen (Ribeiro et al. 2012).

Des Weiteren zeigte sich die Expression der Gene zweier Wachstumsfaktoren ebenfalls durch den Einfluss von Egb761 hochreguliert: Growth Hormone (GH) und Prolaktin. Bei GH handelt es sich um ein anaboles Hormon, das hauptsächlich Muskel- und Knochenzellen zum Teilen und Wachsen anregt: Allerdings wurden auch GH-Rezeptoren im Gehirn nachgewiesen (Marieb 1991). GH ist ein einkettiges Peptidhormon mit 191 Aminosäuren, 2 Disulfidbrücken und einem Molekulargewicht von 21500. Unter physiologischen Bedingungen werden große Mengen dieses Hormons intragranulär in den somatotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens (HVL) gespeichert. Die menschliche Hypophyse enthält 4-6 mg GH, und die GH-Produktionsrate bei einem jungen Erwachsenen beträgt etwa 1 mg pro Tag. GH vermindert die Stickstoffausscheidung und führt zu einer Aufnahme von Aminosäuren in die Zellen: Es wirkt hier synergistisch zum Insulin während es im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel als Antagonist wirkt. Der normale GH-Spiegel liegt unter 5  $\mu$ g/l und ist bedingt durch eine pulsatile Stimulation des HVL durch GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone). Ein starker Reiz für eine GH-Sekretion ist dementsprechend eine insulininduzierte Hypoglykämie, wogegen ein Blutzuckeranstieg die Sekretion hemmt

(Siegenthaler 2001, Melmed 1995). Die Rolle von GH im zentralen Nervensystem wird seit geraumer Zeit diskutiert. Fehlendes oder vermindertes GH bewirken deutliche kognitive Einschränkungen und klinische Studien zeigten bei einer Substitutionstherapie die Verbesserungen verschiedener Parameter, einschließlich der Gedächtnisleistung (Nyberg 2000).

Der andere auf mRNA-Ebene hochregulierte Wachstumsfaktor war das Hormon Prolaktin, ein einkettiges Peptidhormon mit 198 Aminosäuren und 3 Disulfidbrücken, das im Hypophysengewebe nachgewiesen werden kann. Die physiologische Bedeutung des Prolaktins bei der Frau beschränkt sich auf die postpartale Periode, wo es die Laktation unterhält sowie die postpartale Anovulation. Der Prolaktintagespiegel zeigt Tagesschwankungen, erlebt jedoch seinen Peak am frühen Morgen. Während der Schwangerschaft steigen die Prolaktinspiegel kontinuierlich an bis auf ein Zehnfaches. Ursache sind die plazentaren Östrogene, die eine Hypertrophie der laktotrophen Zellen der Hypophyse bewirken, gleichzeitig aber die biologische Prolaktin-Wirkung an der Brust blockieren. Postpartal fallen die Östrogenspiegel ab und es kommt binnen 24 h zum Milcheinschuss an der Mamma. Neben dem physiologischen Saugreiz des Neugeborenen führt auch eine Stimulation der Brustwarze zur Prolaktin-Freisetzung. Sowohl der basale Prolaktin-Spiegel, als auch der TRH (Thyreotropin Releasing Hormone) -induzierte Anstieg des Prolaktin, sind bei der Frau höher als beim Mann (von Werder 1998). Somit ist es ein Hormon mit wichtigen Funktionen bei Fortpflanzungsprozessen, aber auch zahlreichen weiteren biologischen Vorgängen (Freeman et al. 2000). Es ist jedoch unklar, ob Prolaktin als Neuromodulator oder Neurotransmitter, oder gar als zentrales Zytokin bei der Regulation von vaskulärem Wachstum und der Funktion in Glia-Zellen eine Rolle spielt. Es wurde jedoch gezeigt, dass Prolaktin die Proliferation und Differenzierung von embryonalen Astrozyten induziert (Mangoura et al. 2000) und dass durch gezielte Störung dieses Proteins die Aktivität von tuberoinfundibulären dopaminergen Neuronen verkleinert wurde, da sich stark reduzierte Mengen von Dopamin und Tyrosin-Hydroxylase fanden (Phelps et al. 2000). Die Gene der beschriebenen Proteine sind möglicherweise Angriffspunkte für die durch EGb761 induzierte Verbesserung kognitiver und neurologischer Funktionen (Ribeiro et al. 2012; de Feudis et al. 2008; Choi et al. 2007). Entsprechend der Komplexität der AD und im Hinblick auf die histopathologischen Hauptmerkmale wurde und wird der Einfluss von EGb761 auch auf die Expression von Genen untersucht, die mit der Pathogenese der Erkrankung unmittelbar in Verbindung stehende Proteine kodieren (Augustin et al. 2009, 2008), wie beispielsweise das Amyloid-Präkursorprotein (APP; Iwata et al. 2005; De Strooper et al. 2000), die APP-

---

spaltende Protease Adam10, die A $\beta$ -abbauende Protease Neprilysin (NEP; Apelt et al. 2003) sowie das APP-bindende Protein 1 (APPBP1), das Apoptose induziert und in Patienten mit AD erhöht ist (Chen et al. 2003). Diesbezüglich sinnvoll erscheint nicht nur die Identifikation weiterer Proteine, die möglicherweise für die positiven Effekte von EGb761 verantwortlich sind, sondern auch die Analyse von Effekten nachgewiesenermaßen EGb761-beeinflusster Proteine auf die Pathogenese von AD.



## 2 Problemstellung

Frühere Untersuchungen an C57B16-Mäusen zeigten, dass der *Ginkgo biloba* Extrakt EGb761 die Expression der Transkripte (mRNA), die für die Proteine Mikrotubuli-assoziiertes Tau-Protein, Prolaktin, Wachstumshormon (growth hormone, GH) und Transthyretin (TTR) kodieren, beeinflusst (Augustin et al. 2009; Watanabe et al. 2001). Watanabe und Kollegen beobachteten nach einer chronischen Behandlung von C57B16-Mäusen mit EGb761 im Kortex und im Hippokampus eine deutliche Aufregulierung der mRNA-Spiegel von Tau-Protein, Prolaktin und GH mittels Mikroarray-Analyse (Watanabe et al. 2001). Weiterhin konnte im Hippokampus nach EGb671-Behandlung signifikant erhöhte Spiegel an TTR-mRNA gefunden werden, was später durch Augustin et al. (2009) bestätigt wurde.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob ein standardisierter Extrakt aus Blättern der *Ginkgo biloba*-Pflanze (EGb761) und/oder dessen isolierte Flavonoid- und Terpenoid-Komponenten, auch die Expression der Proteine Tau, GH, Prolaktin und TTR, die Auch die Pathogenese der AD eine Rolle spielen, in Hirnen von adulten Mäusen des Stammes C57B16 beeinflussen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden - sofern nicht anders beschrieben - von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen), Serva (Heidelberg) und Carl Roth (Karlsruhe) in höchstmöglicher Reinheit und Qualität erhalten.

##### 3.1.1 *Ginkgo biloba*-Extrakte

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Extrakte von *Ginkgo biloba*-Blättern verwendet bzw. verfüttert. Neben dem bekannten, standardisierten *Ginkgo biloba*-Extrakt EGb761, wurden zusätzlich zwei weitere Extrakte verwendet, die zum einen im Wesentlichen die Flavonoid-Fraktion und zum Anderen hauptsächlich die Terpenoid-Fraktion des EGb761 enthalten. Eine genauere Aufschlüsselung der jeweiligen Inhaltsstoffe bietet Tabelle 3.1. Sämtliche Extrakte wurden uns freundlicherweise von der Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG (Karlsruhe) für Forschungszwecke überlassen.

**Tab. 3.1:** Anteil an Flavonoiden, Ginkgoliden und Bilobaliden im Extrakt EGb761 (G) sowie der auch angewendeten Flavonoid-Fraktion (F) und der Terpenoid-Fraktion (T) des EGb761.

	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>T</b>
Anteil (%w/w)*			
<b>Σ Flavonoide</b>	<b>24,4</b>	<b>25</b>	<b>♦</b>
Quercetin	10,9	♦	0,19
Kaempferol	11,2	♦	0,18
Isorhamnetin	2,3	♦	n.n.♦
<b>Σ Terpeneide</b>	<b>6</b>	<b>&lt; 1</b>	<b>38,27</b>
Bilobalide	3,02	♦	21,44
Ginkgolid A	1,28	♦	6,35
Ginkgolid B	0,55	♦	3,76
Ginkgolid C	1,15	♦	6,72

\*Daten bereitgestellt von der Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG (Karlsruhe). Die Daten sind angegeben in % w/w des ganzen Extraktes. ♦ = nicht bestimmt. • = nicht nachweisbar.

### 3.1.2 Verwendete Antikörper

Nachstehende Tabellen geben einen Überblick der in der vorliegenden Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper, deren Verdünnung und deren Hersteller.

**Tab. 3.2:** Übersicht der für die Immunperoxidase-Markierungen verwendeten Antikörper.

Primäre Antikörper	Verdünnung	Sekundäre Antikörper	Verdünnung
Schaf-anti-Transthyretin (abcam, Cambridge, UK)	1:4000	biotinyliertes Esel-anti-Schaf IgG (Dianova, Hamburg)	1:500
Kaninchen-anti- Prolaktin (Quartett, Berlin)	1:3000	biotinyliertes Ziege-anti- Kaninchen IgG (Dianova)	1:500
Kaninchen-anti-hGH (human growth hormone; Quartett, Berlin)	1:25, 1:50 und 1:100	biotinyliertes Ziege-anti- Kaninchen IgG (Dianova)	1:500
Kaninchen-anti-Tau (Dakocytomation, Hamburg)	1:2000	biotinyliertes Esel-anti- Kaninchen IgG (Dianova)	1:500

**Tab. 3.3:** Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Markierungen.

Primäre Antikörper	Verdünnung	Sekundäre Antikörper	Konzentration
Kaninchen-anti-Tau (Dakocytomation, Hamburg)	1:1000	Cy2-Esel-anti-Kaninchen IgG (Dianova, Hamburg)	20 µg/ml
AT8 (Pierce Endogen, Rockford USA)	1:1000	Cy2-Ziege-anti-Maus IgG (Dianova)	20 µg/ml
Kaninchen-anti-Prolaktin (Quartett, Berlin)	1:1000	Cy2-Ziege-anti-Kaninchen IgG (Dianova)	20 µg/ml
Schaf-anti-Transthyretin (abcam, Cambridge, UK)	1:100	Cy3-Esel-anti-Schaf IgG (Dianova)	20 µg/ml
Kaninchen-anti-hGH (human growth hormone; Quartett, Berlin)	1:12,5, 1:25 und 1:50	Cy2-Ziege-anti-Kaninchen IgG (Dianova)	20 µg/ml

### 3.2 Geräte und EDV-Programme

- Gefriermikrotom: Modell SM 200 R (Leica)
- Lichtmikroskop: Zeiss Axioplan 2 (Carl-Zeiss)
- Digitale Kamera: Sony 3CCD
- Konfokales Laserscanning-Mikroskop LSM 510 Meta (Carl-Zeiss)
- LSM Browser (Carl-Zeiss)
- Programm Zeiss Axio Vision 3.1 (Carl-Zeiss)
- Programm SigmaPlot (einschließlich SigmaStat) für Windows (SPSS Inc.)
- Programm Excel für Macintosh (Microsoft)

### 3.3 Verwendetes Hirnmaterial

Zur Durchführung der immunhistochemischen Experimente kamen 20 perfusionsfixierte Mäusehirne zur Anwendung, die im Rahmen einer Kooperation der Arbeitsgruppe um Prof.

Dr. Reinhard Schliebs, Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung der Universität Leipzig, mit Herrn Prof. Dr. Rainer Cermak, Veterinär-Physiologisches Institut der Universität Leipzig, zur Verfügung gestellt wurden.

Aufzucht und Haltung der Tiere, Einteilung der Versuchsgruppen, Durchführung der tierexperimentellen Versuche (Verfütterung der Ginkgo-Präparate) sowie Tötung der Tiere nach Versuchsende, Hirnentnahme und Hirnfixierung erfolgten durch Mitarbeiter des Instituts für Tierernährung und Stoffwechselfysiologie sowie der Abteilung Lebensmittelwissenschaft an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, die damit auch für die Einhaltung der tierschutzrechtlichen Voraussetzungen, Vorschriften und Erfordernisse die alleinige Verantwortung übernommen haben.

Nachfolgend werden die beim Kooperationspartner in Kiel durchgeführten tierexperimentellen Versuche inklusive der Einteilung der Versuchsgruppen und Behandlungen sowie die Hingewebefixierung kurz beschrieben:

Es wurden zwanzig weibliche Mäuse der Zuchtlinie C57Bl6 im Alter von 6 Monaten in 4 Gruppen zu je 5 Tieren mit einem mittleren Körpergewicht von  $24,5 \pm 1,2$ g eingeteilt und unter Standardbedingungen ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 55% relative Luftfeuchtigkeit) mit 14 Stunden Hell-, 10 Stunden Dunkel-Rhythmus sowie freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Den Mäusen wurde entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit ein kommerzielles, halbsynthetisches, wenig Flavonoide enthaltene Diätpräparat verfüttert (C1000, code #100E, Altromin; Lage, Deutschland), das entweder mit keinem weiteren Extrakt (Kontrolle, Gruppe K), mit 300 mg EGb761 Extrakt pro kg Diätpräparat (Ginkgo, Gruppe G), mit 300 mg Flavonoid-Extrakt/kg Diätpräparat (Flavonoide, Gruppe F), oder mit 100 mg Terpenoid-Extrakt/kg Diätpräparat (Terpenoide, Gruppe T) angereichert war. Vor Beginn der gezielten Fütterung wurden die Mäuse eine Woche lang an die Kontrolldiät gewöhnt. Die Tiere hatten während der gesamten Versuchsdauer *ad libitum* Zugang zu den jeweiligen Diäten und Wasser. Die Körpergewichte wurden wöchentlich kontrolliert, die Fütterung dauerte 4 Wochen. Die Tiere erhielten 3 g (pro Tier) des Spezialfutters und bekamen erst dann mehr des (Kontroll)Futter *ad libitum*, wenn die 3 g ingestiert waren. Um dies zu kontrollieren, wurden die Tiere einzeln in Käfigen gehalten.

Entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit wurden die Mäuse nummeriert, so dass im Endeffekt jedes Tier einen Buchstaben (der Gruppe) gepaart mit einer Nummer (1-5) erhielt:

- Gruppe K (Kontrolle, keine Diätzusätze): K51 bis K55 ( $n = 5$ )
- Gruppe G (Ginkgo, EGb761-Extrakt): K101 bis K105 ( $n = 5$ )

- *Gruppe F (Flavonoide, Flavonoid-Extrakt): F151 bis F155 (n = 5)*
- *Gruppe T (Terpenoide, Terpenoid-Extrakt): T201 bis T205 (n = 5).*

Nach Versuchsende wurden die Tiere unter CO<sub>2</sub>-Betäubung mittels intrakardialer Perfusion mit 4%igem Paraformaldehyd (in 0,1 M PB-Puffer) getötet, die entnommenen Hirne für 24h in 4%igem Paraformaldehyd nachfixiert, anschließend in 30%iger Saccharoselösung (in 0,1 M PB-Puffer, pH 7,4) für eine Woche äquiliert und bis zur weiteren Verwendung für die histochemischen Analysen bei 4°C gelagert (unter Zusatz von ca. 0,05% Natriumazid zur Verhinderung von Bakterienbewuchs).

### **3.4 Anfertigung der Hirnschnitte**

Die für die beabsichtigten histochemischen Markierungen benötigten Gewebeschnitte wurden mit Hilfe eines Gefrierschnitt-Mikrotoms (Leica Modell SM 200 R) angefertigt. Dafür wurde mit einem Skalpell das Kleinhirn vom Rest des fixierten Hirns abgetrennt. Im Anschluss wurde das verbliebene Hirngewebe dorsal mit Gewebekleber (Tissue-Tek® O.C.T™; Sakura) auf dem Objektisch des Mikrotoms fixiert und auf -40°C eingefroren. Nach vollständigem Durchfrieren des Gewebes wurden dann bei ca. -25°C 30µm-dicke Frontalschnitte erzeugt. Die Schnitte wurden mit einem feinen Pinsel vom Messer entfernt und bis zur weiteren Verwendung in 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,4 (+0,05% Natriumazid) bei 4°C aufbewahrt.

### **3.5 Immunhistochemie**

Immunhistochemische Methoden ermöglichen die Identifikation von Antigenen im Hinblick auf ihr morphologisches Vorkommen. In der vorgelegten Arbeit kommen mit Immunperoxidase- und Immunfluoreszenztechniken zwei verschiedene Hauptmethoden zur Färbung frei beweglicher frontaler Hirnschnitte zur Anwendung.

#### **3.5.1 Auswahl der Hirnschnitte**

Die angefertigten Hirnschnitte der einzelnen Tiere wurden nach Gruppen und Hirnen sortiert und in entsprechenden vorgefertigten Kunststoffplatten in Natriumazid enthaltender 0,1 M Tris-gepufferter Kochsalzlösung, pH 7,4 (TBS) aufbewahrt. Bei den jeweiligen histochemischen Färbeverfahren wurden für jeden darzustellenden Marker 3 Hirnschnitte pro Tier und pro Gruppe angefärbt. Dabei wurde jeweils ein Schnitt aus dem rostralen, medialen

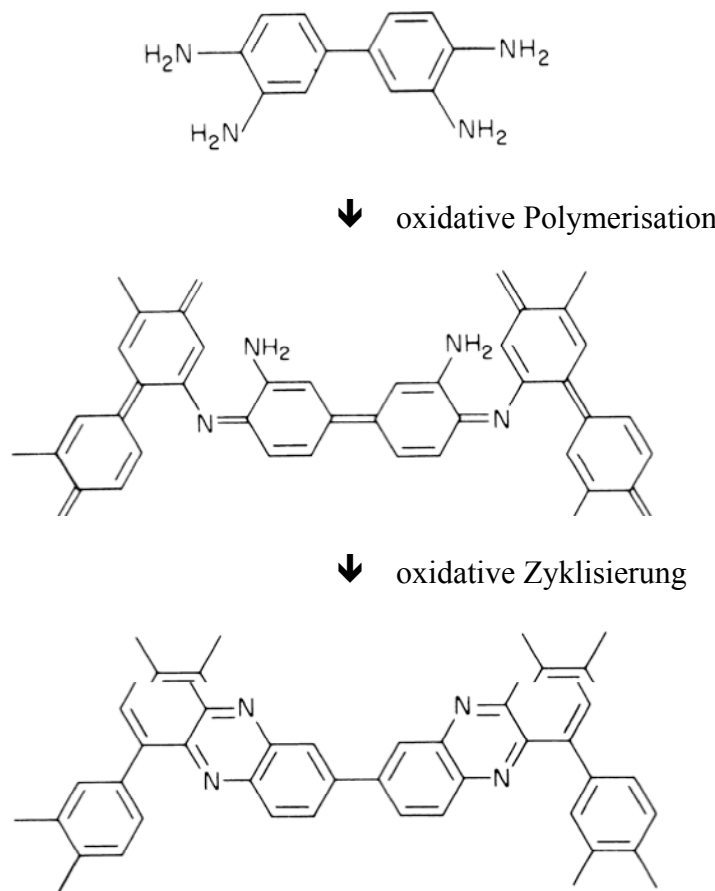
und kaudalen Anteil des Vorderhirnes eingesetzt. Die Auswahl der Schnittebenen erfolgte auf Grundlage des Mäusehirn-Atlas von Paxinos und Franklin (2001):

- Schnitte des rostralen Vorderhirns: Bregma -1,34 mm bis einschließlich -1,82 mm
- Schnitte des medialen Vorderhirns: Bregma -1,94 mm bis einschließlich -2,46 mm
- Schnitte des kaudalen Vorderhirns: Bregma -2,54 mm bis einschließlich -3,08 mm.

### 3.5.2 Durchführung der Immunhistochemie

Eingesetzte immunhistochemische Methoden waren Streptavidin-Biotin-Komplex-(ABC)-Verfahren (als Immunperoxidase-Färbungen) sowie die indirekte Immunfluoreszenz. Bei beiden Techniken bindet zunächst der Primärantikörper an das nachzuweisende Antigen. In einem zweiten Schritt bindet ein gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteter Sekundärantikörper an das F<sub>c</sub>-Fragment des Primärantikörpers. Für Immunfluoreszenz-Markierungen dienen Konjugate aus sekundären Antikörpern und Fluorochromen, die durch Licht eines speziellen Wellenlängenbereichs zur Fluoreszenz angeregt werden können. Im Gegensatz dazu sind Sekundärantikörper für ABC-Methoden mit Biotin konjugiert (biotinyliert). Die Biotinreste werden in einem nachfolgenden Detektionsschritt von Streptavidin gebunden, das in Form präformierter Streptavidin/Biotinyl-Meerrettichperoxidase-Komplexe vorliegt. Während der anschließenden Färbereaktion setzt HRP sein Substrat Wasserstoffperoxid um, wobei die Chromogene DAB und Nickelammoniumsulfat ein farblich sichtbares Polymer bilden. Wegen seiner extrem schlechten Löslichkeit fällt das (blau)schwarze Reaktionsprodukt ohne nennenswerte Diffusion am Antigenort aus. Durch ihre Signalverstärkung ist die ABC-Reaktion sehr sensitiv. Streptavidin (aus den Überständen von *Streptomyces avidinii*) zeigt weniger unspezifische Bindungen im Gewebe als das aus Hühnereiern gewonnene Glykoprotein Avidin. Mitentscheidend für die Qualität der Färbung sind gründliche Waschschrte zwischen den verschiedenen Inkubationsschritten; lediglich nach der Blockierung durch ein Ziege- oder Esel-Normalserum erfolgt keine Waschung. Bei allen immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Schnitte während der Inkubation in ständiger Bewegung gehalten, vor allem um die Diffusion der Antikörper zu ihren Zielorten im Gewebe zu erleichtern.

## DAB



**Abb. 3.1: Peroxidase-katalysierte Reaktion des Diaminobenzidins.** (modifiziert nach [http://online-media.uni-marburg.de/biologie/klsm/Vorlesungen/VS\\_Immuncytochemie.pdf](http://online-media.uni-marburg.de/biologie/klsm/Vorlesungen/VS_Immuncytochemie.pdf).) Die Immunperoxidase nutzt als Elektronendonator Diaminobenzidin (DAB), das zu einem braunen, extrem unlöslichen Farbprodukt umgesetzt wird. Diese Reaktion wird dann durch Zugabe von Nickel verstärkt werden und führt dann zu einem (blau)schwarzen Reaktionsprodukt (Hancock 1984; Seeger et al. 1994).

### 3.5.2.1 Immunperoxidase-Nachweis von Transthyretin

Frei bewegliche Schnitte wurden dreimal für je 10 Minuten in 0,1 M Tris-gepufferter Kochsalzlösung, pH 7,4 (TBS) gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 30 Minuten in einer 0,6 %igen Wasserstoffperoxid-Lösung in TBS bewegt um endogene Peroxidasen des Gewebes zu deaktivieren. Nach erneut dreimaligem Waschen für je 10 Minuten wurden unspezifische Bindungsstellen für nachfolgend eingesetzte Immunchemikalien durch eine einstündige Inkubation in Blockierlösung blockiert. Diese Lösung bestand aus 5% Esel-Normalserum (NDS = normal donkey serum) und 0,3% Triton X-100 (Sigma) in 0,1 M TBS (= NDS-TBS-T). Anschließend wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper Schaf-anti-Transthyretin (1:4000 in NDS-TBS-T) etwa 20 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Bei allen immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Schnitte während der Inkubation in



ständiger Bewegung auf dem Wipptisch gehalten. Ungebundener Primärantikörper wurde am Folgetag durch dreimaliges, je zehnminütiges Waschen in 0,1 M TBS entfernt. Die Schnitte wurden dann für 1 h mit Sekundärantikörper (biotinyliertes Esel-anti-Schaf IgG, 1:500 in BSA-TBS) inkubiert. Nach erneutem, dreimaligen Waschen für je 10 Minuten in TBS wurden die Schnitte mit präformierten ABC-Komplexen für 1 Stunde inkubiert. Die Komplexe wurden zuvor für ca. 1 h aus Streptavidin (Invitrogen) und biotinylierter HRP (Markerenzym Grad I, Roche Molecular Biochemicals; modifiziert mit Biotinylamidocaproyl-N-hydroxysuccinimidester) präformiert: die Endkonzentrationen betragen 12,5µg/ml für Streptavidin sowie 2,5µg/ml für biotinylierte HRP in BSA-TBS. Es folgte zweimaliges Waschen der Schnitte in 0,1 M TBS sowie eine einmalige, zehnminütige Äquilibrierung in Substratpuffer, d.h. 0,05 M Tris-Puffer, pH 8,0 und dann mit DAB-Nickel-Lösung (2mg Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid + 40 mg Nickelammoniumsulfat-Hexahydrat in 10 ml Substratpuffer). Für die Visualisierungsreaktion diente schließlich mit 0,5µl 30%igem Wasserstoffperoxid pro Milliliter versetzte DAB-Nickel-Lösung. Es resultierte ein (blau)schwarzes Reaktionsprodukt. Der Färbevorgang wurde in der Regel nach 3 Minuten durch Transfer in TBS abgebrochen. Es folgte die gründliche, einminütige Waschung der Schnitte in 0,1 M TBS sowie anschließend in destiliertem Wasser, aus dem sie mit einem feinen Pinsel auf Objektträger aufgezogen wurden. Abschließend wurden die luftgetrockneten Schnitte mit Entellan (in Toluol; Merck, Darmstadt) eingedeckt.

#### Immunperoxidase-Nachweis von Prolaktin

Zahlreiche Reaktionsschritte der oben beschriebenen Immunperoxidase-Markierung von Transthyretin wurden übernommen. Nach Deaktivierung der endogenen Peroxidasen wurden unspezifische Bindungsstellen für 1 h mit 5% Ziege-Normalserum (NGS = normal goat serum) und 0,3% Triton X-100 (Dianova) in 0,1 M TBS (= NGS-TBS-T) geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Kaninchen-anti-Prolaktin (1:3000 in NGS-TBS-T) für 20 h bei Raumtemperatur. Daraufhin mit TBS gewaschene Schnitte wurden für 1 h mit biotinyliertem Ziege-anti-Kaninchen IgG (1.500 in BSA-TBS) inkubiert. Die weitere Versuchsdurchführung, d.h. Inkubation mit ABC-Komplexen, Färben, Aufziehen und Eindecken der Schnitte, war mit dem für die Transthyretinmarkierung beschriebenen Vorgehen identisch.

### Immunperoxidase-Nachweis von Tau-Protein

Nach gründlicher Waschung der Gewebeschnitte mit TBS und Beseitigung der endogenen Peroxidase-Aktivität erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit NGS-TBS-T für 1 h. Daraufhin wurden die Schnitte mit Kaninchen-anti-Tau (1:2000 in NGS-TBS-T) für 20 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das weitere Vorgehen, d.h. Inkubation mit biotinyliertem Ziege-anti-Kaninchen IgG und nachfolgend mit ABC-Komplexen, Färben sowie das Aufziehen und Eindecken der Schnitte, war mit dem oben beschriebenen Vorgehen identisch.

### Versuche zur Immunperoxidase-Markierung von Wachstumshormon

Für den Nachweis von immunreaktivem humanem growth hormone wurde prinzipiell ebenfalls das oben beschriebene Schema genutzt und verfolgt. Der Nachweis dieses Proteins erfolgte in der vorgelegten Arbeit jedoch nur als Testung in drei verschiedenen Konzentrationen des primären Antikörpers. Dementsprechend wurden hier pro Fütterungsgruppe nur ein Hirnschnitt für die jeweilige Verdünnung des primären Antikörpers verwendet. Aufgrund des resultierenden Ergebnisses wurde auf eine aufwendige Färbung aller Tiere verzichtet. Das weitere Vorgehen mit Waschungen und den einzelnen Reaktionsschritten war wieder identisch, nur wurden hier nach Deaktivierung der endogenen Peroxidasen die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation mit NGS-TBS-T für 1 h blockiert, wie bei der Nachweisreaktion des Transthyretins und des Tau-Proteins. Danach wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper Kaninchen-anti-hGH, der in 3 verschiedenen Verdünnungen angesetzt wurde (1:25, 1:50 und 1:100 in der Blockierlösung) für 20 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das weiteren Färbeschritte mit biotinyliertem Esel-anti-Kaninchen IgG und nachfolgend mit ABC-Komplexen, Färben sowie das Aufziehen und Eindecken der Schnitte, war mit dem oben beschriebenen Vorgehen identisch.

### **3.5.2.2 Immunfluoreszenz**

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten indirekten Immunfluoreszenztechniken gelten als relativ empfindliche Verfahren und erfordern im Vergleich zu Immunperoxidaseverfahren einen geringeren zeitlichen Aufwand. Darüber hinaus sind sie eine Methode der Wahl, wenn der Nachweis der Ko-Expression von Antigenen geführt werden soll, was aber nicht Gegenstand dieser Studie war. Im Gewebe gebundene Primäantikörper lassen sich durch fluorochromierte Sekundäantikörper visualisieren. Als Fluorochrome können z.B. Carbocyanin (Cy2), AlexaFluor488 oder DyLight488 mit einer Anregungswellenlänge von

ca. 490 nm („Blauanregung“) und einer Emissionswellenlänge von 508 nm (erscheint grün), sowie Indocarbocyanin (Cy3) mit einer Anregungswellenlänge von ca. 550 nm („Grünanregung“) und einer Emissionswellenlänge von 570 nm (erscheint rot) eingesetzt.

Der Nachweis durch indirekte Immunfluoreszenz erfolgte für die bereits durch Immunperoxidase-Färbungen detektierten Marker TTR, Prolaktin und Gesamt-Tau. Hinzu kam die Detektion von phosphoryliertem Tau-Protein durch den monoklonalen Antikörper AT8, der die phosphorylierten Aminosäuren 202 und 205 von menschlichem Tau erkennt (Goedert et al. 1995). Es wurden für alle 4 Marker Färbungen von Hirschnitten sämtlicher Tiere aller Gruppen (K, G, F und T) durchgeführt. Lediglich für den Marker GH wurden auch hier nur wenige Schnitte, nicht repräsentativ für das Tierkollektiv, verwendet, da die Detektion auch bei der Immunfluoreszenz auf eine Testung mit drei verschiedenen Verdünnungen des Primärantikörpers beschränkt blieb.

Die frei beweglichen Schnitte wurden zu Beginn viermal für 10 Minuten in 0,1 M TBS bei pH 7,4 gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen nachfolgend eingesetzter Immunchemikalien erfolgte mit NDS-TBS-T (für die Detektion von Gesamt-Tau und Transthyretin) oder mit NGS-TBS-T (für die Detektion von Phospho-Tau, Gesamt-Tau und Prolaktin). Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur mit den primären Antikörpern inkubiert (siehe Tabelle 3.3). Nach erneutem viermaligen Waschen (je 10 Minuten) in TBS wurden die Schnitte aus destilliertem Wasser mit einem feinen Pinsel auf Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und abschließend mit Entellan (Merck) eingedeckt.

#### Vergleichende Analyse von Tau-Protein und Phospho-Tau

Zu Vergleichszwecken wurden Gesamt-Tau und Phospho-Tau in der oben beschriebenen Weise auch in autoptischen menschlichen Hirschnitten eines Patienten mit verifizierter AD (AD; 462/01, neokortikale Area 7) durch indirekte Immunfluoreszenz visualisiert. Die Schnitte stammten von autoptischem Hirngewebe, dessen Verwendung für Forschungszwecke durch die zuständige Ethikkommission genehmigt worden war und das Herr Professor Dr. Thomas Arendt (Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung) nach neuropathologischer Klassifizierung (Braak-Stadium VI) freundlicherweise zur Verfügung gestellt hatte.

#### **3.5.2.3 Immunhistochemische Kontrollen**

Als histologische Kontrollen dienten in der vorgelegten Arbeit Gewebeschnitte, die statt mit Primärantikörpern lediglich mit Blockierlösungen inkubiert wurden. Diese Hirschnitte

wurden danach den oben genannten Immunperoxidase- und Immunfluoreszenz-Techniken unterworfen. In den histologischen Kontrollen fehlte jegliche zelluläre Immunreaktivität.

### **3.6 Visuelle Auswertung der immunhistochemischen Präparate**

Die Auswertung der immunhistochemischen Hirnschnittpräparate erfolgte am Lichtmikroskop (Zeiss Axioplan 2), um sowohl Qualität der Immunfärbungen und die Verteilung des Marker auch im Hinblick auf die Qualität der eingesetzten primären Antikörper zu beurteilen. Für die Färbeserien mit guter Darstellung der Marker erfolgte eine photographische Dokumentation der Präparate mit der digitalen Kamera (Sony 3CCD) und der Software (Zeiss Axio Vision 3.1). Die fluoreszenzmarkierten Schnitte wurden mittels eines konfokalen Laserscanning Mikroskops (Zeiss LSM 510) untersucht und dokumentiert. Ziel dieses Vorgehens war es, auf der Grundlage der Intensität und der Regionen-spezifischen Verteilung der Immunreaktivität qualitative Unterschiede im Expressionsgrad der untersuchten Proteine innerhalb der Versuchsgruppen zu analysieren.

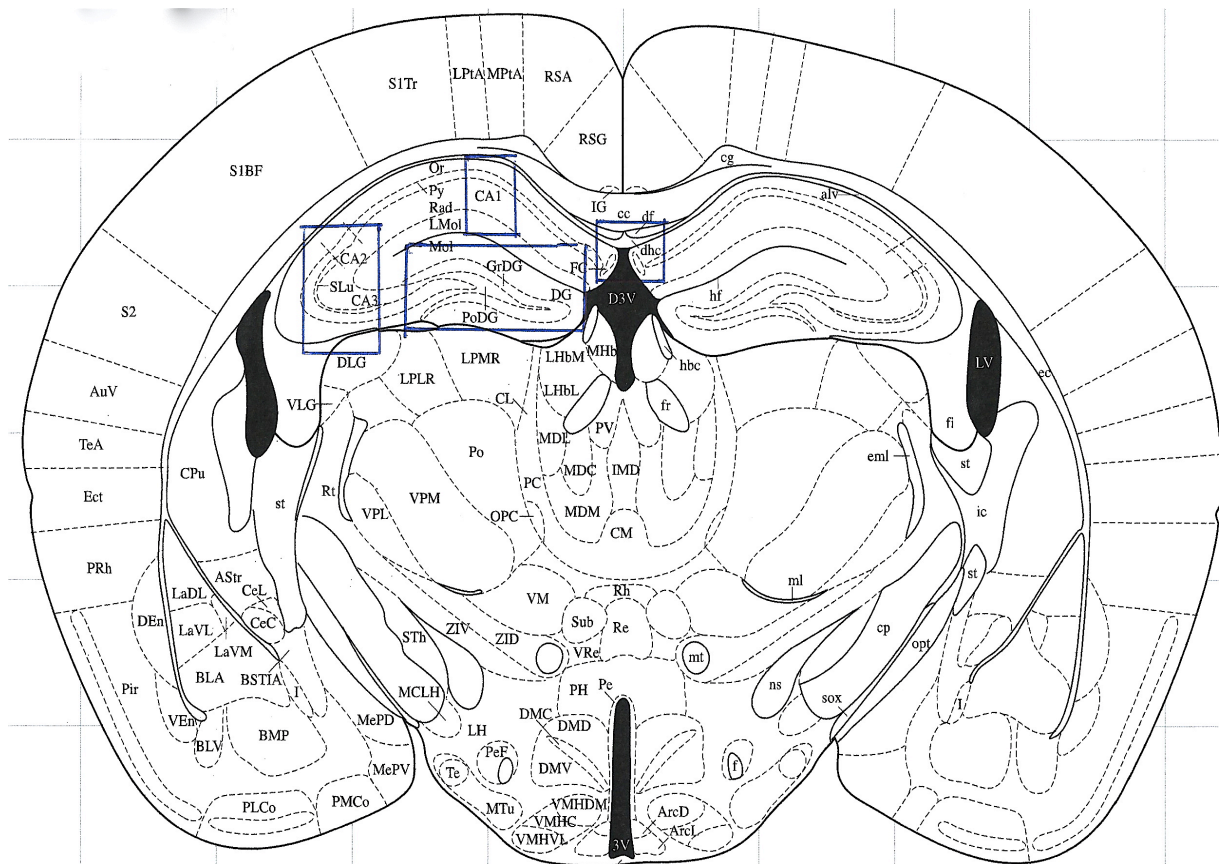
Bei den Präparaten, die offensichtliche Unterschiede in Intensität und Verteilung innerhalb der Versuchsgruppen zeigten, wurde eine semiquantitative densitometrische Analyse in Betracht gezogen, wie sie im Kapitel 3.7 näher beschrieben wird.

### **3.7 Semiquantitative Auswertung ausgewählter immunhistochemischer Präparate**

An ausgewählten Hirnschnitten mit TTR-Immunmarkierung erfolgte eine Analyse der Farbeintensität mittels Densitometrie unter Verwendung eines computergestützten Bildanalyzesystems sowie des Softwarepaketes MCID 4.0 (Imaging Research Inc., Canada). Die auf Objektträgern befindlichen Hirnschnitte, ausgerichtet auf einem Lichttisch, wurden mittels einer Videokamera (Sony-CCD-Videokamera mit 50 mm Objektiv) als digitalisiertes Graustufenbild unter standardisierten Beleuchtungsverhältnissen in den PC eingelesen und gespeichert.

Das Prinzip der digitalen Bildanalyse besteht darin, dass ein mittels Videokamera aufgenommenes Bild in 768 x 1024 Bildpunkte (Pixel) zerlegt und jedem Bildpunkt sowohl eine x-y-Koordinate (Lokalisation) als auch ein Energiewert (Farbtiefe bzw. Grauwert) zugeordnet wird. In der Regel wird die Farbtiefe (Grauwert) eines Bildpunktes durch 256 Abstufungen (von 0 (schwarz) bis 255 (weiß)) charakterisiert und kann auch als Extinktion (relative optische Dichte (ROD) zwischen 0 (weiß) und 2.4 (schwarz)) angegeben werden.

Durch Positionierung geeigneter Flächen (Rechtecke, Kreise, etc.) auf die zu analysierende Region des digitalisierten Bildes ist es möglich, die Summe oder das Mittel der Grauwerte aller sich innerhalb der umschriebenen Fläche befindlichen Pixel zu berechnen.



**Abb. 3.2:** Schematische Zeichnung eines Hirnschnittes Ebene Bregma -1.82 mm. (modifiziert nach Paxinos und Franklin, *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second Edition 2001). Eingezeichnet sind 4 Boxen, repräsentativ für die vermessenen Areale innerhalb des Hippocampus.

Um die TTR-Immunreaktivität in Hirnmaterial von Experimental- und Kontroll-Tieren zu vergleichen, wurden für die Bildanalyse koronare Hirnschnitte in verschiedenen Abständen vom Bregma herangezogen und jene Hirnareale einer Analyse unterzogen, die eine deutliche TTR-Immunreaktivität aufwiesen (für Übersicht, siehe Tabelle 3.4).

Zur Messung der optischen Dichte der immunhistochemischen Färbungen in den einzelnen Hirnarealen wurden bewegliche zweidimensionale Boxen (Rechtecke) auf dem Bildschirm entsprechend den anatomischen Vorgaben des hirnanatomischen Atlas der Maus nach Paxinos und Franklin (2001) angepasst und durch Mittelung der Einzel-Grauwerte aller innerhalb der Box befindlichen Pixel ein mittlerer Grauwert berechnet. Der so erhaltene mittlere Grauwert (optische Dichte) der umschriebenen Fläche (Hirnregion) wurde als semiquantitatives Maß für die Intensität der Immunreaktivität im jeweiligen Hirnareal betrachtet und für

vergleichende Hirnregion-spezifische Untersuchungen zwischen Experimental- und Kontrolltieren herangezogen, wobei die Daten um die jeweilige Hintergrundfärbung der immunhistochemischen Präparate korrigiert wurden.

Jedes Hirnareal wurde in beiden Hirnhälften an 2 Folgehirsnschnitten vermessen. Somit ergaben sich zunächst 5 Einzelwerte pro Hirnregion und Tier. Im Hippokampus erfolgte neben der Erfassung der 4 Gesamtregionen auch eine Vermessung von Subarealen, die später statistisch mit den Daten der Gesamtregion verglichen wurden.

Nun erfolgte der Vergleich des erhaltenen mittleren Grauwertes (optische Dichte) eines Tieres für die jeweiligen Regionen sowie dessen Mittelung innerhalb einer Gruppe. Jede Gruppe bestand aus 5 Tieren. Hierfür wurde erneut ein Standardfehler berechnet, der die Abweichung innerhalb einer Gruppe angibt.

Die berechneten Mittelwerte der optischen Dichte für die verschiedenen, vermessenen Regionen innerhalb der Versuchsgruppen wurden einer statistischen Auswertung (univariate Varianzanalyse mit anschließendem t-Test, bei Heranziehung der Software SigmaPlot (einschließlich SigmaStat) der Firma SPSS Inc., sowie der Software Excel der Firma Microsoft unterzogen, um schließlich eine Aussage treffen zu können, ob Ginkgo-Behandlung die Transthyretin-Expression in einer bestimmten Hirnregion beeinflusst, wobei die regionalen Intensitätsunterschiede der Transthyretin-Immunreaktivität als Prozentabweichung zur Kontrolle dargestellt werden. Unterschiede wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn  $P < 0,05$  war.

**Tab. 3.4:** Übersicht über die untersuchten Hirnregionen des Hippokampus, die einer densitometrischen Analyse unterzogen wurden; Ebenen wurden nach Paxinos und Franklin, *The Mouse Brain in Sterotaxic Coordinates*, second edition (2001) bestimmt und festgelegt

Vermessende Ebene	Vermessende Hirnregion	Abkürzung
Bregma -1,34 bis -1,82 mm	1.CA2 und CA3 rechts / links 2.Gyrus dentatus rechts / links 3.CA1 rechts / links 4.Dors. Kommissur/3. Ventrikel	CA2, CA3 DG CA1 dhc / D3V
Bregma -1,94 bis -2,46 mm	1.CA2 und CA3 rechts / links 2.Gyrus dentatus rechts / links 3.CA1 rechts / links 4.Dors. Kommissur/3. Ventrikel	CA2, CA3 DG CA1 dhc / D3V
Bregma -2,54 bis -3,08 mm	1.CA2 und CA3 rechts / links 2.Gyrus dentatus rechts / links 3.CA1 rechts / links 4.Dors. Kommissur/3. Ventrikel	CA2, CA3 DG CA1 dhc / D3V

## 4 Ergebnisse

Microarray-Analysen von Mäusehirnen, die zuvor einer chronischen Behandlung mit *Ginkgo biloba*-Präparaten unterzogen worden waren, zeigten unter anderem veränderte Expression von Genen, die für Prolaktin, GH, Tau-Protein und TTR kodieren (Rimbach et al. 2003; Watanabe et al. 2001). Um zu klären, ob sich die auf der Transkriptionsebene beobachteten, durch Ginkgo-vermittelten Effekte auch auf die Expression der entsprechenden Proteine auswirken, wurden die Hirne von mit *Ginkgo biloba* behandelten Mäusen einer immunhistochemischen Analyse unterzogen (Ginkgo-Gruppe G). Die für die vorliegende Studie herangezogenen Mäuse erhielten für 4 Wochen eine Diät mit EGb761, einem definierten Extrakt aus *Ginkgo biloba*-Pflanzenteilen, als Beimengung ins Futter. Da bekannt ist, dass sich der EGb761-Extrakt u.a. aus pharmakologisch wirksamen Terpenoid- und Flavonoid-Fractionen zusammensetzt, wurde in der vorliegenden Arbeit auch Hirnmaterial von Mäusen einbezogen, die definierte Beimengungen der Flavonoid-Fraktion (Flavonoid-Gruppe F) oder der Terpenoid-Fraktion (Terpenoid-Gruppe T) im Futter enthielten. Hiermit sollte geklärt werden, ob und welche Fraktionen des EGb761-Extraktes die zu erwartenden Proteinveränderungen verursachen. An Hirnschnitten von Perfusions-fixiertem Hirnmaterial wurden zunächst kommerziell verfügbare Antikörper gegen relevante Marker wie z.B. Tau oder TTR getestet, dann unter identischen experimentellen Bedingungen immunhistochemische Präparate von Hirnschnitten aus allen untersuchten Experimentalgruppen hergestellt und diese zunächst lichtmikroskopischen Analysen unterzogen, wobei insbesondere auf Unterschiede in der regionalen Expression und Intensität der immunreaktiven Signale zwischen den untersuchten Versuchsgruppen geachtet wurde (Kapitel 4.1 bis 4.4).

In den Fällen, wo sich die immunreaktiven Signale und regionalen Verteilungen zwischen den Versuchsgruppen unterschieden, wurde eine semiquantitative Auswertung der Signalintensitäten mittels PC-gestützter Bildanalyse vorgenommen (Kapitel 4.5).

### 4.1 Immunhistochemie zum Nachweis von Wachstumshormon (GH)

Die Versuche zur Immunperoxidase-Markierung sowie zur Markierung durch indirekte Immunfluoreszenztechnik von GH blieben auf Testreihen beschränkt, um die jeweils erforderliche Konzentration des Primärantikörpers zu ermitteln. Mit beiden Verfahren konnte in den gewählten Verdünnungen GH-Immunreaktivität weder im Hippokampus noch im

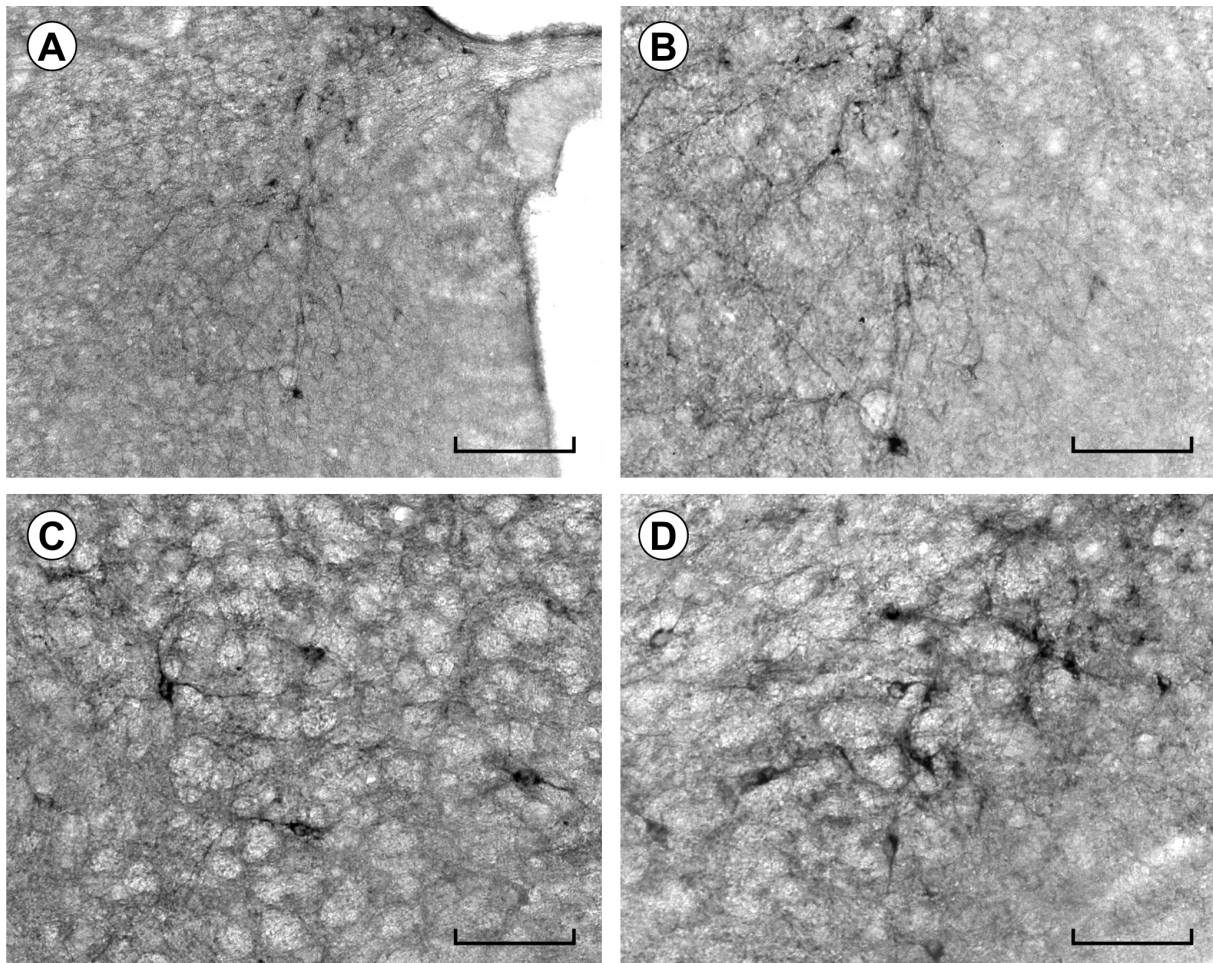


Neokortex nachgewiesen werden. Als sekundärer Antikörper bei der Immunperoxidase-Markierung wurde biotinyliertes Ziege-anti-Kaninchen IgG für die indirekte Immunfluoreszenz-Markierung Cy2-Ziege-anti-Kaninchen IgG genutzt: beide Reagenzien waren bei der Detektion der anderen Markerproteine erfolgreich eingesetzt worden.

## **4.2 Immunhistochemie zum Nachweis von Prolaktin**

### **4.2.1 Normalverteilung im Maushirn**

Zahlreiche, vermutlich peptiderge Prolaktin-immunpositive Zellen, wurden im ventromedialen und dorsomedialen Hypothalamuskerns sowie im Nucleus paraventricularis (A, B) detektiert. Prolaktin-immunpositive Zellen wurden darüber hinaus im lateralen Bereich des piriformen Kortex und in der Regio praepiriformis (C, D) gefunden: Hierbei könnte es sich um Mitralzellen der dort vorhandenen Faserverbindungen der Riechrinde oder ebenfalls peptiderge Nervenzellen des angrenzenden Corpus amygdaloideum-Kerngebietes handeln, wie in Abbildung 4.1 dargestellt. Keine Prolaktin-Immunreaktivität fand sich hingegen in den übrigen Rindenregionen des sensomotorischen Kortex. Ebenso konnte kein Nachweis Prolaktin-positiver Zellen in den Subfeldern des Hippokampus erbracht werden. Das beschriebene Verteilungsmuster der Prolaktin-Immunreaktivität fand sich in allen Tieren der Kontrollgruppe K.



**Abb. 4.1.:** Immunperoxidase markierung von Zellen im Bereich des dorsomedialen Hypothalamuskernes und des Nucleus paraventricularis einer Maus der Gruppe T in unterschiedlicher Vergrößerung (A, B). Prolaktin-positive Zellen des lateralen piriformen Kortex in höherer Vergrößerung, wobei je ein Tier der Gruppen K (Kontrolle, C) und G (D) exemplarisch abgebildet ist. Die Immunmarkierung erfolgte mit einer Streptavidin-Biotin-Technik und Nickel-verstärktem Diaminobenzidin als Chromogen. Der Messbalken in A entspricht 25  $\mu\text{m}$ , die Messbalken in B, C und D entsprechen 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2 Prolaktin-Expression nach *Ginkgo biloba*-Behandlung

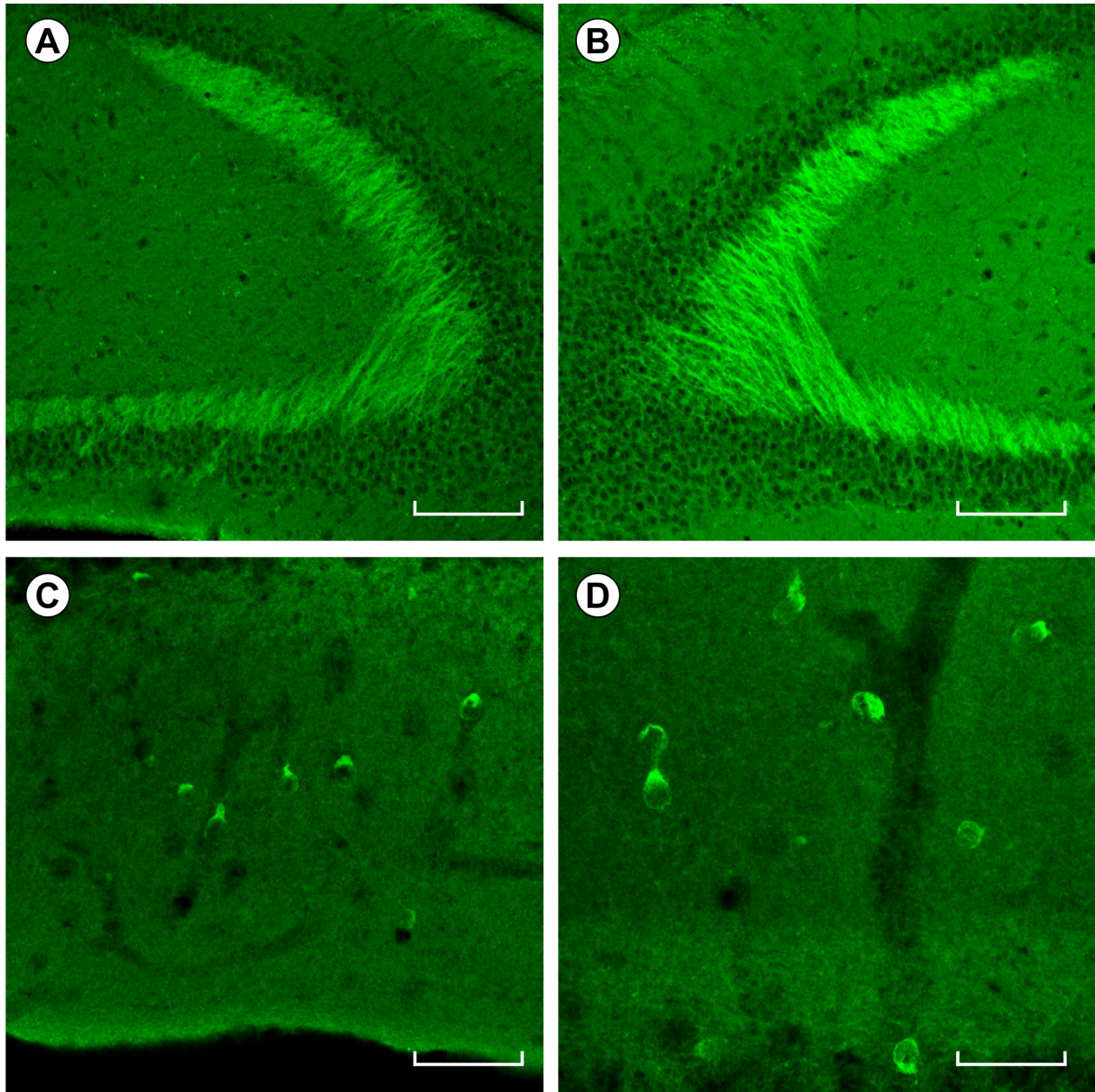
Es zeigten sich innerhalb der 4 Versuchsgruppen keine offensichtlichen Unterschiede in Intensität und Verteilung der Immunreaktivität. Das regionale Expressionsmuster der Tiere der Gruppe G (Ginkgo), T (Terpenoid-Fraktion) und F (Flavonoid-Fraktion) erschien nahezu unverändert im Bereich des ventro- und dorsomedialen Thalamuskernes sowie im Bereich des Nucleus supraventricularis. Es zeigte sich kein Unterschied in der Quantität der dort nachgewiesenen Prolaktin-positiven Nervenzellen, auch nicht hinsichtlich der Intensität der

Immunreaktivität. Gleichmaßen verhielt es sich im lateralen Bereich des piriformen Kortex, teilweise angrenzend an das Corpus amygdaloideum-Kerngebiet. Die Muster der Immunreaktivität glichen denen aus der Kontrollgruppe K.

### **4.3 Immunhistochemie zum Nachweis von Gesamt-Tau**

#### **4.3.1 Normalverteilung von Gesamt-Tau im Maushirn**

Mit gegen das Tau-Gesamtmolekül gerichteten Antikörpern und einer Immunperoxidase-Technik, wurde eine Färbeserie aller Tiere aller 4 Gruppen hergestellt. Es konnten Tau-immunpositive Zellen im Bereich des Hippokampus sowie des Subiculum nachgewiesen werden. Im Bereich des Subfeldes CA3 zeigte sich die stärkste Immunreaktivität in Moosfasern (Abbildung 4.2 A, B). Des Weiteren fanden sich immunreaktive Zellen im Bereich des Subfeldes CA1, das kleine Pyramidenzellen enthält, sowie im Bereich der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (Fascia dentata, keine Abbildungen). Tau-Protein-positive Zellen im Bereich des Subiculum werden in Abbildung 4.2 (C, D) repräsentativ gezeigt.



**Abb. 4.2:** Laserscanning-mikroskopische Aufnahmen der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung von Gesamt-Tau in der hippocampalen Formation. Exemplarisch gezeigt werden die rostrale CA3 Region eines Tieres der Kontrollgruppe K (A) und die kaudalere CA3 Region eines Tieres der mit EGb761 behandelten Gruppe G (B) sowie die höhere Vergrößerung des Subiculus beider Tiere (C, D). Die Cy3-Markierung wurde grün farbkodiert. Die Messbalken in A und B entsprechen 25  $\mu\text{m}$ , die Messbalken in C und D entsprechen 100  $\mu\text{m}$ .

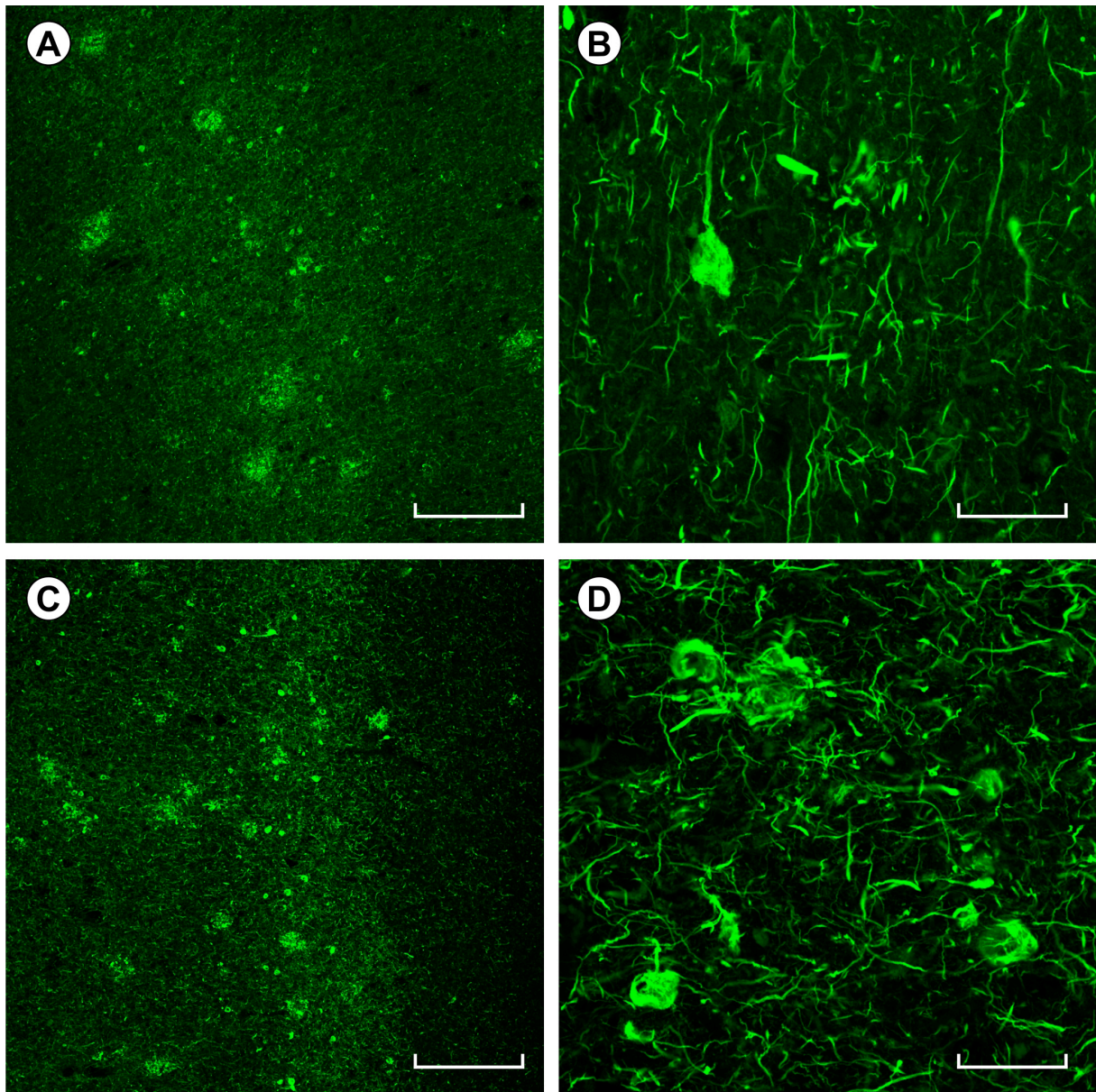
#### 4.3.2 Gesamt-Tau Expression nach *Ginkgo biloba*-Behandlung

Bei der mikroskopischen Auswertung der korrespondierenden Hirnschnitte aus den 4 Experimentalgruppen wurden keine offensichtlichen Unterschiede in Intensität oder Verteilung des Markers zwischen den verschiedenen Gruppen deutlich. Die Abbildung 4.2 zeigt Gesamt-Tau-Protein-positive Fasern im Bereich der CA3-Region in je einem Tier der Gruppe K (Kontrolle, A) und in der Gruppe G (Fütterung mit EGb761, B), sowie Gesamt-Tau immunpositive Zellen im Subiculum beider Tiere (C, D). Alle 4 Gruppen wiesen in der CA3-

Region eine auch in ihrer Intensität ähnliche Immunmarkierung auf. Ebenso verhielt es sich in Bezug auf die CA1-Region. Auch der Gyrus dentatus mit seiner dichten Körnerzellschicht präsentierte sich in den zu untersuchenden Fütterungsgruppen mit Gesamt-Tau-positiven Nervenzellen in nicht unterscheidbarer Weise.

#### **4.3.3 Vergleich von Gesamt-Tau und Phospho-Tau im *post mortem* Hirngewebe von Alzheimer-Patienten**

Die Tau-Pathologie mit der Ausbildung der für AD typischen NFT ist neben den neuritischen Plaques eines der histopathologischen Hauptmerkmale der Erkrankung. Dies sollte an einem Beispiel visualisiert werden, um den verwendeten Kaninchen-Antikörper gegen Gesamt-Tau auch in einem nachweislich pathologischen Setting einsetzen zu können. Da es sich bei den verwendeten Mäusen um nicht-transgene Mäuse ohne Alzheimer-Pathologie handelte, wurde auf eine Markierung des Markers Phospho-Tau verzichtet, zumal dieser Marker auch in den dieser Arbeit zu Grunde liegenden Vorversuchen nicht untersucht wurde. Zu Vergleichszwecken wurden sowohl Gesamt-Tau als auch Phospho-Tau in menschlichen, kortikalen Hirnschnitten von autoptischem Hirngewebe eines Patienten mit AD durch indirekte Immunfluoreszenz visualisiert. Unter physiologischen Bedingungen ist die Tau-Expression besonders hoch in nicht-myelinisierten, kortikalen Axonen, z.B. im Hippokampus. Zur Darstellung der neuropathologischen Veränderungen im autoptischen kortikalen Gewebe eines AD-Patienten diente ebenfalls eine indirekte Cy3-Immunmarkierung, die durch Laserscanning-Mikroskopie visualisiert wurde (Abbildung 4.3 A-D). Deutlich werden neurofibrilläre Tangles (A) sowie in höherer Auflösung die neuritischen Plaques (B). Im Vergleich zur Darstellung des Phospho-Tau durch den gut etablierten Antikörper AT8 zeigten sich diese Läsionen noch prominenter (C und D). AT8 bindet selektiv Phospho-Serin202 und Phospho-Threonin205 von Tau (Goedert et al. 1995; Mercken et al. 1992). Hyperphosphoryliertes Tau-Protein ist unlöslich, hat aufgrund seiner durch abnormale Phosphorylierung bedingten Konformationsänderung keine Assoziation zu Mikrotubuli mehr und aggregiert schließlich zu pathologischen PHF als Hauptkomponente der NFT, die in Zellkörpern, Dendriten und in mit Plaques assoziierten, dystrophen Neuriten vorkommen.



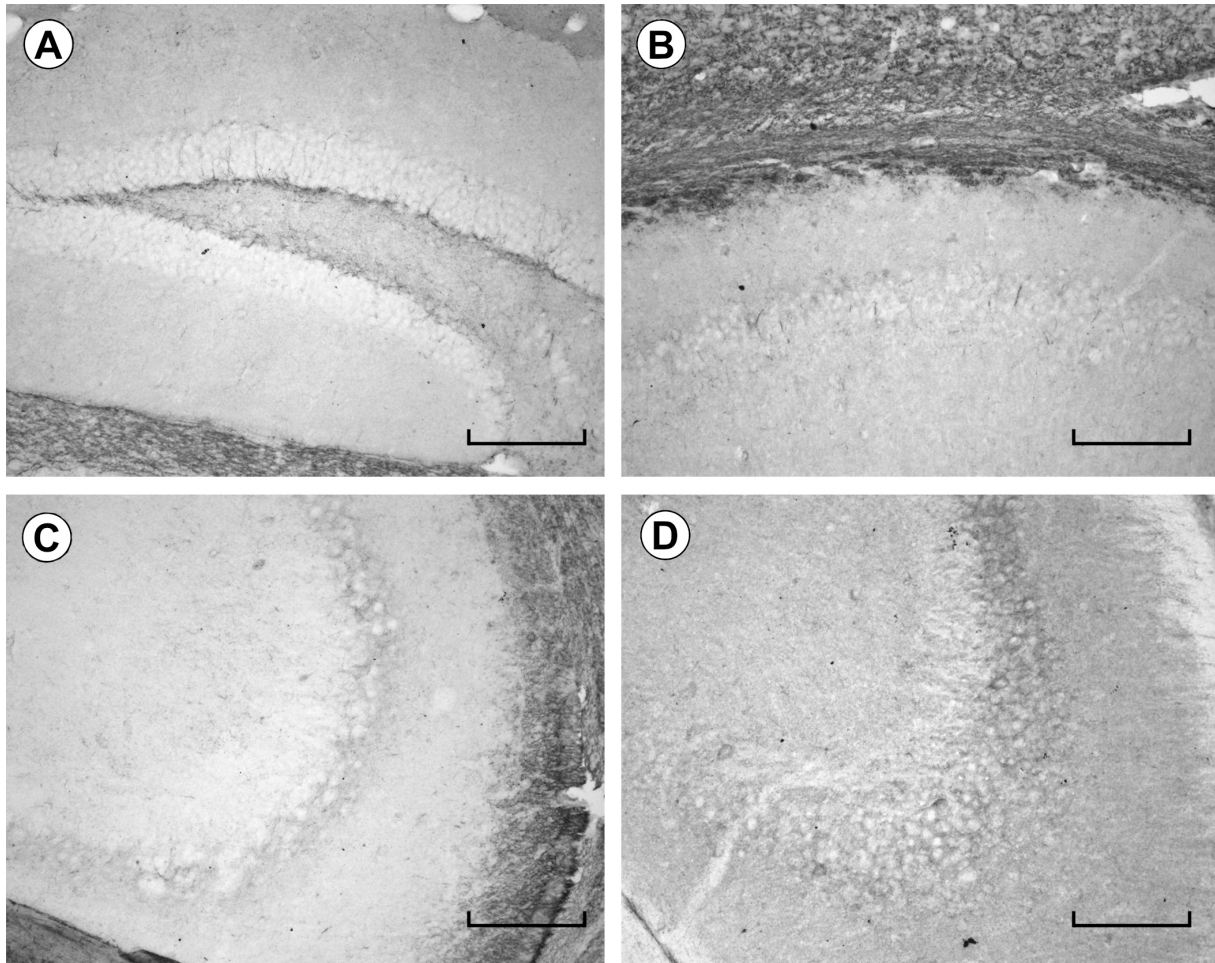
**Abb. 4.3:** Indirekte Cy3-Immunfluoreszenzmarkierung von Tau mit Antikörpern gegen Gesamt-Tau (A, B) sowie AT8-immunpositiver Fasern und Zellen (C, D) mittels Immunfluoreszenz in menschlichen, kortikalen Hirnschnitten eines Patienten mit AD. A und B zeigen in unterschiedlichen Vergrößerungen Gesamt-Tau als Bestandteil der für AD typischen neurofibrillären Tangles und neuritischen Plaques, während C und D in unterschiedlicher Vergrößerung die Tauopathie auf Grundlage einer AT8-Färbung visualisieren. Die Cy3-Markierung wurde grün farbkodiert. Die Messbalken in A und C entsprechen 20  $\mu\text{m}$ , die Messbalken in C und D entsprechen 120  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4 Immunhistochemie zum Nachweis von Transthyretin

##### 4.4.1 Normalverteilung im Hippokampus

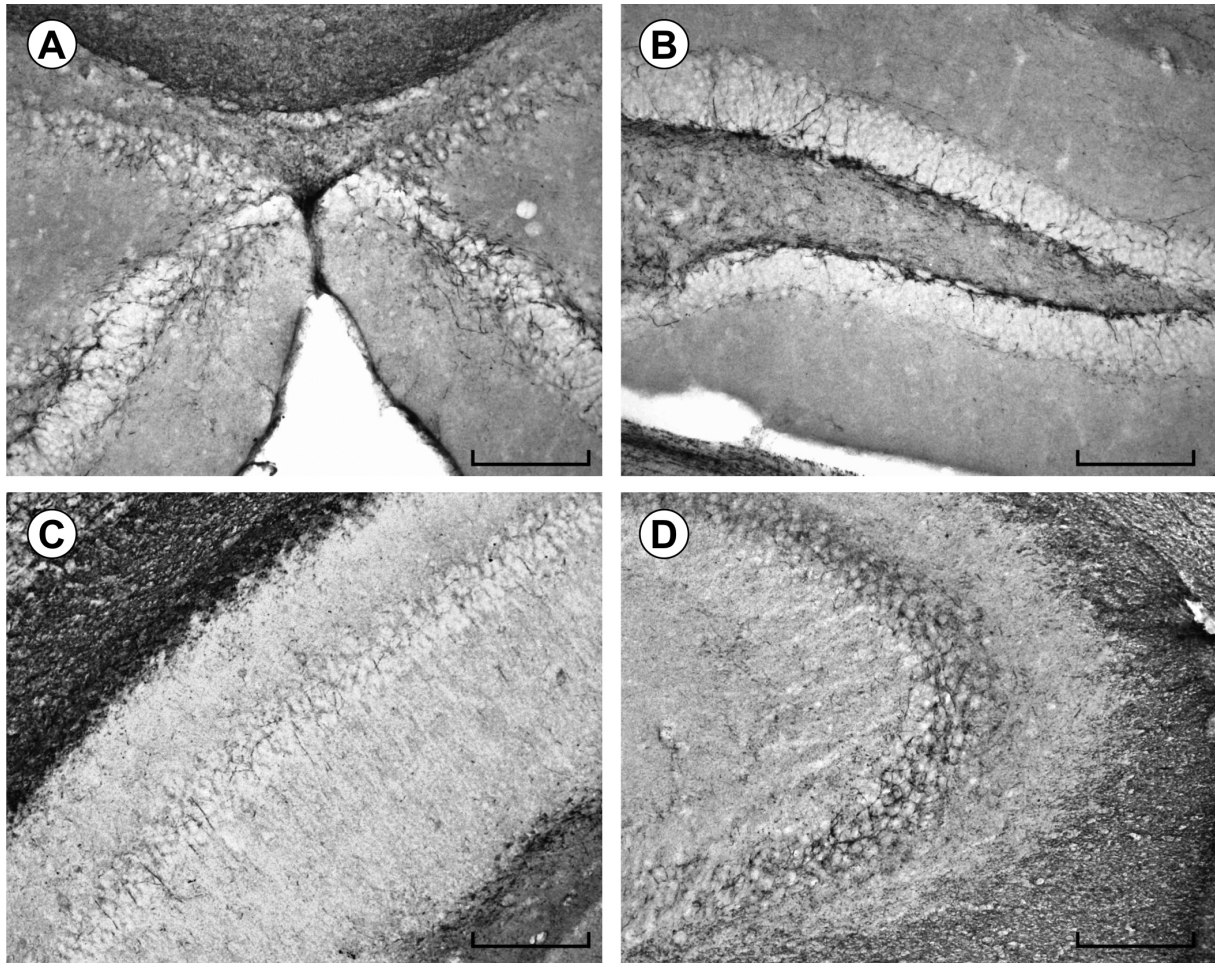
Unter Verwendung des polyklonalen, gegen TTR gerichteten Schaf-Antikörpers der Firma abcam, Cambridge (UK) gelang es, TTR seriell in den unterschiedlichen Subfeldern der Hippokampi aller Tiere mit Nickel-verstärktem Diaminobenzidin zu färben. In der Kontrollgruppe K wurden TTR-positive Zellen im Ammonshorn (CA1, CA2, CA3), im Gyrus

dentatus sowie äußerst schwach im Bereich der dorsalen Kommissur beziehungsweise des dritten Ventrikels beobachtet. Die Abbildung 4.4 zeigt repräsentative Aufnahmen dieser Regionen, wobei der Bereich der dorsalen Kommissur nicht sichtbar ist. Hier konnte der Marker in den Gewebeschnitten einiger Tiere überhaupt nicht visualisiert werden. Wenige immunreaktive Fasern zeigten sich hier im in zum dritten Ventrikel hin auslaufenden Hilusbereich des Gyrus dentatus rechts und links sowie in der umgebenden Molekularschicht sowie der Lamina choroidea des dritten Ventrikels, hier vermutlich Epithelzellen des Plexus choroideus. Weiter waren TTR-positive Fasern in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus sowie im Übergangsbereich zur polymorphen Schicht des Gyrus dentatus zu beobachten (A). Dort bestehen axonale Verbindungen als Moosfasern zu den Pyramidenzellen der Subfelder CA2 und CA3. In diesen Subfeldern ließen sich ebenfalls immunreaktive Fasern und Zellen (vermutlich Pyramidenzellen oder deren Dendriten) in der Pyramidalzellschicht und dem Stratum lucidum sowie im Übergangsbereich vom Stratum radiatum zur Molekularschicht des Gyrus dentatus (C, D) nachweisen. Vereinzelt waren auch TTR-immunreaktive Fasern in der Pyramidenzellschicht der CA1-Region sichtbar (B).

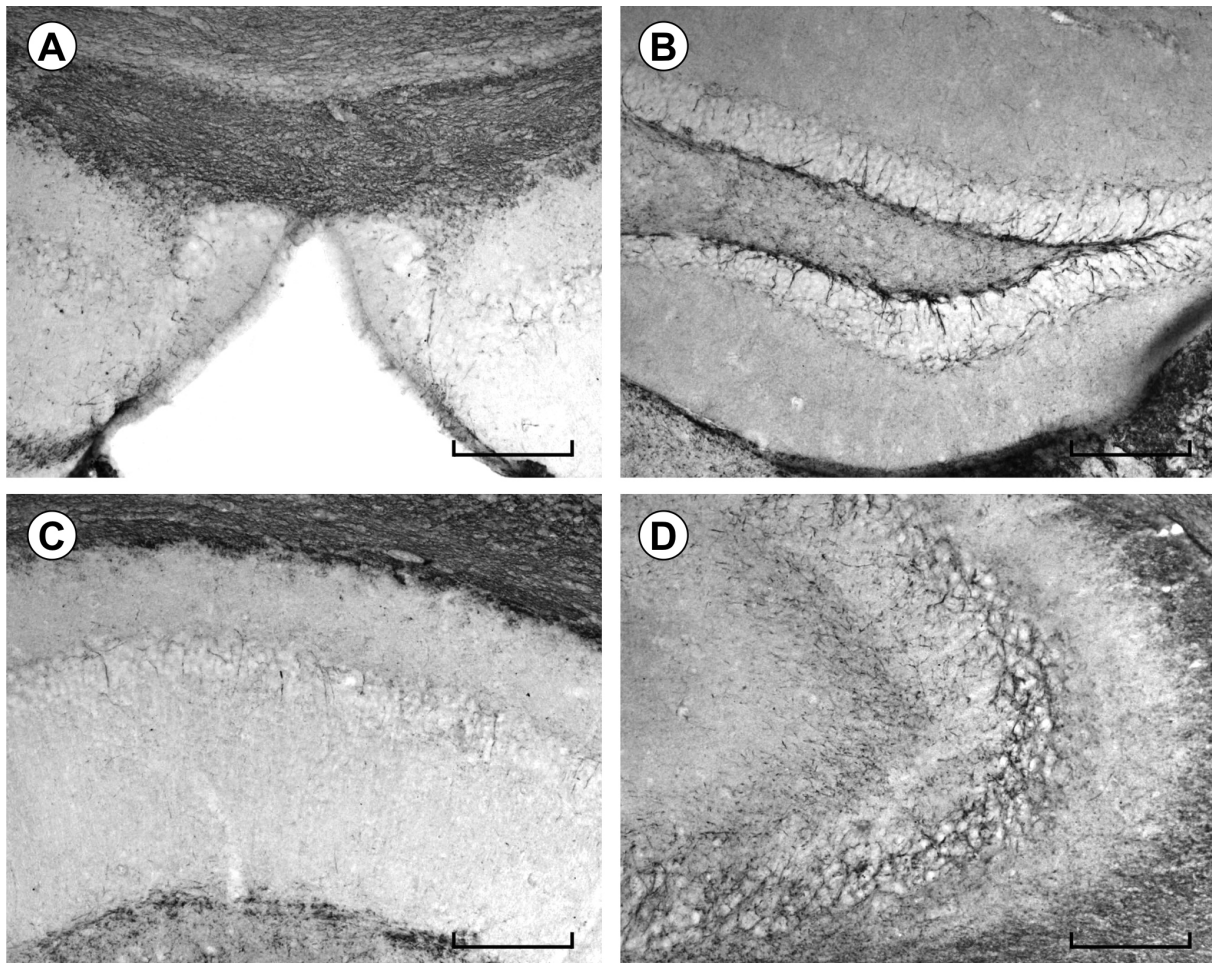


**Abb. 4.4:** Immunperoxidasemarkierung von Transthyretin-positiven Fasern mit einer Streptavidin-Biotin-Technik und Nickel-verstärktem Diaminobenzidin als Chromogen. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen 4 hippocampale Subfelder an Hirnen von Tieren der Gruppe K (Kontrollgruppe): **A** zeigt den rechten Gyrus dentatus eines medial gelegenen Schnittes, und **B** das Subfeld CA1 mit der Pyramidenzellschicht. Die Subfelder CA2/CA3 werden in einem frontaler (**C**) und einem kaudaler (**D**) gelegenen Schnitt abgebildet. Alle Messbalken entsprechen 25 µm.





**Abb. 4.5:** Immunperoxidasemarkierung von Transthyretin-positiven Fasern mit einer Streptavidin-Biotin-Technik und Nickel-verstärktem Diaminobenzidin als Chromogen. Lichtmikroskopische Aufnahmen von 4 hippocampalen Regionen an Hirnen von Tieren der Gruppe G (EGb761-Extrakt). **A** zeigt den Hilusbereich des Gyrus dentatus bzw. des dritten Ventrikels mit Anschnitt des Gyrus dentatus beider Hemisphären, **B** den linken Gyrus dentatus in einem etwas medialer gelegenen Schnitt. In **C** ist das Subfeld CA1 mit der Pyramidalzellschicht abgebildet, in **D** ein rostralere Anteil der Subfelder CA2 und CA3. Die TTR-Immunreaktivität erscheint stärker als in der Gruppe K (Abb. 4.4). Alle Messbalken entsprechen 25 µm.



**Abb. 4.6:** Vergleichende immunhistochemische Darstellung Transthyretin-immunpositiver Fasern mit einer Streptavidin-Biotin-Technik und Nickel-verstärktem Diaminobenzidin als Chromogen. Lichtmikroskopische Aufnahmen ausgewählter Hippokampusareale von Tieren der Gruppe T (Terpenoid-Fraktion; **A** und **C**) bzw. der Gruppe F (Flavonoid-Fraktion; **B** und **D**). **A** zeigt den Bereich der dorsalen Commissur bzw. des dritten Ventrikels mit Anschnitt des Gyrus dentatus beider Hemisphären, **B** den linken Gyrus dentatus. In **C** ist die CA1-Region mit der Pyramidenzellschicht abgebildet, in **D** werden die Subfelder CA2 und CA3 sichtbar. Abgesehen von **B** und **D** (Gruppe F), zeigt sich in **A** und **C** (Gruppe T) eine geringere Intensität des Markers im Vergleich zur Gruppe G (Abb. 4.5). Alle Messbalken entsprechen 25 µm.

#### 4.4.2 TTR-Expression nach *Ginkgo biloba*-Behandlung

Bei der zunächst erfolgten lichtmikroskopischen Analyse der Präparate zeigten sich auf der Grundlage der Intensität und der Regionen-spezifischen Verteilung der TTR-Immunreaktivität qualitative Unterschiede im Expressionsgrad innerhalb der 4 Versuchsgruppen wie den Abbildungen 4.4 bis 4.6 verdeutlicht. Abbildung 4.5 zeigt lichtmikroskopische Bilder von TTR-immunpositiven Zellen im Bereich der Hilusregion des Gyrus dentatus bzw. des 3. Ventrikels (**A**), im Gyrus dentatus (**B**), in der hippocampalen Region CA1 (**C**) sowie in der hippocampalen Region CA2/CA3 (**D**) von Tieren der Gruppe G (Fütterung mit EGb761-Extrakt). Der TTR-Nachweis in diesen 4 Regionen war für alle Versuchsgruppen erfolgreich, doch wurden unterschiedlich intensive Immunsignale deutlich:

Es zeigte sich in den oben erwähnten Subfeldern eine deutlich stärkere Intensität des Signals im Vergleich zur Gruppe K (Kontrollgruppe, Abb. 4.4) jedoch auch im Vergleich zur Gruppe T (Terpenoid-Fraktion, Abb. 4.6, A und C). Eine etwa gleich starke Ausprägung der Immunreaktivität schien sich im Vergleich zur Gruppe F (Flavonoid-Fraktion) zu beobachten (Abb. 4.6 Bild B und D). Beim Vergleich der Färbereihen von Gewebe der 4 verschiedenen Fütterungsgruppen ähnelte die Gruppe F (Flavonoid-Fraktion) hinsichtlich der Immunmarkierung der Gruppe G (EGb761-Extrakt), während die Gruppe K (Kontrollgruppe) kaum von Gruppe T (Terpenoid-Fraktion) unterscheidbar war. Es sollte nun versucht werden, die qualitativen Befunde entsprechend zu quantifizieren.

#### **4.5 Semiquantifizierung der TTR-Immunmarkierung**

Die visuellen Beobachtungen hinsichtlich eines Intensitäts- und Verteilungsunterschiedes des TTR-Immunsignals zwischen den 4 verschiedenen Fütterungsgruppen sollten im Folgenden quantifiziert werden:

- Die visuelle Inspektion und der Vergleich der immunhistochemischen Präparate der 4 untersuchten Experimentalgruppen zeigten Unterschiede in der Stärke der TTR-Immunreaktivität innerhalb der hippokampalen Formation, weshalb eine densitometrische Auswertung der Intensität dieser Immunreaktivität vorgenommen wurde (siehe auch Methodenteil Pkt. 3.7).
- Da eine Kalibrierung des Immunsignals nicht möglich war, wurden Veränderungen der Immunsignalstärke stets auf die entsprechende Signalintensität der Kontrollgruppe bezogen. Voraussetzung für diese semiquantitative Auswertung war, dass alle Immunmarkierungen unter identischen Bedingungen erfolgt waren, d.h., Hirnschnitte aus allen 4 Experimentalgruppen wurden stets mit den gleichen Antikörperlösungen behandelt sowie gleicher Inkubations- und Entwicklungszeit unterzogen.
- Um regionale Unterschiede in den Subfeldern der hippokampalen Formation zu erfassen, erfolgte die densitometrische Auswertung in der CA1, CA2/3, Gyrus dentatus und Hilusregion in drei ausgewählten Schnittebenen des Hippokampus: rostral, medial und kaudal.

- Um rostral-kaudale Unterschiede innerhalb des Hippokampus zu ermitteln, wurden die gemessenen Intensitäten der Immunreaktivität für die Schnittebenen als rostraler, medialer beziehungsweise kaudaler Hippokampus zusammengefasst.
- Linke und rechte Hirnhälften wurden separat densitometrisch ausgewertet, um eventuelle Unterschiede zwischen beiden Hemisphären zu erfassen.

Um Intensitätsunterschiede innerhalb der untersuchten Subregionen CA1, CA2/CA3, Gyrus dentatus sowie dorsale Kommissur/dritter Ventrikel semiquantitativ zu bestimmen, wurden in Parallelmessungen die Subregionen weiter in bis zu 25 Untergruppen aufgeteilt und die densitometrisch erfassten Intensitäten aller Untergruppen gemittelt und mit der Intensität verglichen, die bei der Densitometrie der Subregion als Gesamtheit erhalten wurde. Die mit beiden Verfahren erhaltenen Signalintensitäten der einzelnen Subregionen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der immunhistochemischen Präparate mit TTR-Immunmarkierung in den Hippokampi der Hirne der 4 untersuchten Experimentalgruppen sind in den Abbildungen 4.8., 4.10 und 4.12 für die verschiedenen Schnittebenen (rostral, medial, kaudal) zusammengefasst.

#### Rostrale Schnittebene:

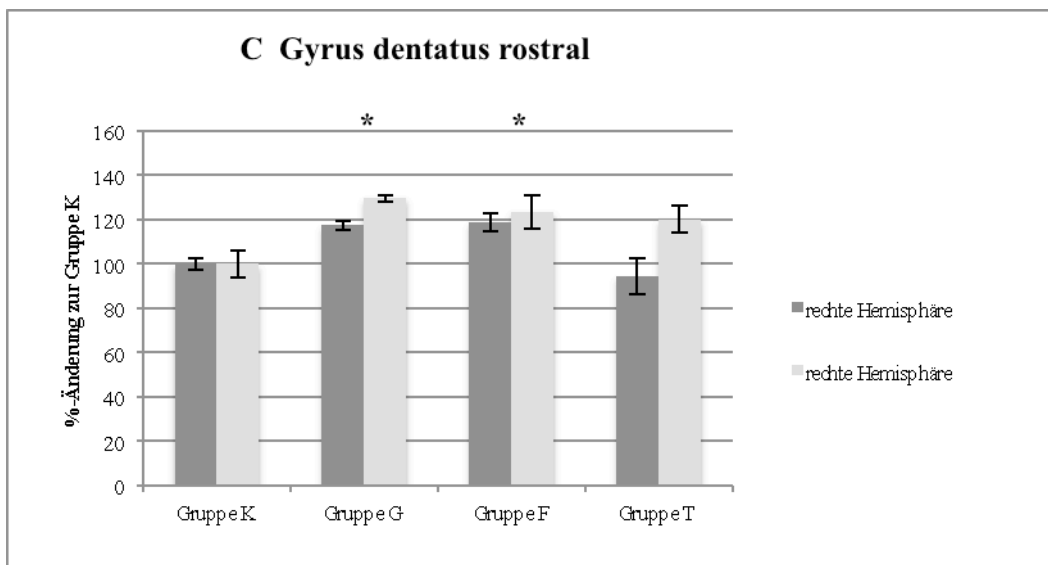
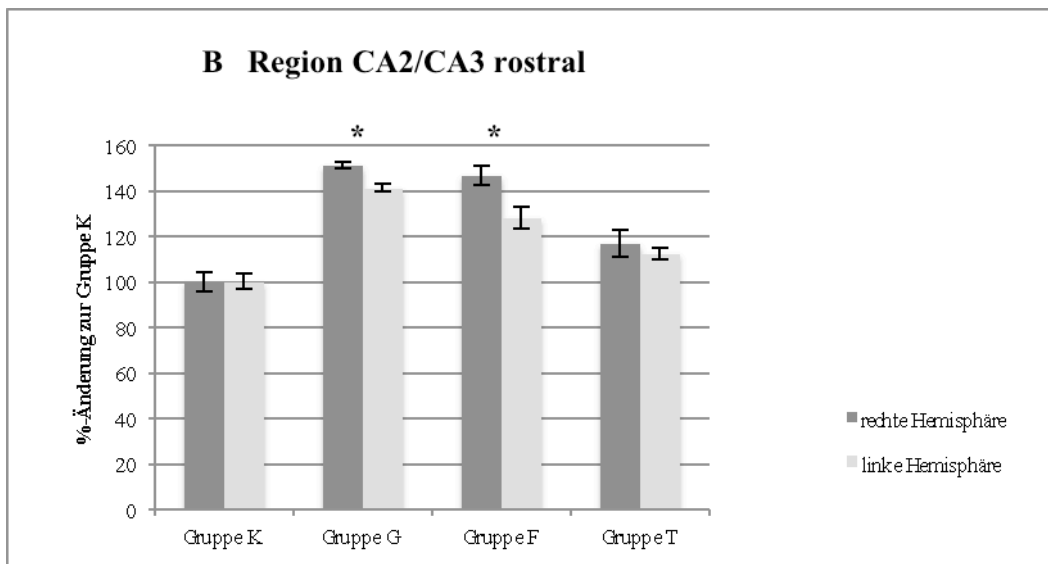
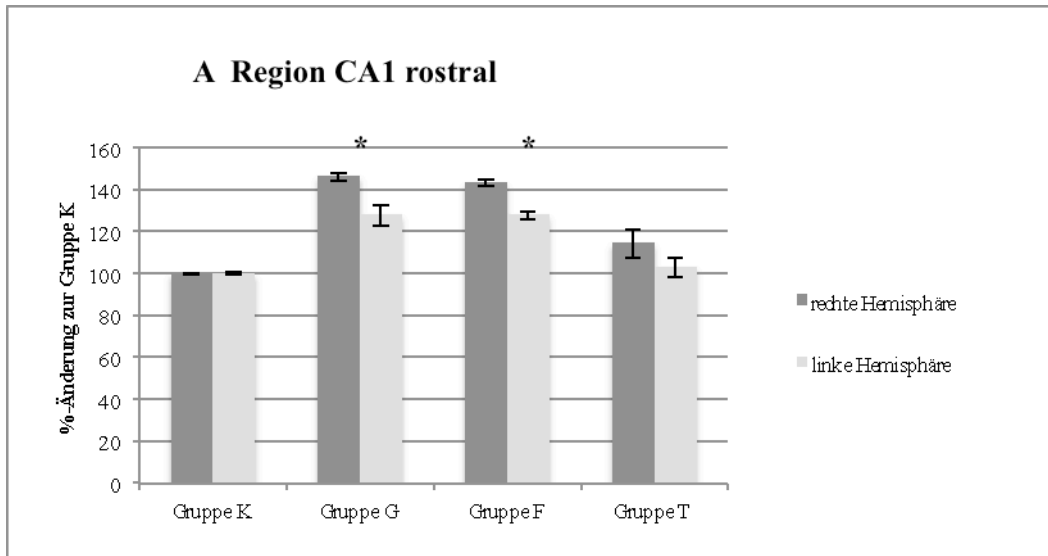
Die densitometrische Auswertung der TTR-Immunreaktivität, die in den CA1-Subfeldern der 4 untersuchten Experimentalgruppen im rostralen Anteil der hippokampalen Formation beobachtet wurde, ergab eine um 40% ( $P < 0.05$ ) höhere Intensität der Immunreaktivität in der Gruppe G (Ginkgo) im Vergleich zur Kontrolle. Auch die mit der Flavonoid-Fraktion gefütterten Tiere (Gruppe F) zeigten eine gegenüber der Kontrolle um 40% ( $P < 0.05$ ) erhöhte Immunreaktivität. Im Gegensatz dazu beeinflusste die Verfütterung der Terpenoid-Fraktion (Gruppe T) die TTR-Expression in der CA1-Region - verglichen mit der Kontrolle - kaum (Abb. 4.7).

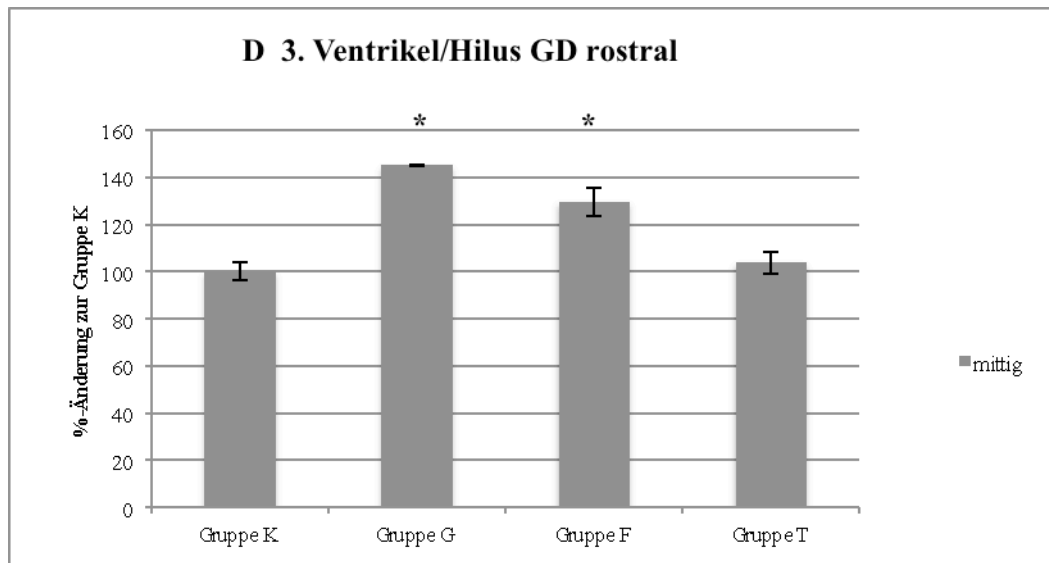
Für die gesondert betrachteten Subfelder CA2/CA3 der hippokampalen Formation zeigte sich eine um 50% ( $P < 0.05$ ) signifikant höhere Immunreaktivität in der Gruppe G gegenüber der Kontrolle. Weniger deutlich, aber ebenfalls signifikant ( $P < 0.05$ ) und um 45% erhöht, verhielt es sich mit der Immunreaktivität in der Gruppe F zur Kontrolle. Zwischen der Gruppe T und der Kontrolle zeigten sich auch Unterschiede mit höherer Intensität des Immunsignals innerhalb der Gruppe T, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 4.7).

Auch die bei der densitometrischen Auswertung der Immunreaktivität im Gyrus dentatus der 4 Fütterungsgruppen im rostralen Anteil der hippokampalen Formation beobachtete Intensität der Immunreaktivität, war mit 20% signifikant ( $P < 0.05$ ) höher in der Gruppe G im Vergleich zur Kontrolle. Darüber hinaus zeigten die mit der Flavonoid-Fraktion gefütterten Tiere eine um 20% ( $P < 0.05$ ) erhöhte Immunreaktivität. Auch hier beeinflusste die Terpenoid-Fraktion Fütterung die TTR-Expression im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant (Abb. 4.7).

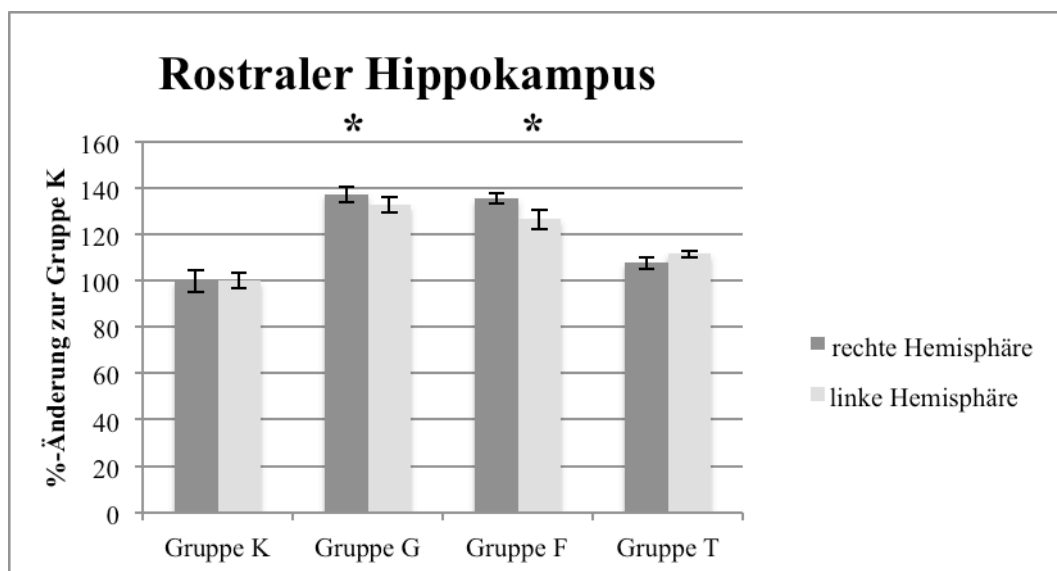
Im Hilusbereich des Gyrus dentatus sowie in der den dritten Ventrikel umgebenden Region, zeigte sich eine um 40% ( $P < 0.05$ ) höhere Intensität der gemessenen Immunreaktivität in der Gruppe G im Vergleich zur Kontrollgruppe (K). Gruppe F zeigte eine gegenüber der Kontrollgruppe um 30% höhere Färbeintensität ( $P < 0.05$ ). Statistisch signifikante Unterschiede der Färbeintensität zwischen der Gruppe T und der Kontrollgruppe konnten nicht nachgewiesen werden. Graphisch dargestellte Unterschiede zwischen rechter und linker Hirnhälfte waren für alle Gruppen und sämtliche Subfelder statistisch nicht signifikant (Abb. 4.7).

Die Unterschiede der TTR-Expression zwischen den untersuchten Experimentalgruppen - mit signifikant erhöhten Intensitäten der Immunreaktivitäten in Gruppe G (um 35 %,  $P < 0.05$ ) und F (um 30 %,  $P < 0.05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe K - lassen sich auch im rostralen Anteil des Hippokampus erkennen, wenn man die Intensitäten über alle hippokampalen Subregionen mittelt (Abb. 4.8). Auch hier zeigte sich, dass die Diät mit der Terpenoid-Fraktion des EGb761 die TTR-Immunreaktivität im Hippokampus nicht signifikant beeinflusst.





**Abb. 4.7: A-D:** Densitometrische Auswertung der TTR-Immunreaktivität im rostralen Anteil der hippocampalen Formation von adulten Mäusen, die über 4 Wochen Beimischungen zum Futter von entweder EGb761 (*Ginkgo biloba*-Extrakt, Gruppe G), Flavonoid-Fraktion des EGb761, Gruppe F), Terpenoid-Fraktion des EGb761, Gruppe T) oder eine normale Diät (Kontrollgruppe K) erhalten hatten. Dargestellt sind die auf die Kontrolle (= 100%) bezogenen Änderungen der Intensitäten (optische Dichte) der TTR-Immunreaktivität in den Subfeldern CA1, CA2/CA3, im Gyrus dentatus und im Hilus des rostralen Anteils der hippocampalen Formation und repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 Tieren je Gruppe. Linke und rechte Hirnhemisphären wurden separat ausgewertet und dargestellt. Die Immunmarkierung zur Detektion der TTR-Expression erfolgte an Perfusionsfixierten koronalen Hirnschnitten, die den rostralen Anteil der hippocampalen Formation umfassten, wie im Methodenteil näher beschrieben. \* $P < 0,05$  versus Kontrolle, ANOVA und Student' t-Test.



**Abb. 4.8:** Densitometrische Auswertung der TTR-Immunreaktivität im rostralen Anteil der hippocampalen Formation von adulten Mäusen, die über 4 Wochen Beimischungen zum Futter von entweder EGb761 (*Ginkgo biloba*-Extrakt, Gruppe G), Flavonoid-Fraktion des EGb761, Gruppe F), Terpenoid-Fraktion des EGb761, Gruppe T) oder eine normale Diät (Kontrollgruppe K) erhalten hatten. Dargestellt sind die auf die Kontrolle (= 100%) bezogenen Änderungen der optischen Dichte der TTR-Immunreaktivität im rostralen Anteil der hippocampalen Formation und repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 Tieren je Gruppe. Die Immunmarkierung zur Darstellung der TTR-Expression erfolgte an Perfusionsfixierten koronalen Hirnschnitten, die den rostralen Anteil der hippocampalen Formation umfassten, wie im Methodenteil näher beschrieben. \* $P < 0,05$  versus Kontrolle, ANOVA und Student' t-Test.

Mediale Schnittebene:

Veränderungen der TTR-Expression aufgrund unterschiedlicher Diäten wurden auch im medialen Anteil der hippokampalen Formation des Hippokampus beobachtet. Analog zum rostralen Hippokampus ließen sich ähnliche Änderungen der Intensitäten der Immunreaktivität in den untersuchten Gruppen beobachten (Abb. 4.9).

Auch die densitometrische Auswertung der TTR-Immunreaktivität, die in der CA1-Region der 4 Fütterungsgruppen im medialen Anteil der hippokampalen Formation beobachtet wurde, ergab eine um 32% ( $P < 0.05$ ) höhere Intensität der Immunmarkierung in der Gruppe G im Vergleich zur Gruppe K. Auch die Tiere der Gruppe F zeigten eine um 25% ( $P < 0.05$ ) zur Kontrollgruppe erhöhte Immunreaktivität. Wieder schien die Verfütterung der Terpenoid-Fraktion die TTR-Expression in der CA1-Region verglichen mit der Kontrolle nicht signifikant zu beeinflussen (Abb. 4.9).

Innerhalb der CA2/CA3-Subfelder sowie im medialen Bereich der hippokampalen Formation zeigte sich eine in der Gruppe G um 30% ( $P < 0.05$ ) und signifikant höhere optische Dichte als in der Kontrollgruppe K. Anders als in den zuvor untersuchten Subfeldern war die Intensität der TTR-Immunreaktivität in der Gruppe F im Vergleich zur Kontrolle zwar um 15% erhöht, jedoch statistisch nicht signifikant. Die gemessene Intensität der Immunreaktivität des TTR zeigte sich in der Gruppe T im Vergleich zur Kontrollgruppe hier sogar erniedrigt (Abb. 4.9).

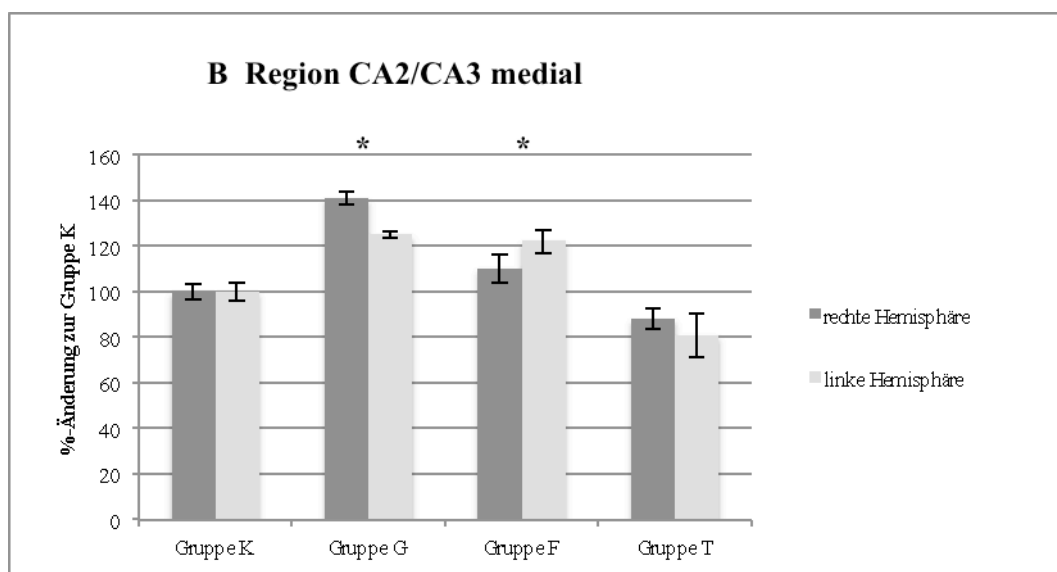
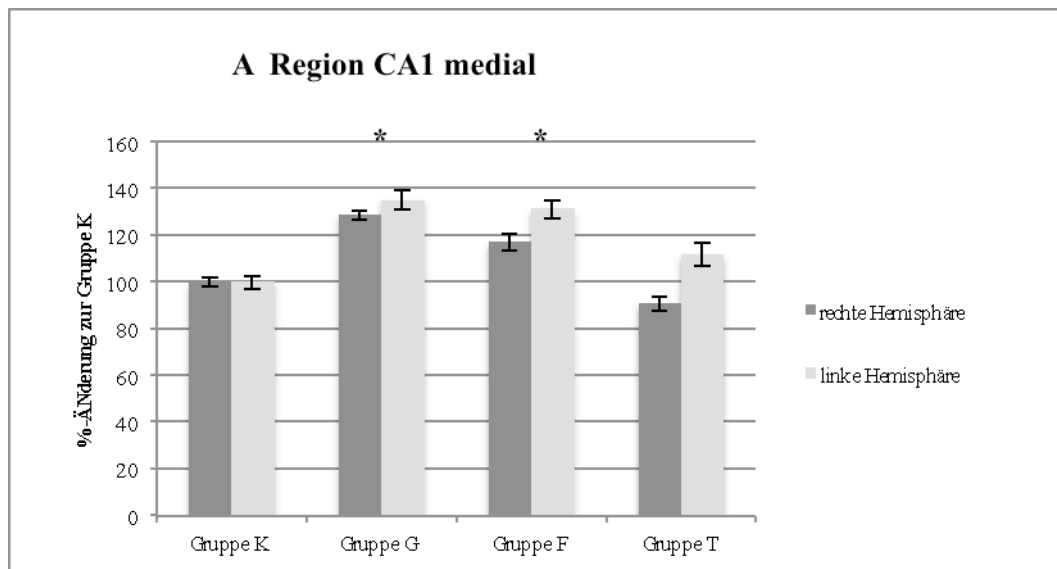
Im Gyrus dentatus stellten sich die Unterschiede in ähnlicher Weise dar. Der Vergleich der Gruppe G mit der Kontrollgruppe zeigte eine um 25% ( $P < 0.05$ ) signifikant höhere Intensität der Immunreaktivität zu Gunsten der Gruppe G. Anders als innerhalb der Subfelder CA2/CA3 wies Gruppe F eine um 15% ( $P < 0.05$ ) und signifikant höhere Intensität der TTR-Immunreaktivität im Vergleich zur Gruppe K (Abb. 4.9).

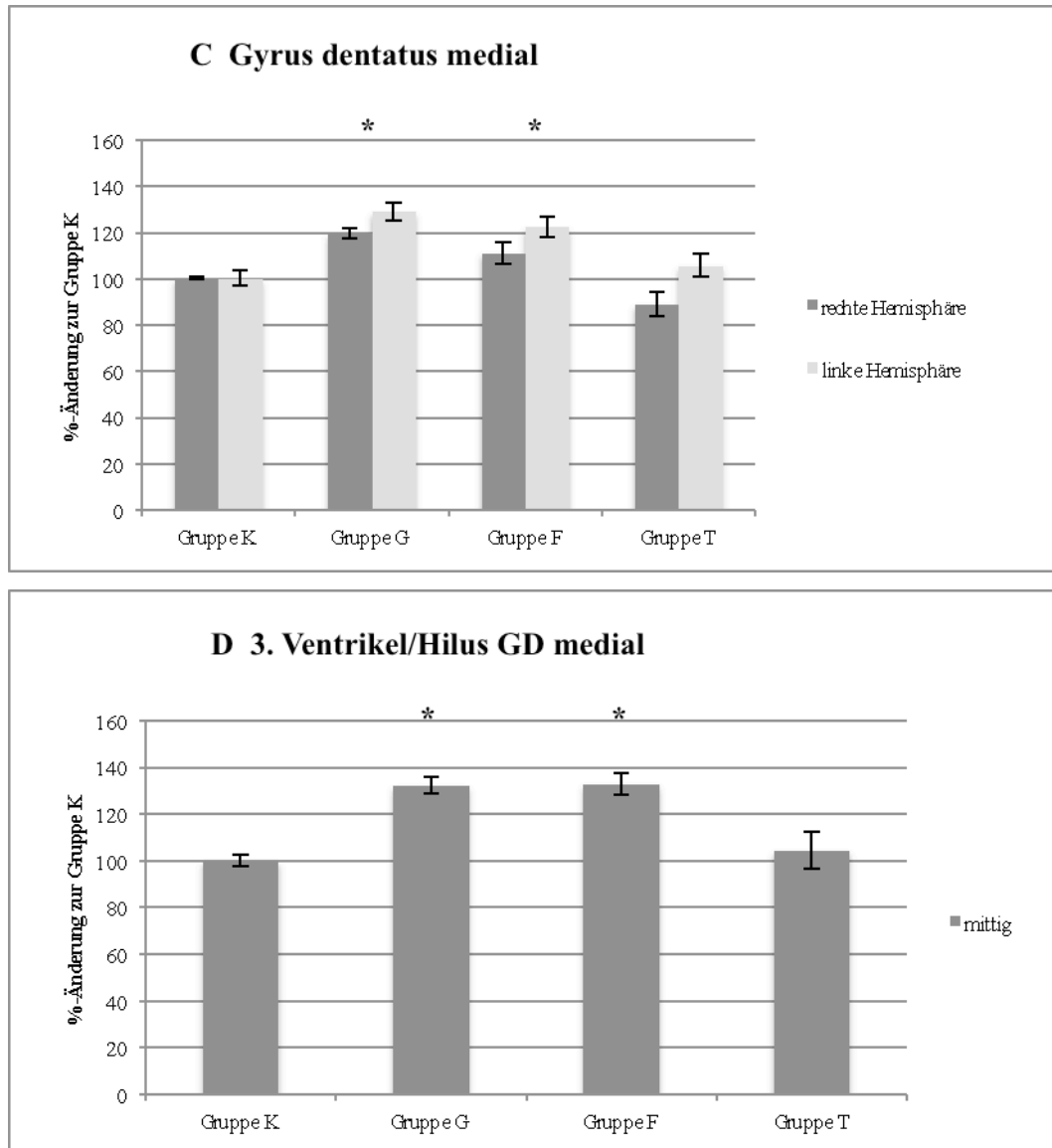
Innerhalb der Region um den dritten Ventrikel beziehungsweise des Hilusbereiches des Gyrus dentatus zeigten sich signifikante Unterschiede der Intensität der TTR-Immunreaktivität sowohl zwischen der Gruppe G und der Kontrollgruppe, als auch zwischen der Gruppe F und der Kontrollgruppe, jeweils eine um 30% ( $P < 0.05$ ) höhere Intensität im Vergleich zur Gruppe K. Der Unterschied der Intensität zwischen der Gruppe T und der Kontrolle war auch hier statistisch nicht signifikant (Abb. 4.9).

Die Unterschiede der TTR-Expression innerhalb der untersuchten Fütterungsgruppen mit signifikant erhöhter Intensität der Immunreaktivität in Gruppe G (um 30%,  $P < 0.05$ ) und F (um 20%,  $P < 0.05$ ) im Vergleich zur Kontrolle ließen sich auch hier im medialen Anteil der

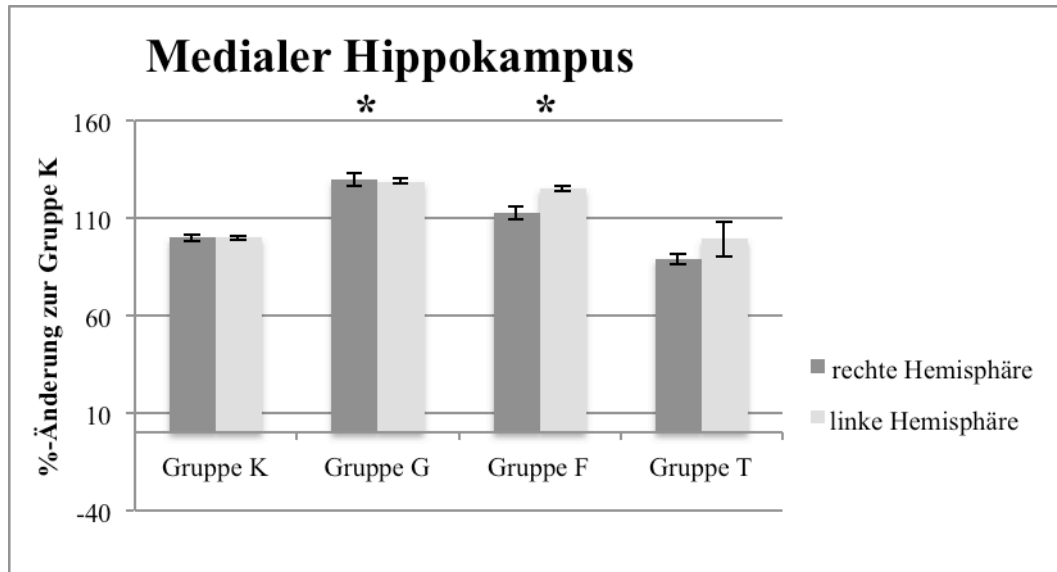


hippokampalen Formation erkennen, wenn man die Intensitäten über alle Subfelder mittelte (Abb. 4.10). Ebenfalls zeigte sich, dass die Fütterung der Terpenoid-Fraktion des EGb761 die TTR-Immunreaktivität im medialen Hippokampus nicht signifikant beeinflusst.





**Abb. 4.9: A-D:** Densitometrische Auswertung der TTR-Immunreaktivität im medialen Anteil der hippocampalen Formation von adulten Mäusen, die über 4 Wochen Beimischungen zum Futter von entweder EGb761 (*Ginkgo biloba*-Extrakt, Gruppe G), Flavonoid-Fraktion des EGb761, Gruppe F), Terpenoid-Fraktion des EGb761, Gruppe T) oder eine normale Diät (Kontrollgruppe K) erhalten hatten. Dargestellt sind die auf die Kontrolle (= 100%) bezogenen Änderungen der Intensitäten (optische Dichte) der TTR-Immunreaktivität in den Subfeldern CA1, CA2/CA3, im Gyrus dentatus (GD) und im Hilus des medialen Anteils der hippocampalen Formation und repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 Tieren je Experimentalgruppe. Linke und rechte Hirnhemisphären wurden separat ausgewertet und dargestellt. Die Immunmarkierung zur Detektion der TTR-Expression erfolgte an Perfusions-fixierten koronalen Hirnschnitten, die den medialen Anteil der hippocampalen Formation umfassten, wie im Methodenteil näher beschrieben. \* $P < 0,05$  versus Kontrolle, ANOVA und Student' t-Test.



**Abb. 4.10:** Densitometrische Auswertung der TTR-Immunreaktivität im medialen Anteil der hippocampalen Formation von adulten Mäusen, die über 4 Wochen Beimischungen zum Futter von entweder EGb761 (*Ginkgo biloba*-Extrakt, Gruppe G), Flavonoid-Fraktion des EGb761, Gruppe F), Terpenoid-Fraktion des EGb761, Gruppe T) oder eine normale Diät (Kontrollgruppe K) erhalten hatten. Dargestellt sind die auf die Kontrolle (= 100%) bezogenen Änderungen der Intensitäten (optische Dichte) der TTR-Immunreaktivität im medialen Anteil der hippocampalen Formation und repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 Tieren je Experimental-Gruppe. Die Immunmarkierung zur Darstellung der TTR-Expression erfolgte an Perfusions-fixierten koronalen Hirnschnitten, die den medialen Anteil der hippocampalen Formation umfassten, wie im Methodenteil näher beschrieben. \* $P < 0,05$  versus Kontrolle, ANOVA und Student' t-Test.

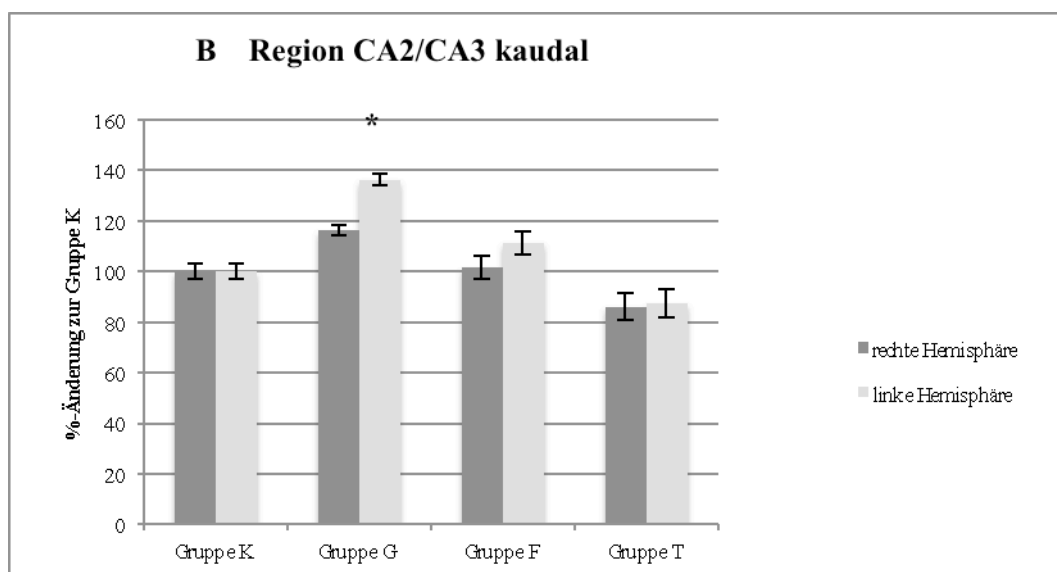
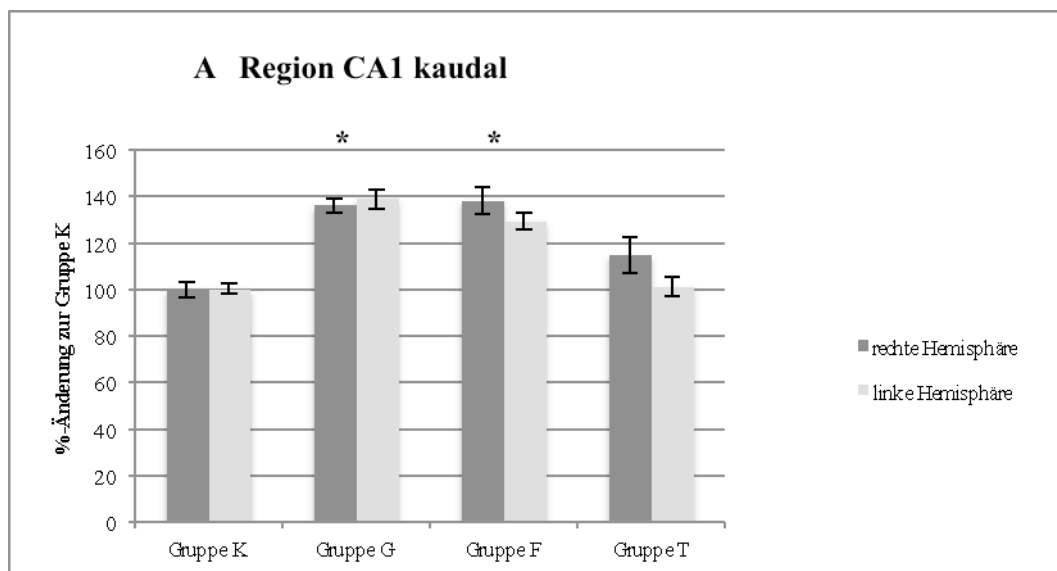
#### Kaudale Schnittbene:

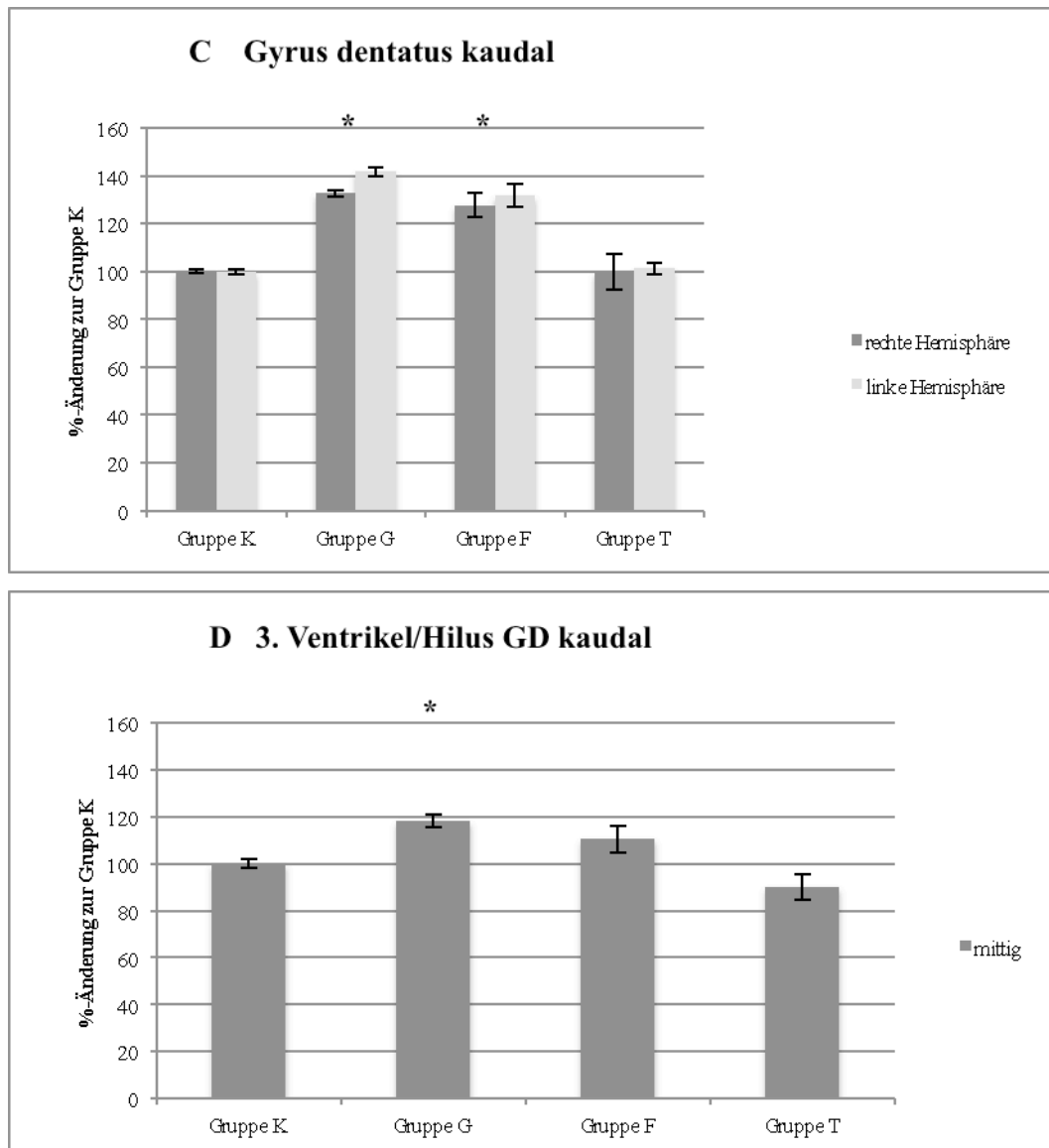
Auch im kaudalen Anteil des Hippokampus wurden die Gruppenvergleiche innerhalb der 4 ausgewählten Subregionen angestellt und die erhaltenen Werte im Anschluss gemittelt, um eine Aussage über den gesamten kaudalen Anteil treffen zu können. Der höchste Intensitätsanstieg der TTR-Immunreaktivität in Gruppe G (um 22%,  $P < 0.05$ , im Vergleich zur Kontrolle), ließ sich auch im kaudalen Anteil des Hippokampus bestätigen. Ähnliches galt hinsichtlich der für Gruppe F (wiederum gegenüber der Kontrollgruppe) gemessenen Intensität, mit einem Anstieg um 15% ( $P < 0.05$ ). Wie bereits im medialen Hippokampus beobachtet, zeigten sich auch hier Intensitätsunterschiede der Immunreaktivität zwischen der Gruppe T und der Kontrollgruppe, jedoch auch hier mit einer höheren Intensität der Immunreaktivität in der Kontrollgruppe (Abb. 4.12). In den untersuchten Subfeldern spiegelte sich dies entsprechend wider (Abb. 4.11).

Innerhalb des Subfeldes CA1 zeigten sich – wie innerhalb des Gyrus dentatus - signifikante Unterschiede zwischen Gruppe G und der Kontrollgruppe (um 40% höher,  $P < 0.05$ ) sowie zwischen Gruppe F und der Kontrollgruppe (um 35% höher,  $P < 0.05$ ), während Unterschiede zwischen der Gruppe T und der Kontrollgruppe nicht signifikant waren (Abb. 4.11).

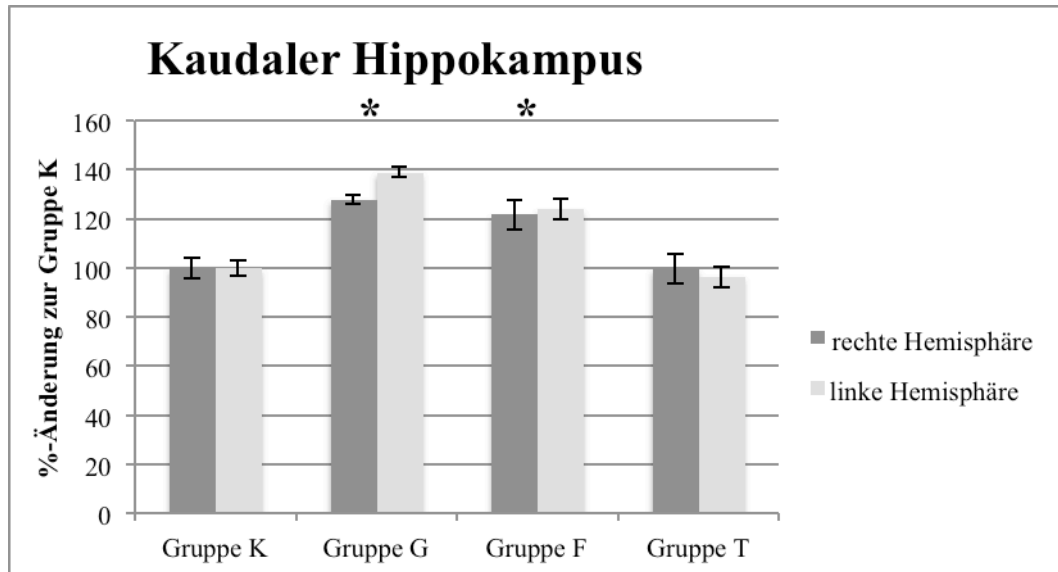
In den Subfeldern CA2/CA3 ergab sich ebenfalls ein statistisch signifikanter Intensitätsunterschied zwischen der Gruppe G und der Kontrollgruppe (um 30%,  $P < 0.05$ ) wie bereits in den rostralen und medialen Anteilen, bzw. Subfeldern beobachtet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe F und der Kontrollgruppe zeigten sich im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen medialen und rostralen Anteilen für dieses Subfeld nicht. Die Unterschiede der Gruppe T im Vergleich zur Kontrollgruppe waren auch hier nicht signifikant (Abb. 4.11).

Innerhalb der Region um den dritten Ventrikel beziehungsweise innerhalb des Hilusbereiches des Gyrus dentatus zeigten sich signifikante Unterschiede der TTR-Immunreaktivität ebenfalls nur für die Gruppe G. Hier war die Intensität der Transthyretin-Immunreaktivität um 20% ( $P < 0.05$ ) im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abb. 4.11).





**Abb. 4.11: A-D:** Densitometrische Auswertung der TTR-Immunreaktivität im kaudalen Anteil der hippocampalen Formation von adulten Mäusen, die über 4 Wochen Beimischungen zum Futter von entweder EGb761 (*Ginkgo biloba*-Extrakt, Gruppe G), Flavonoid-Fraktion des EGb761, Gruppe F), Terpenoid-Fraktion des EGb761, Gruppe T) oder eine normale Diät (Kontrollgruppe K) erhalten hatten. Dargestellt sind die auf die Kontrolle (= 100%) bezogenen Änderungen der Intensitäten (optische Dichte) der TTR-Immunreaktivität in den Subfeldern CA1, CA2/CA3, im Gyrus dentatus und im Hilus des kaudalen Anteils der hippocampalen Formation und repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 Tieren je Experimentalgruppe. Linke und rechte Hirnhemisphären wurden separat ausgewertet und dargestellt. Die Immunmarkierung zur Detektion der TTR-Expression erfolgte an Perfusions-fixierten koronalen Hirnschnitten, die den kaudalen Anteil der hippocampalen Formation umfassten, wie im Methodenteil näher beschrieben. \* $P < 0,05$  versus Kontrolle, ANOVA und Student' t-Test.



**Abb. 4.12:** Densitometrische Auswertung der TTR-Immunreaktivität im kaudalen Anteil der hippocampalen Formation von adulten Mäusen, die über 4 Wochen Beimischungen zum Futter von entweder EGb761 (*Ginkgo biloba*-Extrakt, Gruppe G), Flavonoid-Fraktion des EGb761, Gruppe F), Terpenoid-Fraktion des EGb761, Gruppe T) oder eine normale Diät (Kontrollgruppe K) erhalten hatten. Dargestellt sind die auf die Kontrolle (= 100%) bezogenen Änderungen der Intensitäten (optische Dichte) der TTR-Immunreaktivität im kaudalen Anteil der hippocampalen Formation und repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 Tieren je Experimental-Gruppe. Die Immunmarkierung zur Darstellung der TTR-Expression erfolgte an Perfusions-fixierten koronalen Hirnschnitten, die den kaudalen Anteil der hippocampalen Formation umfassten, wie im Methodenteil näher beschrieben. \* $P < 0,05$  versus Kontrolle, ANOVA und Student' t-Test.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob ein standardisierter Extrakt aus Blättern der *Ginkgo biloba*-Pflanze (EGb761) und/oder deren isolierte Flavonoid- und Terpenoid-Komponenten die Expression der Proteine Tau, GH, Prolaktin und TTR, die auch bei der Pathogenese der AD eine Rolle spielen, beeinflussen. Zu diesem Zweck erhielten adulte Mäuse des Stammes C57B16 über eine Zeitspanne von 4 Wochen definierte Beimengungen von entweder EGb761, der Flavonoid-Fraktion oder der Terpenoid-Fraktion zum täglichen Futter. An ausgewählten Hirnschnitten wurde die Expression der oben genannten 4 Proteine mittels Immunhistochemie erfasst. Immunmarkierungen in ausgewählten Hirnarealen wurden dann mit Hilfe von Computer-gestützter Densitometrie ausgewertet. Während die Expression von Tau, Prolaktin und GH kaum durch die vierwöchige EGb761-Verfütterung beeinflusst war, zeigte die densitometrische Auswertung der Präparate mit TTR-Immunmarkierung eine signifikante Erhöhung der TTR-Expression. Dieser Befund wurde erhoben für verschiedene Regionen der hippocampalen Formation wie Ammonshorn (CA1-3), Gyrus dentatus sowie den Bereich der dorsalen Kommissur beziehungsweise des umgebenden dritten Ventrikels mit Anschnitten der Hilusregion des Gyrus dentatus beider Hemisphären - im Vergleich zu Daten, die an Kontrollschnitten von Mäusen mit Normaldiät erhoben wurden. Die EGb761-vermittelte Erhöhung der TTR-Expression ist wahrscheinlich auf die Wirkung der Flavonoid-artigen Bestandteile des EGb761 zurückzuführen, weil die zeitgleiche Verfütterung der Terpenoid-Fraktion die TTR-Expression nicht beeinflusste.

### 5.1 Methodische Betrachtungen

#### 5.1.1 Verwendetes Hirnmaterial

Da nach Durchführung der tierexperimentellen Versuche auch Hirnentnahme und -fixierung durch die Mitarbeiter der Agrar- und Ernährungswissenschaften Fakultät der Christian-Albrechts-Universität in Kiel durchgeführt wurden, konnte auf Art und Qualität der Perfusion der verwendeten Hirne kein Einfluss mehr genommen werden. Unterschiede in der Hirnperfusion mit der Folge einer unterschiedlichen Darstellungsqualität von Epitopen können grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden. Trotz dieser Einschränkung konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass chronische EGb761-Gabe die Intensität der TTR-Expression im Hippokampus beeinflusst. Die jeweiligen Dosen des EGb761, sowie dessen

Hauptbestandteile als Flavonoid-Fraktion und Terpenoid-Fraktion, welche die Experimentalgruppen als Diät erhielten sind mit denen der von Menschen üblicherweise eingenommenen Mengen vergleichbar. Aktuell wird Menschen bei Einnahme des EGb761 eine Dosis von 240 mg pro Tag empfohlen (Rainer et al. 2013; IQWiG 2008). Als Tierdiät verabreicht wurden – in Analogie – standardisierter *Ginkgo biloba*-Extrakt EGb761 (300 mg/kg Diät) sowie dessen Flavonoid-(300 mg/kg Diät) und Terpenoid-Fraktion (100 mg/kg Diät). Die Absorption der Fütterungsbestandteile konnte durch Ermittlung der Plasmakonzentrationen in den Versuchstieren bestätigt werden (Augustin et al. 2009). Entsprechend den vorhandenen Daten für den Menschen (Fourtillan et al. 1995) sowie für Versuchstiere (Biber 2003; Biber und Koch 1999) zeigte sich auch hier eine erhöhte Plasmakonzentration für die Flavonoid-Fraktion und die Terpenoid-Fraktion. Weiterhin unklar ist, ob und in welchem Ausmaß EGb761 oder dessen Bestandteilen eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke möglich ist. Ein Hauptbestandteil von EGb761, das Quercetin, konnte nach entsprechender Fütterung in Hirngewebe von Ratten nachgewiesen werden (de Boer et al. 2005). Somit sollte es zur Absorption oder Verteilung von Komponenten des EGb761 im Hirn kommen. Zusammenfassend sind die beobachteten Effekte auf die Proteinexpression wahrscheinlich auf die Wirkung von EGb761 zurückzuführen, da die in dieser Arbeit verwendeten Dosen mit den üblichen Einnahmen durch Menschen vergleichbar sind und EGb761 auch das Hirnparenchym erreicht.

### 5.1.2 Immunhistochemische Methoden

Die Darstellung relevanter Markerproteine erfolgte durch immunhistochemische Verfahren. Diese Methoden beruhen auf der spezifischen Bindung von Antikörpern an die darzustellenden Epitope und deren nachfolgende Visualisierung. Alle Hirnschnitte von Paraformaldehyd-fixierten Gehirnen wurden dazu gleichermaßen präpariert und aufbereitet. Dies hat den Vorteil, dass die Gewebestruktur sehr gut erhalten bleibt und bei der Auswertung eine maximale regionale Auflösung erreicht wird. Der zu erwähnende Nachteil von Aldehydfixierungen liegt in der Maskierung bestimmter Epitope. Für die Darstellung der zu untersuchenden Marker wurden in Vorversuchen optimale Antikörperkonzentrationen ermittelt. Die Auswertung der immunmarkierten Hirnschnitte erfolgte sowohl an einem klassischen Lichtmikroskop als auch an einem Laserscanning-Mikroskop, das auf sehr kleine Schnittebenen fokussieren kann.



Western Blotting-Verfahren konnten in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden, da das Hirnmaterial extern aufbereitet worden war, fixiert vorlag und somit solchen biochemischen Analysen nicht mehr zugänglich war. Western Blotting zeichnet sich durch hohe Spezifität aus, da sich durch Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe unspezifische Reaktionen der Antikörper leicht aufdecken lassen. Außerdem erlaubt diese Methode eine Quantifizierung des Signals, so dass Reaktionen der Zelle auf unterschiedliche Bedingungen nicht nur optisch sondern auch rechnerisch erfasst werden können. Ein Nachteil des Western Blotting ist jedoch sicherlich, dass dieses Verfahren kaum Hinweise zur genaueren Lokalisierung der untersuchten Proteine gibt. Auch ist der Nachweis von Proteinen oder Proteinfragmenten, die kleiner als 5-10 kD sind, schwierig, da diese im Polyacrylamidgel nicht mehr arretiert werden können. Dennoch sollen die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse in zukünftigen Arbeiten durch Western Blotting-Verfahren verifiziert werden.

### **5.1.3 Semiquantitative Auswertung und Densitometrie**

Eine densitometrische Auswertung, die mittels geeigneter Farbstoffe visualisierte Immunreaktivität von immunhistochemischen Präparaten untersucht, birgt eine Reihe von technischen Problemen, die bei der Bewertung der erhaltenen Aussagen berücksichtigt werden müssen:

1. Eine Kalibrierung der Immunreaktivität ist wegen des Fehlens geeigneter Eichstandards nicht möglich.
2. Die erforderliche Linearität von Proteinmenge und Signal der Immunreaktivität kann technisch kaum realisiert werden, darf aber für kleine Änderungen der Expression des zu untersuchenden Proteins angenommen werden. Daher auch die Bezeichnung der erhaltenen Daten als „semiquantitativ“.
3. Um dennoch vergleichende, semiquantitative Aussagen zu erhalten, werden die densitometrischen Daten stets auf entsprechende Daten zu Kontrollschnitten bezogen, d.h. als prozentuale Veränderungen ermittelt. Dies impliziert aber, dass bei der densitometrischen Analyse besonders darauf geachtet werden muss, dass alle Handlungen an Experimental- und Kontrollschnitten (sowohl IHC als auch Densitometrie) unter nahezu identischen Bedingungen erfolgen.

Die Quantität der in dieser Arbeit erhaltenen Immunsignale muss als relativ beschrieben werden. Bei einer semiquantitativen Auswertung ist immer nur ein Bezug auf eine mitgeführte Kontrolle möglich. Die hier erhaltenen Prozent-Veränderungen sollten immer mehr als eine qualitative Änderung betrachtet werden. Entsprechend sind die in dieser Arbeit gezeigten, aufgrund der Ginkgo-Behandlung beobachteten Veränderungen als Wirkung der untersuchten Droge auf TTR zu werten, aber ob es sich tatsächlich um eine 30%ige oder 50%ige Änderung handelt, kann mittels der IHC wegen der Fehlenden Kalibrierung des Immunsignals hier nicht mit Sicherheit gesagt werden. Hierfür wären Western Blotting-Analysen erforderlich, die eine zuverlässigere Quantifizierung erlauben würden (siehe auch methodische Betrachtungen unter 5.1.2) und späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben müssen.

## **5.2 Detektion von GH- und Prolaktin-Immunreaktivität**

### **5.2.1 Wachstumshormon (GH)**

GH ist ein anaboles Hormon, das Zellen zur Teilung und zum Wachstum anregt. Die Hauptaufgabe scheint im Wachstum von langen Röhrenknochen und den Skelettmuskeln zu liegen wobei Wachstumshormon-Rezeptoren im Hirn nachgewiesen wurden (Marieb 1991). Es wird vermutet, dass GH die Blut-Hirn-Schranke Rezeptor-vermittelt überwindet (Nyberg et al. 2000). Mehrere Studien haben gezeigt, dass GH im Zentralnervensystem verschiedene Effekte vermittelt wie z.B. die Proliferation neuer Nervenzellen bei der Bildung axonaler Vernetzungen und nicht zuletzt als Bestandteil der GH/IGF-I (insulin-like growth factor I)-Achse (Saez 2012; Carro et al. 2002; Melmed 1990). IGF-I kann die hypophysäre GH-Genexpression und Sekretion hemmen. Die GH/IGF-I-Achse ist zunehmend Gegenstand der Untersuchung neurodegenerativer Erkrankungen, unterliegt unter physiologischen Bedingungen einem altersabhängigen Wirkungsverlust und ist möglicherweise nicht nur an altersbedingten Einschränkungen der Kognition und Gedächtnisleistung verantwortlich (Saez 2012; Frisardi 2010). Ob ein GH-Mangel durch Störung dieser Achse als fördernder Faktor bei der Pathogenese einer neurodegenerativen Erkrankung gilt oder bereits eine Konsequenz der Erkrankung darstellt, ist bisher ungeklärt (Gasperi 2010). Aktuell gibt es Testungen mit einem GHRH-Antagonisten im Rahmen der AD (Jaszberenyi et al. 2012). Es konnte weiter gezeigt werden, dass Cholinesterasehemmer, also Medikamenten auch für die Behandlung von Alzheimer-Patienten, eine erhöhte Ausschüttung von GH durch Stimulation des GHRH (=

growth hormone releasing hormone; Saez 2012; Obermayr et al. 2005) bewirken. Ein GH-Mangel kann zu kognitiven Einschränkungen führen (Nyberg et al. 2000; Melmed 1995). Klinische Studien zeigten nach GH-Substitutionstherapie neben psychologischen Verbesserungen positive Effekte auch hinsichtlich Gedächtnis, Motivation, Belastbarkeit und mentaler Stärke (Nyberg et al. 2000).

Eine veränderte Expression des Wachstumshormon-kodierenden Gens wurde durch Mikroarray-Analysen der Gehirne von Mäusen ermittelt, nachdem die Tiere zuvor einer chronischen Behandlung mit *Ginkgo biloba*-Präparaten unterzogen worden waren: Es zeigte sich eine erhöhte Expression des für GH kodierenden Gens im Kortexbereich der analysierten C57B16 Mäuse (Rimbach et al. 2003; Watanabe et al. 2001). Aufgrund dieser Datenlage und der Möglichkeit, dass GH unter Umständen ein molekularer Angriffspunkt für neuromodulierende Wirkungen von EGb761 ist, sollte in der vorliegenden Arbeit auch für dieses Hormon eine immunhistochemische Analyse erfolgen. Bereits in den durchgeführten Vorversuchen zur Ermittlung einer geeigneten Verdünnung eines gegen hGH gerichteten Kaninchen-Antikörpers (der Firma Quartett, Berlin), ließ sich GH-Immunreaktivität weder im Neokortex noch im Hippokampus darstellen. Verwendung fand der polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen hGH der Firma Quartett, Berlin. Neben der Möglichkeit, dass letztlich die Antikörper-Epitop-Bindung nicht funktioniert hat oder die Art der durchgeführten Hirnfixierung einen möglichen Nachweis verhindert hat, ist auch denkbar, dass nach chronischer Behandlung mit *Ginkgo biloba* eine entsprechende Veränderung der Expression des GH-kodierenden Gens, also dessen mRNA-Spiegel, nicht zu erhöhten GH-Proteinexpression im Hirn führt. Das wiederum könnte daran liegen, dass von GH zahlreiche Isoformen bekannt sind – vor allem bedingt durch viele einzelne GH-Gene, mRNA-Splicing sowie post-translationale Modifikationen. Dies ist auch von Bedeutung bei GH-Nachweisreaktionen im Urin oder im peripheren Blut sowie bei der Therapie von GH-Mangelzuständen (Baumann et al. 2009; Rigamonti et al. 2012). Zusammenfassend konnte GH immunhistochemisch in den in dieser Arbeit zur Verfügung gestellten Proben nicht nachgewiesen werden, entgegen dem durch Rimbach et al. 2003 und Watanabe et al. 2001 beschriebenen Einflusses von EGb761 auf die mRNA-Spiegel dieses Hormons.

### **5.2.2 Prolaktin-Immunreaktivität**

Das strukturell dem humanen Wachstumshormon gleichende Peptidhormon Prolaktin stand ebenfalls im Fokus der immunhistochemischen Analysen der vorliegenden Arbeit. Prolaktin

spielt vor allem eine wichtige Rolle im weiblichen Stoffwechsel und beschränkt sich auf die postpartale Periode, wo es die Laktation sowie die postpartale Anovulation aufrecht erhält. Der Prolaktin-Tagesspiegel zeigt Tagesschwankungen, erlebt jedoch sein Peak am frühen Morgen. Während der Schwangerschaft steigen die Prolaktinspiegel kontinuierlich bis auf ein Zehnfaches an (von Werder 1998). Prolaktin wird in peptidergen Neuronen und laktotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens exprimiert und findet im Bereich der medianen Eminenz Anschluss an den kapillaren Plexus des portalen Kreislaufes, um nach Stimulation zum jeweiligen Zielorgan zu gelangen (Ben-Jonathan et al. 2008, Review).

Die genaue Wirkung des Hormons im zentralen Nervensystem ist sehr komplex und ist nicht vollständig geklärt (Bernichtein et al. 2012, Review; Freeman et al. 2000). Unter den zahlreichen beeinflussten Stoffwechselwegen sind neben der Fähigkeit, die subventrikuläre Zone des lateralen Ventrikels zu stimulieren, um neue olfaktorische Neurone während der Schwangerschaft zu generieren (Larsen et al. 2010), auch weitere neurologische Funktionen involviert. Es ist jedoch nicht vollständig geklärt, ob Prolaktin hier als Neurotransmitter, als Neuromodulator oder als zentrales Zytokin bei der Regulation von glialen Funktionen agiert. Prolaktin lässt embryonale Astrozyten proliferieren und differenzieren (Mangoura et al., 2000). Darüber hinaus stimuliert es Vorläuferzellen im Hippokampus von adulten Mäusen zur Neurogenese (Walker et al. 2012). Eine solche Neurogenese ließ sich durch periphere und zentrale Gabe von Prolaktin sowohl in männlichen als auch in weiblichen Mäusen auslösen (Shingo et al. 2003; Mak et al. 2007). Dass zudem auch der in dieser Arbeit Verwendung gefundene *Ginkgo biloba*-Extrakt EGb761 einen Einfluss auf dieses Hormon zu haben scheint, zeigten Yeh et al. 2007, die durch eine Behandlung von Ratten mit EGb761 eine vom dopaminergen System vermittelte Reduktion des Prolaktins im Serum nachweisen konnten. Letztlich muss in Bezug auf die vorliegende Arbeit konstatiert werden, dass in der Literatur keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen Prolaktin, einer chronischen Behandlung mit *Ginkgo biloba* sowie Morbus Alzheimer im Sinne einer neuroprotektiven Wirkung des Hormons beschrieben sind. Auf Grundlage der erhöhten Expression des Prolaktin-Gens nach chronischer Behandlung von Mäusen mit *Ginkgo biloba*-Extrakt EGb761 (Rimbach et al. 2003; Watanabe et al. 2001) sollte hier eine immunhistochemische Quantifizierung des Proteins in den vorliegenden Mäusehirnen erfolgen. Die Annahme, dass Hirne verschiedener Fütterungsgruppen signifikant verschiedene Level von Prolaktin zeigen, konnte nicht bestätigt werden. In der vorliegenden Arbeit gelang die immunhistochemische Darstellung von Prolaktin im Bereich des ventro- und dorsomedialen Hypothalamuskerns, des Nucleus paraventricularis sowie im lateralen Bereich des piriformen Kortex. Prolaktin-immunreaktive

Zellen präsentierten sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den übrigen 3 Fütterungsgruppen annähernd gleich. Da es sich bei den Versuchstieren um weibliche Mäuse handelte, spricht dieser Nachweis ein normales Vorkommen im Rahmen einer Aufrechterhaltung des basalen Prolaktinspiegels passen. Die erhobenen Daten decken sich teilweise mit Befunden zur Verteilung von Prolaktinrezeptor-mRNA besonders im rostralen Hypothalamus, in den periventriculären Regionen sowie im Bereich des ventromedialen Kerns und des Nucleus arcuatus des Hypothalamus (Brown et al. 2010). Prolaktin-immunpositive Zellen im piriformen Kortex erklären sich möglicherweise durch olfaktorische Fasern, welche in dieser Region enden und mit dem laktotropen Regelkreis in Verbindung stehen (Dagvadorj et al. 2007).

### **5.3 Immunhistochemische Darstellung des Tau-Gesamtproteins**

Wie in der Einleitung beschrieben ist Tau ein lösliches, in hoher Konzentration axonal vorkommendes Protein, das auf Chromosom 17 kodiert ist. Als Hauptfunktion dieses Proteins gilt seine Beteiligung am Aufbau und an der Stabilisierung von Mikrotubuli (Ke et al. 2012, Review). Das erwachsene menschliche Gehirn produziert 6 verschiedene Isoformen des Tau-Proteins, die durch alternatives mRNA-Spleißen alle aus einem Gen hervorgehen (Hernandez et al. 2007).

Während die Phosphorylierung des Tau-Proteins axonale und synaptische Plastizität im sich entwickelnden Gehirn fördert (Arendt 2005 und 2009; Lovestone et al. 1997), kann sie im erwachsenen Gehirn pathologisches Ausmaß annehmen und gehört zu einer Gruppe von Krankheiten, die als Tauopathien bezeichnet werden. Hyperphosphoryliertes Tau kommt hauptsächlich in Neuronen vor, wurde aber auch in Astro- und Oligodendrozyten nachgewiesen (Tashiro et al. 1997). Es ist schwer löslich, hat aufgrund seiner durch abnormale Phosphorylierung bedingten Konformationsänderung keine Assoziation zu Mikrotubuli mehr und aggregiert schließlich zu Filamenten (Iqbal et al. 2005).

Arbeiten von Rimbach et al. 2005 und Watanabe et al. 2001 zeigten nach chronischer *Ginkgo biloba*-Behandlung in Mäusen im Kortex eine erhöhte Expression des Tau-Gens. Nach der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Testung muss jedoch auch für diesen Marker postuliert werden, dass bei der visuellen Auswertung korrespondierender Hirnschnitte der 4 Experimentalgruppen keine offensichtlichen Unterschiede in Bezug auf Intensität oder Verteilung des Markers sichtbar waren. Für das Gesamt-Tau-Protein immunpositive Fasern wurden in der hippocampalen CA3-Region, Tau-immunpositive

Somata im Subiculum von Mäusen aller Gruppen in gleicher Ausprägung detektiert. Der eingesetzte primäre Kaninchen-Antikörper gegen Gesamt-Tau (Dakocytomation, Hamburg) gilt als gut etabliert (Härtig et al. 2005; Biernat et al. 2002) und ließ sich auch in der vorliegenden Arbeit erfolgreich anwenden. Die Detektion von Gesamt-Tau-positiven Strukturen erfolgte in den zu erwartenden Hirnregionen (Ke et al. 2012, Review). Aufgrund der starken Expression von Gesamt-Tau und der damit verbundenen sehr intensiven Immunmarkierung, ist eine densitometrische Auswertung – analog zu in der vorliegenden Arbeit erfolgten TTR-Semiquantifizierung - erschwert, weil kleine Unterschiede in der Tau-Expression wegen der hohen Signaldichte kaum detektierbar sind. In seiner niedrig phosphorylierten Form werden Tau vielfältige Eigenschaften zugeschrieben, so z.B. Signaltransduktion, neuronale Entwicklung, Apoptose und nicht zuletzt Neuroprotektion (Ittner und Götz 2011; Wang und Liu 2008). Gerade bezüglich der möglichen Neuroprotektion in Verbindung mit dem auf mRNA-Ebene hochreguliertem Tau-Gen nach chronischer *Ginkgo biloba*-Behandlung gilt es künftig herauszufinden, ob eine Behandlung mit *Ginkgo biloba* auch zu erhöhten Tau-Protein-Konzentrationen im Hirn führt, wobei quantitative Western Blot-Analysen einbezogen werden sollten.

#### **5.4 TTR-Immunreaktivität im Hippokampus**

TTR ist ein in der Leber und im Plexus choroideus gebildetes Plasmaprotein (Aleshire et al. 1983), das als Transporter von Thyroxin und Retinol fungiert (Raz und Goodman 1969). Dieses Protein gilt in mutierter Form als Auslöser der familiären Amyloid-Polyneuropathie, einer neurodegenerative Erkrankung mit tödlichem Ausgang. Hier zeigen sich vor allem im peripheren Nervensystem pathologische Anreicherungen von TTR-Amyloid-Fibrillen (Saraiva 2001). Weitere Studien identifizierten TTR als Protein mit vielfältigen Aufgaben im Bereich der Aufrechterhaltung kognitiver Prozesse während des Alterns sowie der Prozessierung von Neuropeptiden oder der Regeneration von Nervenfasern (Fleming et al. 2007; Liz et al. 2009). Des Weiteren werden dem Protein neuroprotektive Eigenschaften im Zusammenhang mit der AD zugeschrieben; es konnte gezeigt werden, dass es die Formation von A $\beta$ -Fibrillen verhindert (Costa et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit gelang der immunhistochemische Nachweis TTR-positiver Neurone in verschiedenen Hippokampusregionen. Verschiedene Studien postulierten den Plexus choroideus als einzigen Syntheseort und damit als einzig möglichen Nachweisort (siehe z.B. Sousa et al. 2007). Im Gegensatz dazu führten andere Untersuchungen zum

intraneuralen Nachweis von TTR in Gehirnen von Mäusen mit geringer TTR Synthese (Li et al. 2011; Murakami et al. 2010). Buxbaum et al. (2008) verifizierten dies sogar mit einer mitgeführten Kontrolle, d.h. Hirnen von TTR-Knock-out-Mäusen, die entsprechend keine TTR-Immunreaktivität zeigten. Intraneuronale TTR-Immunreaktivität deutet entweder auf eine neuronale TTR-Synthese oder -Aufnahme nach TTR-Synthese im Plexus choroideus hin. Eine neuronale Synthese wird auch gestützt durch verschiedene Mikroarray-Untersuchungen, die TTR-mRNA in Hirnschnitten nachwies (Lein et al. 2007; Zapala et al. 2005; Rimbach et al. 2003; Watanabe et al. 2001). Augustin et al. konnten 2009 zwar ebenfalls den Nachweis von TTR-mRNA bzw. -Protein erbringen, jedoch nicht die erhöhte hippocampale Expression von TTR-mRNA nach einer vierwöchigen Fütterung mit *Ginkgo biloba* (EGb761) bestätigen. Von diesen Autoren wird darüber hinaus diskutiert, ob ein solcher Nachweis Folge einer Kontamination durch den Plexus choroideus war, wie dies Sousa et al. bereits 2007 beschrieben hatten.

Die vorliegende Arbeit erbringt nicht nur den Nachweis von TTR in hippocampalen Subfeldern, sondern es konnte auch gezeigt werden, dass eine diätetische EGb761-Behandlung die Intensität der TTR-Expression im Hippokampus signifikant beeinflusst. Dies betrifft hauptsächlich die Flavonoid-Fraktion, während die Terpenoid-Fraktion keine Wirkung zeigte. Die beobachteten Veränderungen sind in allen untersuchten Subfeldern der hippocampalen Formation zu finden, d.h. in den Regionen CA1 sowie CA2/CA3, im Gyrus dentatus sowie im Bereich der dorsalen Kommissur, angrenzend an den dritten Ventrikel und den Hilus des Gyrus dentatus beider Hemisphären. In Analogie zu Studien, die TTR-Immunreaktivität im Bereich des Plexus choroideus nachweisen konnten (z.B. Costa et al. 2006) war in der vorliegenden Arbeit auch ein Nachweis dieses Markers in dieser Region zu erwarten. Im Bereich des Plexus choroideus konnte der Marker nicht nur nachgewiesen werden, sondern es wurde sogar eine höhere Intensität der Immunreaktivität des Markers in der Gruppe F (Flavonoid-Fraktion) und der Gruppe G (Ginkgo) im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt. Entsprechend sind weiterhin verschiedene Varianten hinsichtlich eines Bildungsortes des TTR denkbar: Durch die verfütterte Flavonoid-Fraktion, bzw. durch die Fütterung des Extraktes EGb761 kann es zu einer erhöhten Verfügbarkeit des TTR im Bereich des Plexus choroideus (Bereich dorsale Kommissur und Hilusbereich des Gyrus dentatus), aber auch im Ammonshorn sowie im Gyrus dentatus und hier besonders im zeldichten Stratum granulosum kommen. Alternativ besteht die Möglichkeit der TTR-Synthese durch die Zellen des Plexus choroideus und eines anschließenden axonalen

„Exports“ in verschiedene Regionen der hippocampalen Formation, was aufgrund der komplexen rekurrenten synaptischen Verschaltung des Hippokampus nicht unwahrscheinlich erscheint (Amaral und Witter 1989; Frotscher et al. 1988). Die andere Variante wäre eine direkte Bildung des TTR in den unterschiedlichen Regionen oder Subfeldern, beispielsweise in den Pyramidenzellschichten des Ammonshorns. Hierzu fehlen jedoch eindeutige Daten und Untersuchungen, und weitere Arbeiten müssen klären, in welcher Weise eine exogen hervorgerufene höhere Verfügbarkeit von TTR im Hippokampus auch mit einer höheren neuroprotektiven Wirkung vergesellschaftet ist.

Bestimmte Neurone gesunder Organismen zeigen eine normale TTR-Synthese (Li et al. 2011, Murakami et al. 2010), die unter pathologischen Bedingungen in verschiedenen Krankheitsbildern ansteigt (Li et al. 2011). Ein Nachweis erhöhter TTR-Spiegel erfolgte bei Depression und Schizophrenie sowie bei Erkrankungen wie Multipler Sklerose, fokaler zerebraler Ischämie, Normaldruckhydrozephalus und Optikusneuropathie, war jedoch beschränkt auf Plasma- oder CSF-Proben (Fleming et al. 2009). Zu klären bleibt, ob eine prophylaktische Einnahme von EGb761 eventuell protektiv gegen die Manifestation verschiedener Erkrankungen wirkt, indem es die neuronale Verfügbarkeit und Synthese von TTR steigert. EGb761 ist ein gut toleriertes Phytotherapeutikum ohne nennenswerte Nebenwirkungen (Gertz und Kiefer 2004, Review). Es sollte jedoch bedacht werden, dass eine höhere Verfügbarkeit von TTR in neuronalen Strukturen des Organismus negative Effekte haben könnte. Hier gilt es, noch tieferes Verständnis für die Rolle von TTR in verschiedenen pathologischen Mechanismen und Erkrankungen zu gewinnen.

In Patienten mit AD konnte TTR in hippocampalen Plaques und Gefäßen nachgewiesen werden (Stein et al. 2004; Schwarzman et al. 1996). Bei der Fortführung von Untersuchungen zur erhöhten TTR-Expression in transgenen Mäusen, die altersabhängig Aspekte der Alzheimer-Pathologie modellieren, und einer *in vitro* bestätigten Assoziation von TTR mit A $\beta$  und entsprechendem Schutz vor A $\beta$ -Toxizität (Li et al. 2011; Stein et al. 2004), wurden kürzlich A $\beta$ -Bindungsstellen des TTR identifiziert (Du et al. 2012; Du und Murphy 2010). Neben früheren Studien, die in transgenen Tg2576 Mausmodellen eine Erhöhung von TTR-Transkripten ermittelten sowie den immunhistochemischen TTR-Nachweis in hippocampalen Neuronen erbrachten (Wu et al. 2006; Stein und Johnson 2002), bestätigten Buxbaum et al. 2008 im gut etablierten transgenen Mausmodell APP23, dass eine TTR-Überexpression neuropathologische Manifestationen der AD unterdrückt. Li et al. bestätigten 2012 die neuronale Transkription und Produktion von TTR und folgerten, dass diese neuronale



Synthese eine protektive Antwort des Organismus auf toxische A $\beta$ -Aggregate sein könnte, indem TTR A $\beta$  bindet und die Produktion von toxischen A $\beta$ <sub>1-40/42</sub>-Aggregaten reduziert (Li et al. 2012).

Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass EGb761 Amyloidogenese sowie A $\beta$ -Aggregation verhindern kann, beides entscheidende Prozesse in der Pathologie von Morbus Alzheimer (Luo et al. 2003 und 2002; Bastianetto et al. 2000). Bezogen auf einzelne Proteine wie z.B. APP konnten Yao et al. 2004 zeigen, dass die Fütterung von EGb761 über 28 Wochen bei Ratten zu einer verminderten Proteinexpression im Neokortex und im Hippokampus führte. Augustin et al. (2009) konnten dies nach einer vierwöchigen Diät in Mäusen nicht bestätigen: APP-mRNA in Hippokampus und Kortex waren nicht beeinflusst. Dies könnte an der unterschiedlichen Diätdauer und/oder auch an den unterschiedlichen untersuchten Spezies (Ratten versus Mäuse) liegen. Weiter waren auch die mRNA der für AChE (Azetylcholinesterase), Adam10 (Protease des APP-Abbaus), APPBP1 (= APP binding protein) und Nep (Nepilysin) kodierenden Gene nicht durch die Diät beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit konnten die zuvor auf mRNA-Ebene erhöhten Proteine (TTR, Prolaktin, Gesamt-Tau, GH) zwar alle außer dem GH immunhistochemisch nachgewiesen werden, doch nur im Fall des TTR eine durch EGb761-vermittelte, erhöhte hippokampale Expression beobachtet werden. Dies könnte an der nur vierwöchigen Dauer der erfolgten Diät liegen. Verschiedene Studien verweisen auf die Terpenoid-Fraktion des EGb761 als deren offenbar wichtigstem neuroprotektivem Bestandteil (de Feudis 2008 und 2002; Chandrasekaran et al. 2003; Ahlemeyer und Krieglstein 2003; Klein et al. 2003). Ahlemeyer und Krieglstein berichteten, dass die Terpene, Ginkgolid B und Bilobalide die wichtigsten gegen oxidative Schäden im Hirn wirksamen Bestandteile seien (2003). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich TTR signifikant erhöht in der Gruppe G, die den kompletten Extrakt EGb761 erhalten hatte, und in der Gruppe F, deren Diät aus der Flavonoid-Fraktion bestanden hatte. Der durch EGb761-vermittelte Effekt auf die TTR-Expression ist vermutlich hauptsächlich auf die flavonoiden Bestandteile des EGb761 zurückzuführen, da zum einen die alleinige Verfütterung der Terpenoid-Fraktion keine Wirkung auf die TTR-Expression hatte, und andererseits die von der Flavonoid-Fraktion-induzierte Erhöhung der TTR-Expression in der gleichen Größenordnung liegt wie der Effekt von EGb761 als Gesamtfraktion. Die Wirkungen von EGb761 als Radikalfänger sowie als Katalysator antioxidativer Reaktionen wurde ebenfalls auf die Flavonoid-Fraktion zurückgeführt (Maitra et al. 1995; Marcocci et al. 1994). Nahezu ausgeschlossen werden kann jedoch, dass die Dosis der verwendeten

Terpenoid-Fraktion nicht ausreichend war. Der Anteil der Flavonoid-Fraktion in der Terpenoid-Fraktion ist etwa doppelt so hoch wie im Gesamtextrakt EGb761 (siehe auch Tab. 3.1). Selbst 100 mg der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Verfütterung der Terpenoid-Fraktion-Diät, enthält noch doppelt so viel Terpene wie der Gesamtextrakt. Deshalb wurde die verfütterte Menge der Terpenoid-Fraktion auf 100 mg pro kg Diätextrakt reduziert. Dies spiegelt in etwa das Verhältnis der einzelnen Fraktionen innerhalb des EGb761 wieder. Die alleinige Dosis der Terpenoid-Fraktion war somit mit denen der anderen Bestandteile vergleichbar. Dies erscheint wichtig für weiterführende Untersuchungen, vor allem wenn es um Dosierungen von zu entwickelnden Medikamenten geht. Augustin et al. fanden 2009 eine nicht signifikante Tendenz zu erhöhten TTR im Neokortex und im Hippokampus nur in der EGb761-Fütterungsgruppe.

Weitere Studien der Wechselwirkungen zwischen EGb761 und TTR sollten folgen. Die für einen signifikanten Effekt von EGb761 definitiv nötige Behandlungsdauer kann aktuell nicht genau angegeben werden. Zum einen existieren Befunde von Watanabe et al. aus dem Jahr 2001, dass nach einer vierwöchigen Diät die Expression der Gene für einige Proteine mit neuroprotektiven Eigenschaften signifikant erhöht waren. Zum anderen konnten Augustin et al. 2009 zeigen, dass in einem transgenen Mausmodell für die AD nur eine Langzeitbehandlung (16 Monate) zu einem Rückgang der transgenen humanen APP-mRNA führte, während dieser Effekt nach einer nur vierwöchigen Behandlung ausblieb. Darüber hinaus wurde ein altersabhängiger Effekt von 30 Tage verabreichtem EGb761 auf die synaptische Plastizität und Erregbarkeit nachgewiesen: Nur die untersuchten 18-24 Monate alten Mäuse zeigten signifikante Ergebnisse (Williams et al., 2008). Zusammenfassend müssen weitere Studien folgen, die neben der Analyse der Wechselwirkungen zwischen TTR und EGb761 z.B. die Diättdauer sowie die Versuchstiere im Altersgang untersuchen.

## 5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine vierwöchige chronische Behandlung mit dem *Ginkgo biloba*-Extrakt EGb761 die Intensität der TTR-Expression im Hippokampus von gesunden Mäusen beeinflusst, was hauptsächlich auf die Flavonoid-Fraktion zurückzuführen war, während die Terpenoid-Fraktion keine Wirkung zeigte. Die beobachteten Veränderungen sind in allen untersuchten Regionen der hippokampalen Formation zu finden. Es gibt verschiedene Hinweise auf neuroprotektive

Eigenschaften des TTR, insbesondere im Zusammenhang zur Verhinderung bzw. Abschwächung von A $\beta$ -induzierter Toxizität, indem es A $\beta$  bindet oder gar zur Verhinderung weiterer Bindungen von A $\beta$  führt (Du et al. 2012). So gesehen könnten EGb761-Gaben an Alzheimerpatienten die A $\beta$ -induzierte Neurodegeneration im Hippokampus über erhöhte TTR-Spiegel günstig beeinflussen. Allerdings bedarf dies weiterer experimenteller Prüfung sowohl an transgenen AD-Tiermodellen als auch im autoptischen Gewebe von AD-Patienten. Darüber hinaus sind Fragen der physiologischen Bedeutung erhöhter TTR-Spiegel bei Gesunden zu klären, auch hinsichtlich des Einsatzes von EGb761 als Langzeit-Prophylaktikum zur Verhinderung bzw. Verzögerung des Ausbruchs der AD.

## 6 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Zum Einfluss von *Ginkgo biloba*-Extrakt (EGb761) und seiner Komponenten auf die Expression von Transthyretin im Maushirn: eine immunhistochemische Studie

eingereicht von Tobias May

angefertigt am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Abteilung für Molekulare Bildgebung der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

betreut von Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schliebs

Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Härtig

November 2013

Durch stetig steigende Prävalenz, gekoppelt mit einer zunehmenden Lebenserwartung, erfährt die Alzheimersche Erkrankung (AD) eine immer schwerwiegendere ökonomische und soziale Bedeutung, zumal es bis heute keine wirksame Therapie gibt. Man geht aktuell von 3 Hauptmechanismen innerhalb der Pathogenese der AD aus. Die klassische Amyloidhypothese postuliert, dass ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Abbau von APP (Amyloid-Präkursorprotein) zur Akkumulation des A $\beta$  in senilen Plaques führt. Des Weiteren im Vordergrund stehen die histopathologisch nachweisbaren neurofibrillären Tangles (NFT), assoziiert mit der Tau-Pathologie in AD. Während die Phosphorylierung des Tau-Proteins axonale und synaptische Plastizität im sich entwickelnden Gehirn fördert, kann sie im erwachsenen Gehirn pathologische Ausmaße annehmen und zu einer Tauopathie führen. Als dritter Punkt ist die bei der AD auftretende cholinerge Dysfunktion zu nennen. Hier werden u.a. Störungen der Expression des Nervenwachstumsfaktors (NGF) sowie Veränderungen in der Expression und Funktion von muskarinischen und nikotinischen Azetylcholin-Rezeptoren als Ursache genannt.

Dementsprechend ist für mögliche Therapieansätze dieser Erkrankung ein genaues Verständnis der neuropathologischen Mechanismen unerlässlich. Neben Therapien, die darauf

zielen mit muskarinischen M1-Rezeptoren eine Modulation der miteinander verzahnten APP-Prozessierung,  $\beta$ 4A-Belastung und cholinergen Dysfunktion im Hirn der Patienten zu bewirken, werden auch viele weitere Therapieoptionen geprüft. Es sind verschiedene Wirkstoffe bekannt, die einen Einfluss auf die Expression solcher Proteine haben, die bei der Pathogenese der AD eine Rolle spielen. Ein in dieser Hinsicht teilweise erforschtes Präparat ist EGb761, ein definierter Extrakt aus *Ginkgo biloba*-Pflanzenanteilen. Dieser Extrakt weist ein breites pharmakologisches Spektrum auf: Gezeigt wurden u.a. ein Schutz von Neuronen im Hippokampus gegenüber  $\beta$ -Amyloid-vermittelten Zelluntergang sowie veränderte, neuronale Erregbarkeit mit Verbesserung der synaptischen Effektivität und Plastizität im Bereich des Hippokampus gealterter Mäuse.

Andere Studien zeigten einen Einfluss von EGb761 auf die Expression verschiedener Gene, die einige für die AD relevanter Proteine kodieren. So konnten mittels Mikroarray-Analysen an Hirnmaterial von Mäusen, die zuvor einer chronischen Behandlung mit *Ginkgo biloba* (EGb761) unterzogen wurden, deutlich veränderte Transkript-Spiegel von Transthyretin (TTR) -mRNA, Prolaktin-mRNA, Tau-mRNA und Wachstumshormon (GH) -mRNA beobachtet werden.

Um zu klären, ob sich die auf Gen-Ebene beobachteten, durch *Ginkgo biloba* vermittelten Effekte auch auf die Expression der entsprechenden Proteine auswirken, wurden in der vorliegenden Arbeit die Hirne von mit *Ginkgo biloba* behandelten Mäusen einer immunhistochemischen Analyse unterzogen. Die für die vorliegende Studie herangezogenen Mäuse hatten für 4 Wochen eine Diät mit EGb761 als Beimengung im Futter erhalten. Da bekannt ist, dass sich der EGb761-Extrakt u.a. aus pharmakologisch wirksamen Terpenoid- und Flavonoid-Fractionen zusammensetzt, wurde auch Hirnmaterial von Mäusen einbezogen, die definierte Beimengungen der Flavonoid-Fraktion oder der Terpenoid-Fraktion im Futter bekommen hatten. Hiermit sollte geklärt werden, ob und welche Fraktionen des EGb761-Extraktes die zu erwartenden Proteinveränderungen verursachen.

An koronalen Schnitten von Perfusions-fixierten Gehirnen wurden zunächst kommerziell verfügbare Antikörper gegen TTR, Prolaktin, Gesamt-Tau sowie GH getestet und dann unter identischen experimentellen Bedingungen immunhistochemische Präparate von Hirnschnitten aus allen untersuchten Experimentalgruppen hergestellt. Die erhaltenen Präparatserien wurden zunächst lichtmikroskopisch analysiert, wobei vor allem auf Unterschiede hinsichtlich regionaler Expression und Intensitäten der Immunsignale zwischen den untersuchten

Versuchsgruppen fokussiert wurde. In den Fällen, in denen sich die Immunsignale zwischen den Versuchsgruppen deutlich unterschieden, wurde eine semiquantitative Auswertung der Signalintensitäten mittels PC-gestützter Bildanalyse vorgenommen.

Während die Expression von Tau, Prolaktin und GH durch die vierwöchige EGb761-Verfütterung kaum beeinflusst war, zeigte die densitometrische Auswertung der TTR-Immunmarkierungen eine signifikante Erhöhung der TTR-Expression, hauptsächlich in Regionen der hippocampalen Formation, vor allem im Ammonshorn (CA1-3), im Besonderen im Gyrus dentatus sowie im Bereich der dorsalen Kommissur beziehungsweise des umgebenden dritten Ventrikels – verglichen mit Daten, die an Kontrollschnitten (von Tieren mit Normaldiät) erhoben wurden. Die EGb761-vermittelte Erhöhung der TTR-Expression ist wahrscheinlich auf die Wirkung der Flavonoid-artigen Bestandteile des EGb761 zurückzuführen, da die zeitgleiche Verfütterung der Terpenoid-Fraktion die TTR-Expression nicht beeinflusste.

Das Wachstumshormon konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Neben der möglichen technischen Ursachen wie mangelnder Antikörperqualität oder unzureichender Gewebefixierung ist auch denkbar, dass nach chronischer Behandlung mit *Ginkgo biloba* eine entsprechende Veränderung der Expression des GH-kodierenden Gens nicht zu erhöhter GH-Proteinexpression im Hirn führt.

Ein Einfluss von EGb761 auf die Expression von Prolaktin konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Es gelang die immunhistochemische Darstellung im Bereich des ventro- und dorsomedialen Hypothalamuskerns, des Nucleus paraventricularis sowie im lateralen Bereich des piriformen Kortex. Prolaktin-immunreaktive Zellen präsentierten sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den übrigen 3 Fütterungsgruppen annähernd gleich. Da es sich bei den Versuchstieren um weibliche Mäuse handelte, könnte dieser Nachweis zu einem normalen Vorkommen im Rahmen einer Aufrechterhaltung des basalen Prolaktinspiegels entsprechen, da sich die hier erhobene Daten teilweise mit Befunden zu Verteilung von Prolaktinrezeptor-mRNA besonders im rostralen Hypothalamus, in den periventrikulären Regionen sowie im Bereich des ventromedialen Kerns und des Nucleus arcuatus des Hypothalamus decken.

Gesamt-Tau-immunpositive Fasern wurden in der hippocampalen CA3-Region, Tau-immunpositive Somata im Subiculum von Mäusen aller Gruppen in gleicher Ausprägung detektiert. Der eingesetzte primäre Kaninchen-Antikörper gegen Gesamt-Tau gilt als gut etabliert und ließ sich auch in der vorliegenden Arbeit störungsfrei anwenden. Die Detektion von Gesamt-Tau-positiven Strukturen erfolgte in den zu erwartenden Hirnregionen. Aufgrund der starken Expression von Gesamt-Tau und der damit verbundenen hohen Intensität der Immunreaktivität war eine densitometrische Auswertung – wie in dieser Arbeit für TTR-Immunmarkierungen – erschwert, weil kleine Unterschiede der Tau-Expression in den Gewebsschnitten aufgrund der hohen Signaldichte kaum detektierbar sind.

TTR zeigte sich in der vorliegenden Studie signifikant erhöht in der Gruppe G, die den kompletten Extrakt EGb761 erhalten hatte und in der Gruppe F nach Fütterung mit der Flavonoid-Fraktion. Der durch EGb761 vermittelte Effekt auf die TTR-Expression ist vermutlich hauptsächlich auf die flavonoiden Bestandteile des EGb761 zurückzuführen. Es ist denkbar, dass EGb761-Gaben bei AD-Patienten die A $\beta$ -induzierte Neurodegeneration im Hippokampus über Erhöhung des TTR-Spiegels günstig beeinflussen. Dies bedarf jedoch weiterer experimenteller Prüfung, sowohl an transgenen AD-Tiermodellen als auch in autoptischem Gewebe von AD-Patienten. Darüber hinaus sind Fragen der physiologischen Bedeutung erhöhter TTR-Spiegel bei Gesunden zu klären, auch hinsichtlich des Einsatzes von EGb761 als Langzeit-Prophylaktikum zur möglichen Verhinderung bzw. Verzögerung des Ausbruchs der AD.

## 7 Literaturverzeichnis

Ahlemeyer, B., Kriegelstein, J. (2003): Pharmacological studies supporting the therapeutic use of Ginkgo biloba extract for Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry* **36**, 8-14.

Aleshire, S.L., Bradley, C.A., Richardson, L.D., Parl, F.F. (1983): Localization of human prealbumin in choroid plexus epithelium. *J Histochem Cytochem* **31**, 608-612.

Almkvist, O., Winbald, B. (1999): Early diagnosis of Alzheimer dementia based on clinical and biological factors. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **249**, 3-9.

Alzheimer, A. (1907): Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Centralblatt für Nervenheilkunde und Psychiatrie* **18**: 177-179.

Amaral, D.G., Witter, M.P. (1989): The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* **31**, 571-591.

American Psychiatric Association (1994): *Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Fourth edition.* Washington, DC.

Andorfer, C., Kress, Y., Espinoza, M., et al. (2003): Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem* **86**, 582-590.

Andrieu, S., Gillette, S., Amouyal, K., Nourthashemi, F., Reynish, E., Ousset, P.J., Albaredo, J.L., Vellas, B., Grandjean, H. (2003): Association of Alzheimer's disease onset with Ginkgo biloba and other symptomatic cognitive treatments in a population of women aged 75 years and older from the EPIDOS study. *J Gerontol A Biol Med Sci* **58**, 372-377.

Apelt, J., Ach, K., Schliebs, R. (2003): Aging related down-regulation of neprilysin, a putative  $\beta$ -amyloid-degrading enzyme, in transgenic Tg2576 Alzheimer-like mouse brain is accompanied by an astroglial upregulation in the vicinity of  $\beta$ -amyloid plaques. *Neurosci Lett* **339**, 183-186.



Arendt, T. (2003): Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity. *Prog Neurobiol* **71**, 183-248.

Arendt, T. (2005): Alzheimer's disease as a disorder of dynamic brain self-organization. *Prog Brain Res* **147**, 355-378.

Arendt, T. (2009): Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **118**, 167-179.

Augustin, S., Huebbe, P., Matzner, N., Augustin, K., Schliebs, R., Cermak, R., Wolffram, S., Rimbach, G. (2008): *Ginkgo biloba* extract and its flavonol and terpenelactone fractions do not affect  $\beta$ -secretase mRNA and enzyme activity levels in cultured neurons and in mice. *Planta Med* **74**, 6-13.

Augustin, S., Rimbach, G., Augustin, K., Schliebs, R., Wolffram, S., Cermak, R. (2009): Effect of a short- and long-term treatment with *Ginkgo biloba* extract on amyloid precursor protein levels in a transgenic mouse model relevant to Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* **481**, 177-182.

Augustin, S., Rimbach, G., Augustin, K., Cermak, R., Wolffram, S. (2009): Gene regulatory effects of *Ginkgo biloba* extract and its flavonol and terpenelactone fractions in mouse brain. *J Clin Biochem* **45**, 315-321.

Ballatore, C., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. (2007): Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* **8**, 663-672.

Bastianetto, S., Ramassamy, C., Dore, S., Christen, Y., Poirier, J.; Quirion, R. (2000a): The *Ginkgo biloba* extract (EGb761) protects hippocampal neurons against cell death induced by  $\beta$ -amyloid. *Eur J Neurosci* **12**, 1882-1890.

Bastianetto, S., Zheng, W.H.; Quirion, R. (2000b): The *Ginkgo biloba* extract (EGb761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. *J Neurochem* **74**, 2268-2277.

- Beach, T., Kuo, Y., Spiegel, K., Emmerling, M., Sue, L., Kokjohn, K., Roher, A. (2000): The cholinergic deficit coincides with A $\beta$  deposition at the earliest histopathologic stages of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **59**, 308-313.
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, R., LaPensee, W. (2008): What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrine Rev* **29**, 1-41.
- Bernichtein, S., Touraine, P., Goffin, V. (2010): New concepts in prolactin biology. *J Endocrinol* **206**, 1-11.
- Biber, A. (2003): Pharmacokinetics of Ginkgo biloba extracts. *Pharmacopsychiatry* **36**, 32-37.
- Biber, A., Koch, E. (1999): Bioavailability of ginkgolides and bilobalides from extracts of *Ginkgo biloba* using GC/MS. *Planta Med* **65**, 192-193.
- Bick, K.L. (1994): The early story of Alzheimer's Disease. *Alzheimer's disease*, Raven Press, New York 1994: 1-8.
- Biernat, J., Wu, Y.Z., Timm, T., Zheng-Fischhoefer, Q., Mandelkow, E., Meijer, L., Mandelkow, E.M. (2002): Protein kinase MARK(PAR-1) is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol Cell Biol* **13**, 4013-4028.
- Braak, H., Braak, E. (1991): Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**, 239-259.
- Braak, H., Braak, E. (1995): Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging* **16**, 271-278; discussion 278-284.
- Braquet, P. (1986): Proofs of involvement of PAF-acether in various immune disorders using BN 52021 (ginkgolide B): a powerful PAF-acether antagonist isolated from *Ginkgo biloba* L. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **16**, 179-198.
- Brown, R.S., Kokay, I.C., Herbison, A.E., Grattan, D.R. (2010): Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. *J Comp Neurol* **518**, 92-102.

- Burns, A., Iliffe, S. (2009): Alzheimer's disease, clinical review. *BMJ* **338**: 467-471.
- Busciglio, J., Pelsman, A., Wong, C., Pigino, G., Yuan, M., Mori, H., Yankner, B.A. (2002): Altered metabolism of the amyloid  $\beta$ -precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome. *Neuron* **33**, 677-688.
- Buxbaum, J.N., Ye, Z., Reixach, N., Friske, L., Levy, C., Das, P., Golde, T., Masliah, E., Roberts, A.R., Bartfai, T. (2008): Transthyretin protects Alzheimer's mice from the behavioral and biochemical effects of A $\beta$  toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 2681-2686.
- Carro, E., Trejo, J.L., Gomez-Isla, T., LeRoith, D., Torres-Aleman, I. (2002): Serum insulin-like growth factor 1 regulates brain amyloid- $\beta$  levels. *Net Med* **8**, 1390-1397.
- Carter, J., Lippa, C.F. (2001):  $\beta$ -amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease. *Curr Mol Med* **1**, 733-737.
- Cermak, R., Wolfram, S. (2005): Effect of *Ginkgo biloba* extract EGb761 on differential gene expression in the brain, in *Nutrigenomics – The role of oxidants and antioxidants in differential gene expression*, eds. By Rimbach, G. and J.F.al P., CRS Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton; 341-352.
- Chandrasekaran, K., Mehrabian, Z., Spinnewyn, B., Chinopoulos, C., Drieu, K., Fiskum, G. (2003): Neuroprotective effects of bilobalide, component of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) in global brain ischemia and in excitotoxicity-induced neuronal death. *Pharmacopsychiatry* **36**, 89-94.
- Chen, Y., Liu, W., McPhie, D.L., Hassinger, L., Neve, R.L. (2003): APPBP1 mediates APP-induced apoptosis and DNA synthesis and is increased in Alzheimer's disease brain. *J Cell Biol* **163**, 27-33.
- Choi, S.H., Leight, S.N., Lee, V.M.Y., Li, T., Wong, P.C., Johnson, J.A., Saraiva, M.J., Sisodia, S.S. (2007): Accelerated A $\beta$  deposition in APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 mice with hemizygous deletions of TTR (Transthyretin). *J Neurosci* **27**, 7006-7010.

- Cohen-Salmon, C., Venault, P., Martin, B., Raffalli-Sebille, M.J., Barkats, M., Clostre, F., Pardon, M.C., Christen, Y., Chapouthier, G. (1997): Effects of Ginkgo biloba extract (EGb761) on learning and possible actions on aging. *J Physiol Paris* **91**, 291-300.
- Colciaghi, F., Borroni, B., Zimmermann, M., Bellone, C., Longhi, A., Padovani, A., Cattabeni, F., Christen, Y., Di Luca, M. (2004): Amyloid precursor protein metabolism is regulated toward  $\alpha$ -secretase pathway by *Ginkgo biloba* extracts. *Neurobiol Dis* **16**, 454-460.
- Costa, R., Ferreira-da-Silva, F., Saraiva, M.J., Cardoso, I. (2008b): Transthyretin protects against A $\beta$ -peptide toxicity by proteolytic cleavage of the peptide: a mechanism sensitive to the Kunitz protease inhibitor. *PLoS ONE* **3**, e2899.
- Crowther, R.A., Wischik, C.M. (1985): Image reconstruction of the Alzheimer paired helical filament. *EMBO J* **4**, 3661-3665.
- Crystal, H., Dickson, D., Fuld, P., Masur, D., Scott, R., Mehler, M., Masdeu, J., Kawas, C., Aronson, M., Wolfson, L. (1988): Clinico-pathologic studies in dementia: nondemented subjects with pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Neurology* **38**, 1682-1687.
- Dagvadorj, A., Collins, S., Jomain, J.B., Abdulghani, J., Karras, J., Zellweger, T., Li, H., Nurmi, M., Alanen, K., Mirtti, T., Visakorpi, T., Bubendorf, L., Goffin, V., Nevalainen, M.T. (2007): Autocrine prolactin promotes prostate cancer cell growth via Janus kinase-2-signal transducer and activator of transcription-5a/b signaling pathway. *Endocrinology* **148**, 3089-3101.
- de Boer, V.C., Dihal, A.A., van der Woude, H., Arts, I.C., Wolffram, S., Alink, G.M., Rietjens, I.M., Keijer, J., Hollmann, P.C. (2005): Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J Nutr* **135**, 1718-1725.
- de Feudis, F.V. (2002): Bilobalide and neuroprotection. *Pharmacol Res* **46**, 565-568.
- de Feudis, F.V. (2008): Effects of *Ginkgo biloba* extract (Egb 761) on gene expression: Possible relevance to neurological disorders and age-associated cognitive impairment. *Drug Dev Res* **57**, 214-235.

de Strooper, B., Annaert, W. (2000): Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* **113**, 1857-1870.

Diamond, B.J., Shiflett, S.C., Feiwei, N., Matheis, R.J., Noskin, O., Richards, J.A., Schoenberger, N.E. (2000): *Ginkgo biloba* extract: mechanisms and clinical indications. *Arch Phys Med Rehabil* **81**, 668-678.

Diamond, B.J., Bailey, M.R. (2013): *Ginkgo biloba*: indications, mechanisms, and safety. *Neuropsychology* **36**, 73-83.

Dongen, M.V., van Rossum, E., Kessels, A., Sielhorst, H., Knipschild, P. (2003): *Ginkgo* for elderly people with dementia and age-associated memory impairment: a randomized clinical trial. *J Clin Epidemiol* **56**, 367-376.

Dore, S., Bastianetto, S., Kar, S., Quirion, R. (1999): Protective and rescuing abilities of IGF-I and some putative free radical scavengers against  $\beta$ -amyloid-inducing toxicity in neurons. *Ann NY Acad Sci* **890**, 356-364.

Drachmann, D.A., Friedland, R.P., Larson, E.B., Williams, M.E. (1991): Making sure it's really Alzheimer's. *Patient Care* **25**, 13-40.

Du, J.L., Murphy, R.M. (2010): Characterization of the interaction of  $\beta$ -amyloid with transthyretin monomers and tetramers. *Biochemistry* **49**, 8276-8289.

Du, J., Cho, P.Y., Yang, D.T., Murphy, R.M. (2012): Identification of beta-amyloid-binding sites on transthyretin. *Protein Eng Des Sel* **25**, 337-345.

Dubois (2007): Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet* **6**, 734-746.

Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H., Haass, C. (2003): Reconstitution of  $\gamma$ -secretase activity. *Nat Cell Biol* **5**, 486-488.

Fisher, A. (2011): Cholinergic modulation of amyloid precursor protein processing with emphasis on M1 muscarinic receptor: perspectives and challenges in treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem* **120 Suppl 1**, 22-33.

Fleming, C.E., Saraiva, M.J., Sousa, M.M. (2007): Tranthyretin enhances nerve regeneration. *J Neurochem* **103**, 831-839.

Fleming, C.E., Nunes, A.F., Sousa, M.M. (2009): Transthyretin: More than meets the eye. *Progr Neurobiol* **89**, 266-276.

Fourtillan, J.B., Brisson, A.M., Girault, J., Ingrand, I., Decourt, J.P., Drieu, K., Jouenne, P., Biber, A. (1995): Pharmacokinetic properties of bilobalide and ginkgolides A and B in healthy subjects after intravenous and oral administration of *Ginkgo biloba* extract (EGb761). *Therapie* **50**, 137-144.

Francotte, P., Graindorge, E., Boverie, S., de Tullio, P., Pirotte, B. (2004): New trends in the design of drugs against Alzheimer's disease. *Curr Med Chem* **11**, 1757-1778.

Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A., Nagy, G. (2000): Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiol Rev* **80**, 1523-1631.

Frisardi, V., Solfrizzi, V., Seripa, D., Capurso, C., Santamato, A., Sancarlo, D., Vendemiale, G., Pilotto, A., Panza, F. (2010): A cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* **9**, 399-417.

Frotscher, M., Kugler, P., Misgeld, U., Zilles, K. (1988): Neurotransmission in the hippocampus. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **111**, 1-103.

Gasperi, M., Castellano, A.E. (2010): Growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis in neurodegenerative diseases. *J Endocrinol Invest* **33**, 587-591.

Gertz, H.J., Kiefer, M. (2004): Review about Ginkgo biloba special extract EGb761 (Ginkgo). *Curr Pharm Des* **10**, 261-264.

- Glenner, C.G., Wong, C.W. (1984): Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **122**, 1131-1135.
- Goedert, M., Jales, R., Vanmechelen, E. (1995): Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett* **189** (3), 167-169.
- Götz, J., Schild, A., Hoernkli, F., Pennanen, L. (2004): Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: insight from transgenic mouse and tissue-culture models. *Int J Dev Neurosci* **22**, 453-465.
- Haass, C., Selkoe, D.J. (2007): Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 101-112.
- Hampel, H., Blennow, K., Shaw, L.M., Hoessler, Y.C., Zetterberg, H., Trojanowski, J.Q. (2010): Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* **45**, 30-40.
- Hardy, J. (1997): Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* **20**, 154-159.
- Hardy, J., Selkoe, D.J. (2002): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-356.
- Härtig, W., Oklejewicz, M., Strijkstra, A.M., Boerma, A.S., Stieler, J., Arendt, T. (2005): Phosphorylation of the protein tau sequence 199-205 in the hippocampal CA3 region of Syrian hamsters in adulthood and during aging. *Brain Res* **1056**, 100-104.
- Heidrich, A., Rösler, M., Riederer, P. (1997): Pharmakotherapie bei Alzheimer-Demenz: Therapie kognitiver Symptome – neue Studienresultate. *Fortschr Neurol Psychiat* **65**, 108-121.

Hernandez, F., Avila, J. (2007): Tauopathies. *Cell Mol Life Sci* **64**, 2219-2233.

Hirtz, D., Thurman, D.J., Gwinn-Hardy, K., Mohamed, M., Chaudhuri, A.R., Zalutsky, R. (2007): How common are the ``common`` neurologic disorders? *Neurology* **68**, 326-337.

Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J.R., Traxy, J., Signorell, A., Müller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., Wollmer, M.A., Umbricht, D., de Quervain, D.J., Hofmann, M., Maddalena, A., Papassotiropoulos, A., Nitsch, R.M. (2003): Antibodies against  $\beta$ -amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* **38**, 547-554.

Holsinger, R.M., McLean, C.A., Beyreuther, K., Masters, C.L., Evin, G. (2002): Increased expression of the amyloid precursor  $\beta$ -secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **51**, 783-786.

Hoyer, S., Lannert, H., Nöldner, M., Chatterjee, S.S. (1999): Damaged neuronal energy metabolism and behavior are improved by *Ginkgo biloba* extract (EGb761). *J Neural Transm* **106**, 1171-1188.

Iqbal, K., Alonso, A.C., Gong, C.-X., Kathoon, S., Pei, J.-J., Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I. (1998): Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles. *J Neural Transm Suppl* **53**, 169-180.

Iqbal, K., Alonso Adel, C., Chen, S., et al. (2005): Tau pathology in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Biochem Biophys Acta* **1739**, 198-210.

IQWiG Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (2008): Präparate bei Alzheimer Demenz, Abschlussbericht.

[http://www.iqwig.de/download/A0519B\\_Abschlussbericht\\_Ginkgohaltige\\_Praeparate\\_bei\\_Alzheimer\\_Demenz.pdf](http://www.iqwig.de/download/A0519B_Abschlussbericht_Ginkgohaltige_Praeparate_bei_Alzheimer_Demenz.pdf)

Iwata, N., Higuchi, M., Saido, T.C. (2005): Metabolism of amyloid- $\beta$  peptide in Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* **108**, 129-148.



Jaszberenyi, M., Rick, F.G., Szalontay, L., Block, N.L., Zarandi, M., Cai, R.Z., Schally, A.V. (2012): Beneficial effects of novel antagonists of GHRH in different models of Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)* **4**, 755-767.

Kanowski, S., Herrmann, W.M., Stephan, K., Wierich, W., Hoerr, R. (1996): Proof of efficacy of the Ginkgo biloba special extract (EGb761) in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia. *Pharmacopsychiatry* **29**, 47-56.

Kanowski, S., Hoerr, R. (2003): Ginkgo biloba extract (EGb761) in dementia: intent-to-treat analyses of a 24-week, multi-center, double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Pharmacopsychiatry* **36**, 297-303.

Kawas, C.H. (2003): Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* **349**: 1056-1063.

Ke, Y.D., Suchowerska, A.K., van der Hoven, J., De Silva, D.M., Wu, C.W., van Eersel, J., Ittner, L.M. (2012): Lessons from tau-deficient mice. *Int J Alzheimers Dis* **2012**:873270.

Khlistunova, I., Biernat, J., Wang, Y., Pickhardt, M., von Bergen, M., Gazova, Z., Mandelkow, E., Mandelkow, E.M. (2006): Inducible expression of tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J Biol Chem* **281**, 1205-1214.

Klein, J., Weichel, O., Hilgert, M., Rupp, J., Chatterjee, S.S., Nawrath, H. (2003): Excitotoxic hippocampal membrane breakdown and its inhibition by bilobalide: role of chloride fluxes. *Pharmacopsychiatry* **36**, 78-83.

Klyubin, I., Betts, V., Welzel, A.T., Blennow, K., Zetterberg, H., Wallin, A., Lemere, C.A., Cullen, W.K., Peng, Y., Wisniewski, T., Selkoe, D.J., Anwyl, R., Walsh, D.M., Rowan, M.J. (2008): Amyloid  $\beta$  protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J Neurosci* **28**, 4231-4237.

Knowles, R.B., Wyart, C., Buldyrev, S.V., Cruz, L., Urbanc, B., Hasselmo, M.E., Stanley, H.E., Hyman, B.T. (1999): Plaque-induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural networks in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 5274-5279.

Kowalska, A. (2004): Genetic aspects of amyloid  $\beta$ -protein fibrillogenesis in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* **42**, 235-237.

Lautenschlager, N.T., Ihl, R., Müller, W.E. (2012): Ginkgo biloba extract EGb761 in the context of current developments in the diagnosis and treatment of age-related cognitive decline and Alzheimer's disease: a research perspective. *Int Psychogeriatr* **24 Suppl 1**, 46-50.

Le Bars, P.L., Velasco, F.M., Ferguson, J.M., Dessain, E.C., Kieser, M., Hoerr, R. (2002): Influence of the severity of cognitive impairment on the effect of the Ginkgo biloba extract (EGb761) in Alzheimer's disease. *Neuropsychobiology* **45**, 19-26.

Lee, H.G., Perry, G., Moreira, P.I., Garrett, M.R., Liu, Q., Zhu, X., Takeda, A., Nunomura, A., Smith, M.A. (2005): Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends Mol Med* **11**, 164-169.

Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A. (2007): Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* **445**, 168-176.

Li, X., Buxbaum, J.N. (2011): Transthyretin and the brain re-visited: Is neuronal synthesis of transthyretin protective in Alzheimer's disease? *Mol Neurodegener* **6**, 79.

Li, X., Masliah, E., Reixach, N., Buxbaum, J.N. (2011): Neuronal production of transthyretin in human and murine Alzheimer's disease: Is it protective? *J Neurosci* **31**, 12483-12490.

Liz, M.A., Fleming, C.E., Nunes, A.F., Almeida, M.R., Mar, F.M., Choe, Y., Craik, C.S., Powers, J.C., Bogoy, M., Sousa, M.M. (2009): Substrate specificity of transthyretin: identification of natural substrates in the nervous system. *Biochem J* **419**, 467-474.

- Löffler, T., Lee, S.K., Nöldner, M., Chatterjee, S.S., Hoyer, S., Schliebs, R. (2001): Effect of *Ginkgo biloba* extract (EGb761) on glucose metabolism-related markers in streptozotocin-damaged rat brain. *J Neural Transm* **108**, 1457-1474.
- Lovestone, S., Reynolds, C.H. (1997): The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience* **78**, 309-324.
- Luchsinger, J.A., Mayeux, R. (2004): Dietary factors and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **3**, 579-587.
- Lue, L.F., Kuo, Y.M., Roher, A.E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J.H., Rydel, R.E., Rogers, J. (1999): Soluble amyloid  $\beta$ -peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **155**, 853-862.
- Luo, C., Wu, Q., Huang, X.N., Sun, A.S., Shi, J.S. (2003): Ginkgo biloba leaf extract enhances levels of caspase-3 and amyloid precursor protein in normal rat hippocampus. *Acta Pharmacol Sin* **24**, 152-156.
- Luo, Y., Smith, J.V., Paramasivam, V., Burdick, A., Curry, K.J., Buford, J.P., Khan, I., Netzer, W.J., Xu, H., Butko, P. (2002): Inhibition of amyloid- $\beta$  aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761. *Proc Natl Acad Sci* **99**, 12197-12202.
- Luo, Y. (2006): Alzheimer's disease, the nematode *Caenorhabditis elegans*, and *Ginkgo biloba* leaf extract. *Life Sci* **78**, 2066-2072.
- Mahadevan, S., Park, Y. (2008): Multifaceted therapeutic benefits of *Ginkgo biloba* L.: chemistry, safety and uses. *J Food Sci* **73**, R14-19.
- Maitra, I., Marcocci, L., Droy-Lefaix, M.T., Packer, L. (1995): Peroxyl radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* extract EGb761. *Biochem Pharmacol* **49**: 1649-1655.
- Mak, G.K., Enwere, E.K., Gregg, C., Pakarainen, T., Poutanen, M., et al. (2007): Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior. *Nat Neurosci* **10**, 1003-1011.

- Mangoura, D., Pelletiere, C., Leung, S., Sakellardis, N., Wang, D.X. (2000): Prolactin concurrently activates src-PLD and JAK/Stat signaling pathways to induce proliferation while promoting differentiation in embryonic astrocytes. *Int J Dev Neurosci* **18**, 693-704.
- Marcocci, L., Maguire, J.J., Droy-Lefaix, M.T., Packer, L. (1994): The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb761. *Biochem Biophys Res Commun* **201**: 748-755.
- Marieb, E.N. (1991): Essentials of human anatomy and physiology. *Benjamin/Cummings*, Redwood City, CA, 3rd Edition.
- Mattson, M.P. (2004): Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **430**, 631-639.
- Mattsson, N., Zetterberg, H., Hansson, O., et al. (2009): CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* **302**, 385-393.
- Maurer, K., Ihl, R., Dierks, T., Frölich, L. (1997): Clinical efficacy of *Ginkgo biloba* special extract EGb761 in dementia of the Alzheimer type. *J Psychiatr Res* **31**, 645-655.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G., Suzuki, J., Dolman, C.E., Nagai, T. (1984): Aging Alzheimer's disease and the cholinergic system of the basal forebrain. *Neurology* **34**, 741-745.
- McKenna, D.J., Jones, K., Hughes, K. (2001): Efficacy, safety, and use of ginkgo biloba in clinical and preclinical applications. *Altern Ther Health Med* **7**, 70-86, 88-90.
- McLaurin, J., Kierstead, M.E., Brown, M.E., Hawkes, C.A., Lambermon, M.H., Phinney, A.L., Darabie, A.A., Cousins, J.E., French, J.E., Lan, M.F., Chen, F., Wong, S.S., Mount, H.T., Fraser, P.E., Westaway, D., St. George-Hyslop, P. (2006): Cyclohexanehexol inhibitors of A $\beta$ -aggregation prevent and reverse Alzheimer phenotype in a mouse model. *Nat Med* **12**, 801-808.
- Mega, M.S., Cummings, J.L., Fiorello, T., Gornbein, J. (1996): The spectrum of behavioural changes in Alzheimer's disease. *Neurology* **46**, 130-135.

Mercken, M., Vandermeeren, M., Lübke, U., Six, J., Boons, J., Van de Voorde, A., Martin, J.J., Gheuens, J. (1992): Monoclonal antibodies with selective specificity for Alzheimer tau are directed against phosphatase-sensitive epitopes. *Acta Neuropathol* **84**, 265-272.

Melmed, S. (1995): ed. The Pituitary. *Blackwell*, Cambridge, USA.

Melmed, S. (1990): Acromegaly. *N Engl J Med* **322**, 966.

Mix, J.A., Crews, W.D. Jr. (2000): An examination of the efficacy of Ginkgo biloba extract EGb761 on the neuropsychologic functioning of cognitively intact older adults. *J Altern Complement Med* **6**, 219-229.

Möller, H.J., Laux, G., Diester, A., Braun-Scharm, H. (2001): *Psychiatrie und Psychotherapie*. 2.Aufl., MLP-Duale Reihe Thieme (Stuttgart), 201-211.

Mufson, E.J., Chen, E.Y., Cochran, E.J., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Kordower, J.H. (1999): Entorhinal cortex  $\beta$ -amyloid load in individuals with mild cognitive impairment. *Exp Neurol* **158**, 469-490.

Multhaup, G., Mechler, H., Masters, C.L. (1995): Characterization of the high affinity heparin binding site of the Alzheimer's disease  $\beta$ A4 amyloid precursor protein (APP) and its enhancement by zinc(II). *J Mol Recognit* **8**, 247-257.

Murakami, T., Ohsawa, Y., Zhenghua, L., Yamamura, Ki, Sunada, Y. (2010): The transthyretin gene is expressed in Schwann cells of peripheral nerves. *Brain Res* **1348**, 222-225.

Nagy, Z., Jobst, K.A., Esiri, M.M., Morris, J.H., King, E.M., MacDonald, B., Lichtfield, S., Barnetson, L., Smith, A.D. (1996): Hippocampal pathology reflects memory deficit and brain imaging measurements in Alzheimer's disease: clinicopathologic correlations using three sets of pathologic diagnostic criteria. *Dementia* **7**, 76-81.

Nyberg, F. (2000): Growth hormone in the brain: characteristics of specific brain targets for the hormone and their functional significance. *Front Neuroendocrinol* **21**, 330-348.

- Oddo, S., Vasilevko, V., Caccamo, A., Kitazawa, M., Cribbs, D.H., LaFerla, F.M. (2006): Reduction of soluble A $\beta$  and tau, but not soluble A $\beta$  alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem* **281**, 39413-39423.
- Oken, B.S., Storzbach, D.M., Kaye, J.A. (1998): The efficacy of *Ginkgo biloba* on cognitive function in Alzheimer disease. *Arch Neurol* **55**, 1409-1415.
- Orgogozo, J.M., Gilman, S., Dartigues, J.F., Laurent, B., Puel, M., Kirby, L.C., Jouanny, P., Dubois, B., Eisner, L., Fitman, S., Michel, B.F., Boada, M., Frank, A., Hock, C. (2003): Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after A $\beta$ 42 immunization. *Neurology* **61**, 46-54.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J. (2001): *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second Edition, Academic Press, San Diego.
- Phelps, C.J., Horseman, N.D. (2000): Prolactin gene disruption does not compromise differentiation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Neuroendocrinology* **72**, 2-10.
- Pierre, S., Jamme, I., Droy-Lefaix, M.T., Nouvelot, A., Maixent J.M. (1999): *Ginkgo biloba* extract (EGb761) protects Na/K-ATPase activity during cerebral ischemia in mice. *Neuroreport* **10**, 47-51.
- Querfurth, H.W., LaFerla, F.M. (2010): Mechanisms of disease: Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* **362**, 329-344.
- Rainer, M., Mucke, H., Schlaefke, S. (2013): *Ginkgo biloba* extract EGb761 in the treatment of dementia: a pharmacoeconomic analysis of the Austrian setting. *Wien Klein Wochenschr* **125**, 8-15.
- Ramassamy, C., Averill, D., Beffert, U., Bastianetto, S., Theroux, L., Lussier-Cacan, S., Cohn, J.S., Christen, Y., Davignon, J., Quirion, R., Poirier, J. (1999): Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype. *Free Radic Biol Med* **27**, 544-553.

- Raz, A., Goodman, D.S. (1969): The interaction with thyroxine with human plasma prealbumin and with the prealbumin-retinol-binding protein complex. *J Biol Chem* **244**, 3230-3237.
- Ribeiro, C.A., Saraiva, M.J., Cardoso, I. (2012): Stability of the transthyretin molecule as a key factor in the interaction with A $\beta$  peptide – relevance in Alzheimer’s disease. *PLoS ONE* **7**, e45368.
- Rimbach, G., Wolffram, S., Watanabe, C.M.H., Packer, L., Gohil, K. (2003): Effects of Ginkgo biloba (EGb761) on differential gene expression. *Pharmacopsychiatry* **36 Suppl 1**, 595-599.
- Roberds, S.L., Anderson, J., Basi, G., Bienkowski, M.J., Branstetter, D.G., Chen, K.S. et al. (2001): BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary  $\beta$ -secretase activity in the brain: implications for Alzheimer’s disease therapeutics. *Hum Mol Genet* **10**, 1317-1324.
- Saez, J.M. (2012): Possible usefulness of growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis in Alzheimer’s disease treatment. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **12**, 271-286.
- Sandbrink, R., Beyreuther, K. (1997): Alzheimer-Krankheit (Wenn die Amyloid-Sanduhr läuft). *Neuroforum* **3**, 84-99.
- Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimares, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., Forster, C., Yue, M., Orne, J., Janus, C., Mariash, A., Kuskowski, M., Hyman, B., Hutton, M., Ashe, K.H. (2005): Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* **309**, 476-481.
- Saraiva, M.J. (2001): Transthyretin mutations in hyperthyroxinemia and amyloid diseases. *Hum Mutat* **17**, 493-503.
- Satyan, K.S., Jaiswal, A.K., Ghosal, S., Bhattacharya, S.K. (1998): Anxiolytic activity of ginkgolic acid conjugates from Indian Ginkgo biloba. *Psychopharmacology (Berl)* **136**, 148-152.

Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberberg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., Seubert, P. (1999): Immunization with amyloid- $\beta$  attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* **400**, 173-177.

Schenk, D.B., Seubert, P., Grundman, M., Black, R. (2005): A $\beta$  immunotherapy: Lessons learned for potential treatment of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* **2**, 255-260.

Schliebs, R., Arendt, T. (2011): The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* **211**, 555-563.

Schott, J.M., Fox, N.C., Frost, C., Scahill, R.I., Janssen, J.C., Chan, D., Jenkins, R., Rossor, M.N. (2003): Assessing the onset of structural change in familiar Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **53**, 181-188.

Schwarzman, A.L., Goldgaber, D. (1996): Interaction of transthyretin with amyloid-beta-protein: binding and inhibition of amyloid formations. *Ciba Found Symp* **199**, 146-160.

Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross, J.C., Weiss, S. (2003): Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* **299**, 117-120.

Siegenthaler, W. (2001) Klinische Pathophysiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, 8. Auflage.

Smith, J.V., Luo, Y. (2004): Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**, 465-472.

Soprano, D.R., Herbert, J., Soprano, K.J., Schon, E.A., Goodman, D.S. (1985): Demonstration of transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in rat. *J Biol Chem* **260**, 11793-11798.



Sousa, J.C., Cardoso, I., Marques, F., Saraiva, M.J., Palha, J.A. (2007b): Transthyretin and Alzheimer's disease: Where in the brain? *Neurobiol Aging* **28**, 713-718.

Stackman, R.W., Eckenstein, F., Frei, B., Kulhanek, D., Nowlin, J., Quinn, J.F. (2003): Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by chronic *Ginkgo biloba* treatment. *Exp Neurol* **184**, 510-520.

Stein, T.D., Johnson, J.A. (2002): Lack of neurodegeneration in the transgenic mice overexpressing mutant amyloid precursor protein is associated with increased levels of transthyretin and the activation of cell survival pathways. *J Neurosci* **22**, 7380-7388.

Stein, T.D., Anders, N.J., DeCarli, C., Chan, S.L., Mattson, M.P., Johnson, J.A. (2004): Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APP<sub>SW</sub> mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons, support for the amyloid hypothesis. *J Neurosci* **24**, 7707-7717.

Stewart, W.F., Kawas, C., Corrada, M., Metter, E.J. (1997): Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology* **48**, 626-632.

St. George-Hyslop, P.H. (2000): Genetic factors in the genesis of Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* **924**, 1-7.

Tanzi, R.E., Bertram, L. (2005): Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* **120**, 545-555.

Tashiro, K., Hasegawa, M., Ihara, Y., Iwatsubo, T. (1997): Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport* **8**, 797-801.

Tian, X., Wang, J., Dai, J., Yang, L., Zhang, L., Shen, S., Huang, P. (2012): Hyperbaric oxygen and Ginkgo Biloba extract inhibit A $\beta$ <sub>25-35</sub>-induced toxicity and oxidative stress in vivo: a potential role in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci* **122**, 563-569.

Trojanowski, J.Q., Schuck, T., Schmidt, M.L., Lee, V.M. (1989): Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *J Histochem Cytochem* **37**, 209-215.

Tyler, S.J., Dawbarn, D., Wilcock, G.K., Allen, S.J. (2002):  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase: profound changes in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **299**, 373-376.

Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M. (1999):  $\beta$ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735-741.

von Werder, K. (1998): Klinische Neuroendokrinologie. *Springer Verlag*, Heidelberg/Berlin.

Wallin, A.K., Blennow, K., Andreasen, N., Minthon, L. (2006): CSF biomarkers for Alzheimer's disease: levels of  $\beta$ -amyloid, tau, phosphorylated tau relate to clinical symptoms and survival. *Dement Geriatr Cogn Disord* **21**, 131-138.

Walsh, D.M., Selkoe, D.J. (2007): Abeta oligomers – a decade of discovery. *J Neurochem* **101**, 1172-1184.

Walker, T.L., Vukovic, J., Koudijs, M.M., Blackmore, D.G., Mackay, E.W., Sykes, A.M., Overall, R.W., Hamlin, A.S., Bartlett, P.F. (2012): Prolactin stimulates precursor cells in adult mouse hippocampus. *PLoS One* **7**, e44371. doi: 10.1371/journal.pone.0044371.

Watanabe, C.M.H., Wolfram, S., Ader, P., Rimbach, G., Packer, L., Maguire, J.J., Schultz, P.G., Gohil, K. (2001): The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine *Ginkgo biloba*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 6577-6580.

Wei, T., Hou, J., Chen, C., Zhao, B. und Xin, W. (2000): Hydrogen peroxide-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: protection by *Ginkgo biloba* extract. *Pharmacol Res* **41**, 427-433.

Wells, C.E. (1995): Organic syndromes: dementia. In: Kaplan HI, Sadock BJ (Eds.), *Comprehensive Textbook of Psychiatry* 4<sup>th</sup> ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 851.

Williams, B., Watanabe, C.M.H., Schultz, P.G., Rimbach, G., Krucker, T. (2004): Age-related effects of *Ginkgo biloba* extract on synaptic plasticity and excitability. *Neurobiol Aging* **25**, 955-962.

Winter, J.C. (1998): The effects of an extract of *Ginkgo biloba*, EGb761, on cognitive behavior and longevity in the rat. *Physiol Behav* **63**, 425-433.

Winter, J.C. und Timineri, D. (1999): The discriminative stimulus properties of EGb761, an extract of *Ginkgo biloba*. *Pharmacol Biochem Behav* **62**, 543-547.

Woeber, K.A., Ingbar, S.H. (1968): The contribution of thyroxine-binding prealbumin to the binding of thyroxine in human serum, as assessed by immunoabsorption. *J Clin Invest* **47**, 1710-1721.

Wu, Y., Wu, Z., Butko, P., Christen, Y., Lambert, M.P., Klein, W.L., Link, C.D., Luo, Y. (2006): Amyloid- $\beta$ -induced pathological behaviors are suppressed by *Ginkgo biloba* extract EGb761 and ginkgolides in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **26**, 13102-13113.

Yao, Z.-X., Drieu, K., Papadopoulos, V. (2001): The *Ginkgo biloba* extract EGb761 rescues PC12 neuronal cells from  $\beta$ -amyloid-induced cell death by inhibiting the formation of  $\beta$ -amyloid derived diffusible neurotoxic ligands. *Brain Res* **889**, 181-190.

Yao, Z.-X., Zequi, H., Katy, D., Vassilios, P. (2004): *Ginkgo biloba* extract (EGb761) inhibits  $\beta$ -amyloid production by lowering cholesterol levels. *J Nutr Biochem* **15**, 749-756.

Zapala, M.A., Hovatta, I., Ellison, J.A., Wodicka, L., Del Rio, J.A., et al. (2005): Adult mouse brain gene expression patterns bear an embryologic imprint. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 10357-10362.

Zhang, X. (2004): Cholinergic activity and amyloid precursor protein processing in aging and Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**, 137-152.

Zhu, Y.J., Lin, H., Lal, R. (2000): Fresh and nonfibrillar amyloid  $\beta$  protein(1-40) induces rapid cellular degeneration in aged human fibroblasts: evidence for A $\beta$ P-channel-mediated cellular toxicity. *FASEB J* **14**, 1244-1254.

Zimmermann, M., Colciaghi, F., Cattabeni, F., Di Luca, M. (2002): *Ginkgo biloba* extract: from molecular mechanisms to the treatment of Alzheimer's disease. *Cell Mol Biol* **48**, 613-623.

## **Danksagung**

Meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Reinhard Schliebs, danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Unterstützung bei der Lösung verschiedenartiger Probleme sowie für die konstruktive Beratung bei der Anfertigung der Promotionsschrift. Besonderer Dank gilt meinem Zweitbetreuer, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Härtig, für die tatkräftige und ausgezeichnete Unterstützung meiner Arbeit und die Einführung in histochemische Verfahren sowie für die sofortigen Korrekturen meiner Texte.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Arendt bedanke ich mich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung anfertigen zu können. Zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Dr. Rainer Cermak der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig für die Überlassung der Versuchsmaterialien. Herrn Dr. rer. nat. Jens Grosche danke ich für die Unterstützung bei der Arbeit am Laserscanning-Mikroskop. Dankbar bin ich den Mitarbeitern des Paul-Flechsig-Instituts für Hirnforschung für die große Hilfsbereitschaft und eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank gilt darüber hinaus und nicht zuletzt meiner Familie und Freunden für die Geduld und den ständigen Zuspruch während der Entstehung dieser Arbeit.

## **Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift



